



ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE

A importância dos fungos de solo no sucesso dos projetos de restauração florestal, no entorno da UHE de Promissão, SP

Erika Cinthia Bueno da Silva

Nazaré Paulista

Fevereiro/2017



ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE

A importância dos microrganismos de solo no sucesso dos projetos de restauração florestal, no entorno da UHE de Promissão, SP

Erika Cinthia Bueno da Silva

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Pedro Miguel Pedro

Prof. Dr. Tiago Pavan Beltrame

Trabalho Final apresentado ao Programa de Mestrado Profissional em Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia

IPÊ – INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS

Nazaré Paulista

Fevereiro/2017

Ficha Catalográfica

Silva, Erika Cinthia Bueno da.

A importância dos fungos de solo no sucesso dos projetos de restauração florestal, no entorno da UHE de Promissão, SP: 2017. 147 pp.

Trabalho Final (Mestrado): IPÊ – Instituto de Pesquisas Ecológicas.

1. Restauração;
2. Fungos;
3. Biologia Molecular.
 - I. Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade, IPÊ – Nazaré Paulista/SP.



"A importância dos microrganismos do solo, no sucesso dos projetos de restauração florestal, no entorno da UHE de Promissão, SP"

Erika Cinthia Bueno da Silva

Produto final apresentado ao IPE – Instituto de Pesquisas Ecológicas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável

Nazaré Paulista, 03 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Pedro Miguel da Costa Pedro (Orientador)

Prof. Dr. Flavio Bártin Gandara Mendes

Prof. Dr. Tiago Pavan Beltrame

Nossa Missão

Desenvolver e disseminar modelos inovadores de conservação da biodiversidade que promovam benefícios socioeconômicos por meio de ciência, educação e negócios sustentáveis

Caixa Postal 47 • Nazaré Paulista, SP 12200-000 Brasil • Fone & Fax (11) 3593 0041
www.ipe.org.br

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de estar me aperfeiçoando como profissional e como ser humano.

Agradeço a empresa AES-Tiete pelo comprometimento com a área ambiental e pelo incentivo em pesquisa e inovação. Pelo financiamento do projeto P&D ANEEL – 0064-1035/2014 e pela bolsa de estudos a mim concedida, sem a qual não seria possível a realização do mestrado.

Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Pedro M Pedro, pela oportunidade de desenvolver o trabalho em um projeto de restauração, pela orientação, paciência, por sempre estar disposto a contribuir e a compartilhar seus conhecimentos sobre biologia molecular e bioinformática, e também os esforços físicos durante o trabalho de campo.

Ao Prof. Tiago Pavan Beltrame, ao Prof. Laury Cullen Jr e ao Rogério Fernando Lourenção pela orientação e ao apoio com o trabalho de campo.

Ao Prof. Flavio B. Gandara por aceitar a participar da banca examinadora.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores e colaboradores da ESCAS- IPÊ, por oferecerem aos alunos toda a infraestrutura, suporte e o curso de qualidade.

Ao Gabriel que foi meu companheiro em todos os momentos, que sempre me incentivou, me apoiou e ajudou de todas as formas.

Agradeço aos meus pais e amigos pelo apoio em todos os momentos e por poder proporcionar condições para que eu realizasse o mestrado.

Aos colegas do Mestrado, que ao longo desse trajeto tornaram-se amigos de todas as horas, em especial a (Carol, Gisa, Irina, Isa, Lili, Silas e Sol) que são mais do que amigos de pós-graduação, são amigos para a vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para mais uma etapa cumprida.

Resumo

Nos últimos anos acompanhamos o aumento no número do desmatamento, principalmente nas florestas tropicais e devido a isso se observa uma tendência global, a recuperação dessas áreas. As técnicas de recuperação das áreas degradadas, assim como as pesquisas nessa área, estão avançando cada vez mais e a restauração florestal como método de recuperação das florestas devastadas vem crescendo ao longo dos anos, devido às exigências na legislação. A técnica mais popular em restauração é o plantio de mudas. Uma das maiores preocupações dessa técnica é com relação à qualidade das mudas. Porém, pouco se sabe a respeito da interação dos microrganismos presentes no solo com a muda plantada e qual a importância dos mesmos no processo de restauração. Baseado nisso o presente trabalho analisou a diversidade fúngica de uma área restaurada com mudas nativas, localizada no município de Mendonça-SP. As amostras de solos da área foram coletadas e posteriormente foram submetidas a análises moleculares (extração de DNA, Nested-PCR e sequenciamento). Após a identificação molecular, as amostras foram submetidas a análises de dados com o uso de ferramentas de bioinformática. As análises de dados foram feitas estimadas na diversidade alfa e beta em Community Membership e Community Structure, utilizando os índices Jaccard, Distância Euclidiana, UNIFRAC e Bray-curtis. O resultado mostrou que a comunidade de fungos do solo do município de Mendonça apresentou grande diversidade e que existem agregações de comunidades fungais, ou seja, os fungos não estão aleatoriamente distribuídos pela área do plantio.

PALAVRAS CHAVE: Restauração; Fungos; Análise Molecular; Diversidade Alfa; Diversidade Beta.

Abstract

In recent years, we have witnessed an increase in levels of deforestation, especially in tropical forests. This has led to an overall trend for the recovery of many of these areas. Recovery techniques, and research in this area are being actively explored. Forest restoration as a method to recuperate devastated forests has recently increased due to the requirements in legislation. The most popular restoration technique is planting seedlings. One of the major concerns of this technique is with regard to seedling quality. However, little is known about the interaction of the microorganisms present in the soil with the planted seedling, and how important they are in the restoration process. Based on this, the present work analyzed the fungal diversity of a restored area with native seedlings in the municipality of Mendonça-SP. Soil samples from the area were collected and subsequently subjected to molecular analysis (DNA extraction, Nested-PCR and sequencing). After molecular identification, the samples were submitted to data analysis, using bioinformatics tools. Data analyzes were estimated on alpha and beta diversity in Community Membership and Community Structure, using the Jaccard, Euclidian distance, UNIFRAC and Bray-curtis indices. The results showed that the soil fungus community presented elevated diversity, and that there are aggregations of fungal communities, that is, the fungi are not randomly distributed within the plantation area.

KEYWORDS: Restoration; Fungi; Molecular Analysis; Alpha diversity; Beta Diversity.

Lista de Figuras e Tabela

Capítulo I

Figura 1: Mudanças nas florestas por continente.....	16
Figura 2: Áreas degradadas e áreas em recuperação	17
Figura 3: Quadro da área desmatada do cerrado antes de 2002 até 2011	18
Figura 4: Quadro da degradação da Amazônia Legal entre os anos de 2007 a 2013	20
Figura 5: Desflorestamento da Mata Atlântica de 1985 a 2014.....	21
Figura 6: Quadro Desmatamento da Mata Atlântica entre 2013-2014	21
Figura 7: Desmatamento no estado de São Paulo.....	22

Tabela 1: Estimativa preliminar do desmatamento ocorrido no Pantanal no período de 2008- 2009, tendo como referência a área total do bioma de 151.313 km² 17

Capítulo II

Figura 1: Localização do município de Mendonça no estado de São Paulo	58
Figura 2: Área reflorestada com os pontos de coleta de solo	59
Figura 3: Amplicon Fusion Primer com MID	61
Figura 4: Imagem Google Earth com a distribuição dos OTUS em cada ponto	68
Figura 5: Gráfico com a distribuição dos OTUS em cada ponto.....	69
Figura 6: Gráfico com a distribuição dos OTUS em cada ponto.....	69
Figura 7: Gráfico com a distribuição dos OTUS em cada ponto.....	70
Figura 8: Gráfico índice de diversidade Alfa.....	72
Figura 9: Gráfico Correlação entre Diversidade Beta vs distancia	75
Figura 10: Gráfico Correlação de Pearson.....	76
Figura 11: Gráfico Correlação de Pearson.....	76
Figura 12: Gráfico Correlação de Pearson.....	77
Figura 13: Gráfico Correlação de Pearson.....	77
Figura 14: Dendrograma usando o índice de similaridade de Jaccard entre os 18 pontos amostradas.....	80

Figura 15: Dendrograma usando o índice de similaridade de Distancia euclidiana (Membership) entre os 18 pontos amostradas	80
Figura 16: Dendrograma usando o índice de similaridade de UNIFRAC (unweighted) entre os 18 pontos amostradas	81
Figura 17: Dendrograma usando o índice de similaridade de Bray-Curtis entre os 18 pontos amostradas.....	81
Figura 18: Dendrograma usando o índice de similaridade de Distancia euclidiana (Structure) entre os 18 pontos amostradas	82
Figura 19: Dendrograma usando o índice de similaridade de UNIFRAC (weighted) entre os 18 pontos amostradas	82
Tabela 1: OTUs acima de 1% do total das amostras	66
Tabela 2: Táxons de fungos que foram amostrados com frequência de mais de 1%	67
Tabela 3: Táxons identificados de amostras de solo pertencendo ao filo Glomeromycota	70
Tabela 4: Índices de diversidade alfa calculados no <i>software</i> Mothur.....	71
Tabela 5: Índice de diversidade alfa correlacionado com a cobertura de copa	72
Tabela 6: Significado estatístico de permutações de autocorrelação entre matrizes de distância espacial e de diversidade Beta entre os 18 pontos amostrados na pesquisa.....	74
Tabela 7: NMDS matriz vs cobertura	78
Tabela 8: NMDS Matriz vs OTUs mais significativos (correção de Bonferroni)	79

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
Lista de Figuras e Tabelas	8
Capítulo I	12
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Revisão Bibliográfica	14
3. Objetivos	45
4. Referências Bibliográficas	45
Capítulo II	53
Resumo	53
Abstract	54
1. Introdução	55
2. Metodologia	57
3. Coleta e Análise	59
4. Resultados	64
5. Discussão	83
6. Conclusão	86
7. Referências Bibliográficas	86
Capítulo III	90
Resumo	90
Abstract	91
1. Introdução	92

2. Revisão de Literatura OTUs	93
3. Uso da bioinformática na análise de biodiversidade de fungos.....	120
4. Conclusão	122
5. Considerações finais	122
6. Implicações para a prática	123
7. Referências Bibliográficas	124
Anexos	133

Capítulo I

Contextualização sobre o desmatamento e as técnicas de reflorestamento e restauração

Resumo

Nos últimos anos acompanhamos o aumento no número do desmatamento, principalmente nas florestas tropicais, que são regiões que abrigam grande parte da biodiversidade do planeta. O desmatamento está vinculado à agricultura, expansão da pecuária, mudança no uso da terra, à construção e a expansão urbana. As consequências do desmatamento podem ter vários aspectos, tais como: alteração no clima, perda da biodiversidade, redução dos insumos naturais, assoreamento dos corpos d'água, enchentes, degradação do solo, processos erosivos, etc. Diante do cenário descrito anteriormente, observou-se uma tendência global, que é a recuperação de nossas florestas. Inicialmente as propostas para recuperação das áreas desmatadas eram baseadas nas técnicas de reflorestamentos, que nada mais é do que o plantio de espécies únicas, tal como o eucalipto e que apresentam a finalidade de corte e posteriormente a comercialização de madeira. Com o decorrer dos anos um novo conceito surgiu que é o conceito de restauração florestal que se distingue do conceito de reflorestamento, pois restauração é o termo usado para a recomposição da área degradada, com espécies de plantas nativas e objetivando retornar essa área degradada o mais próximo possível da condição natural, ou seja, da área antes de sofrer a degradação. Inúmeras são as técnicas de restauração, e cada técnica é aplicada de acordo com as condições que o local degradado apresenta, porém vale ressaltar que no Brasil a técnica mais empregada é a do plantio de mudas. O avanço na restauração de áreas degradadas vai além das técnicas, busca também entender a interação dos microrganismos com as plantas e o solo, e para isso utiliza ferramentas de biologia molecular.

PALAVRAS CHAVE: Desmatamento; Reflorestamento; Restauração; Plantio de Mudas; Microrganismos.

Abstract

In recent years, we have witnessed an increase in the number of deforestation, especially in tropical forests, which are regions that house much of the planet's biodiversity. Deforestation is linked to agriculture, expansion of livestock, land use change, urban construction and expansion. The consequences of deforestation can have several aspects, such as: change in climate, loss of biodiversity, reduction of natural inputs, siltation of water bodies, floods, soil degradation, erosion processes, etc. In view of the scenario described above, is a global trend, which is the recovery of our forests. Initially the proposals for recovery of deforested areas were based on reforestation techniques, which is nothing more than the planting of unique species, such as eucalyptus, which have the purpose of cutting and then commercializing timber. Over the years a new concept emerged that is the concept of forest restoration that distinguishes itself from the concept of reforestation, since restoration is the term used for the recomposition of the degraded area, with species of native plants and aiming to return this degraded area as soon as possible. Natural condition, that is, of the area before it is degraded. There are countless restoration techniques, and each technique is applied according to the conditions that the degraded site presents, but it is worth mentioning that in Brazil the most used technique is the planting of seedlings. The advance in restoration of degraded areas goes beyond the techniques, seeks to understand the interaction of microorganisms with plants and soil, and for this uses molecular biology tools.

KEYWORDS: Deforestation; Reforestation; Restoration; Seedling Planting; Microorganisms.

1 Introdução

Atualmente o respeito e a preservação do meio ambiente deixaram de ser apenas uma preocupação de um pequeno grupo de ambientalistas passando a ser uma preocupação mundial e devido a isso foram introduzidas políticas públicas com o apoio governamental para melhorias em todo o planeta. Esta preocupação mundial deve-se à valorização da qualidade de vida e à percepção de que a sobrevivência do homem depende diretamente da preservação dos recursos naturais. Os efeitos globais que sentimos, tais como: racionamento de energia, escassez dos recursos hídricos, aquecimento global, chuvas ácidas e desertificação do solo dentre tantos outros, são consequências diretas da degradação ambiental. O crescimento da população, da produção de alimentos, agropecuária, indústrias, mineradoras e tantas outras atividades exploratórias, contribuíram e ainda contribuem significativamente para o desmatamento em todo o mundo. Mesmo com tantos esforços por meio da realização de convenções ambientais, protocolos e legislações, o que se vê é ainda é um cenário crítico para o meio ambiente.

Nos últimos anos acompanhamos o aumento no número do desmatamento, principalmente nas florestas tropicais, que são regiões que abrigam grande parte da biodiversidade do planeta. As consequências do desmatamento vão muito além da perda da vegetação, pois muitas espécies podem estar sendo extintas e muitas delas podem nem ter sido catalogada ainda. O fato de a maior parte das áreas desmatadas estarem em países em desenvolvimento é ainda mais preocupante, pois a expansão urbana desordenada, o aumento no consumo de alimentos e no consumo de recursos naturais, eleva ainda mais a pressão sobre as áreas florestadas (BELTRAME, 2013).

Diante do cenário descrito nos parágrafos acima, observa-se uma tendência global, que é a recuperação de nossas florestas. As técnicas de recuperação das áreas degradadas, assim como as pesquisas nessa área, estão avançando cada vez mais, objetivando ter como produto final mais do que uma área florestada, mas sim uma área próxima do que foi a original, em equilíbrio com os seres bióticos.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Desmatamento no Mundo

O desmatamento ao redor dos países do mundo tem justificativas diferentes, em alguns países da América do Sul, África e Ásia, o desmatamento está vinculado à agricultura, expansão da pecuária e mudança no uso da terra. Na Índia, Itália, Líbano, o desmatamento está atrelado à construção e a expansão urbana. Camarões, Bolívia, Quênia, está relacionado a questões de segurança alimentar. Em diversos países podemos creditar as taxas de desmatamento com a falta de políticas ambientais ou políticas ineficientes. Como vimos acima, diversos são os motivos ao redor do mundo pelo qual houve e ainda há desmatamento das nossas florestas (FAO, 2015).

As áreas florestais do planeta diminuíram cerca de 2,4% na década de 90, uma perda equivalente a 90.000 km² por ano. Os índices de desmatamento são mais elevados na África (cerca de 7% por década), e na América Latina (pouco menos de 5% por década). Esse índice de desmatamento sofreu queda significativa na Ásia, especialmente entre 2000 e 2005, em parte devido à expansão do reflorestamento. A maioria dos desmatamentos ocorre nas regiões tropicais, onde está localizada quase metade das reservas florestais mundiais. Na Europa, as florestas naturais estão em processo de expansão desde a década de 90, visto a menor demanda de terras agrícolas em decorrência do baixo crescimento populacional e do contínuo aumento da produtividade da agricultura local. Já na América do Norte, América Central e Oceania o processo apresenta taxas menores de desmatamento, mas não menos preocupantes (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2009). A figura 1 mostra as mudanças nas florestas por continente em milhões de hectares por ano.

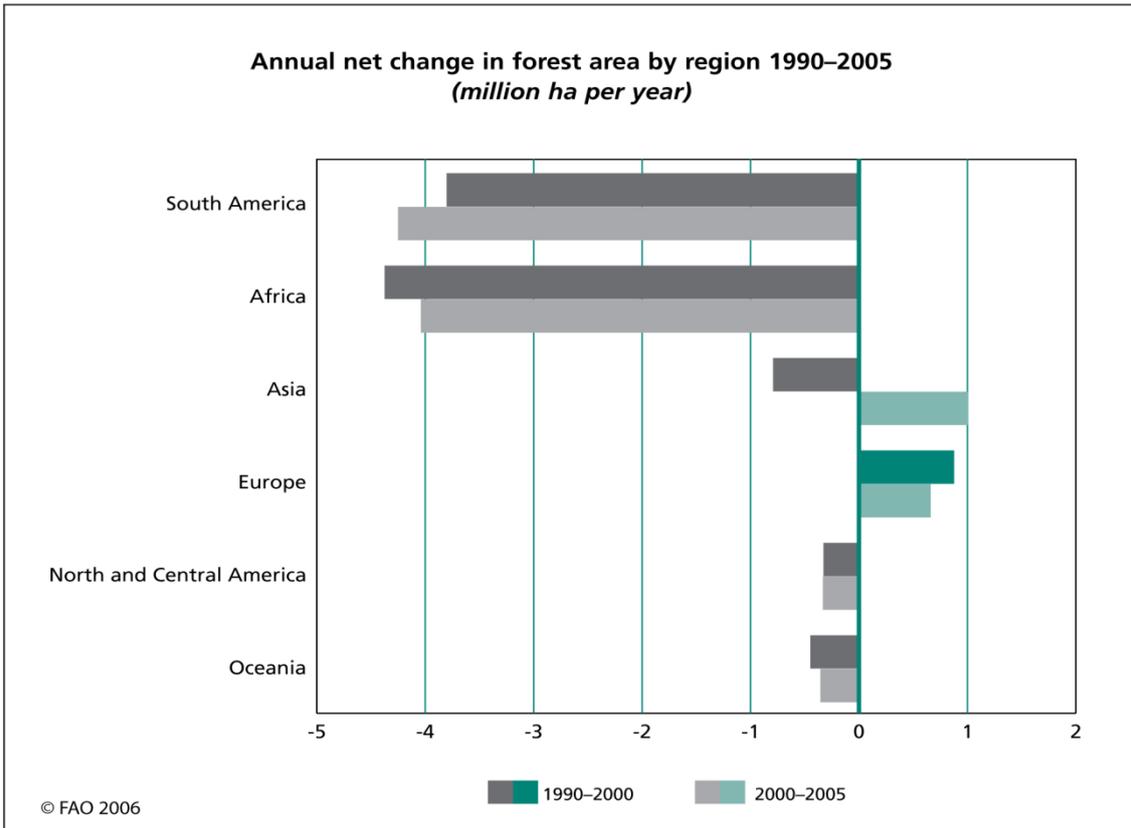


Figura 1: Mudanças nas florestas por continente.

Fonte: www.fao.org/forestry/41256/en/

A figura 2, como complemento do gráfico acima, destaca as áreas em vermelho como as que apresentam uma diminuição significativa nas áreas de florestas nativas, maior que 50% por ano. As áreas em verde, sul e leste asiático e parte da Europa, apresentam um aumento na recuperação florestal, maior que 50% por ano. O mapa mostra um cenário preocupante, principalmente no Brasil, onde, está concentrada grande área em vermelho.

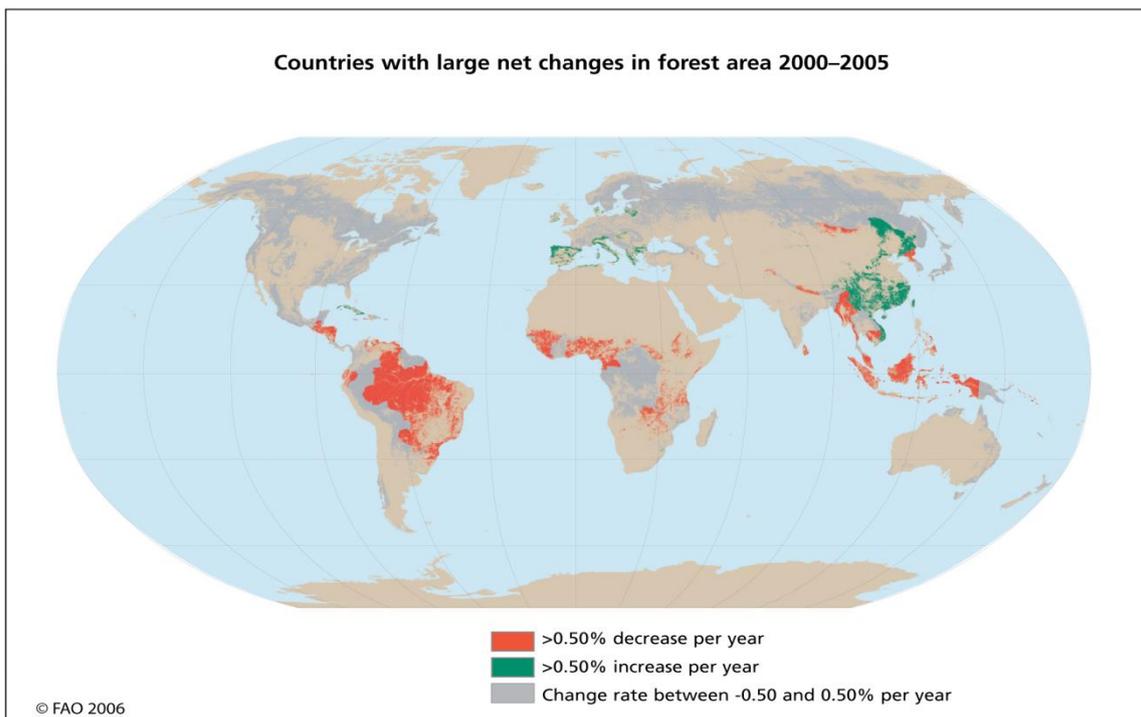


Figura 2: Áreas degradadas e áreas em recuperação.

Fonte: www.fao.org/forestry/41256/en/

2.2 Desmatamento no Brasil

O desmatamento no Brasil, tão evidente através da mídia hoje em dia, iniciou seu processo exploratório desde o período do Brasil Colônia, onde as madeiras eram retiradas para abastecer os nobres em Portugal. Esse processo de retirada de vegetação, ao longo dos anos foi tomando proporções maiores e atualmente inúmeras espécies arbóreas encontram-se em extinção. Existem diversos fatores que podem levar a explicação do desmatamento ao longo dos anos, sendo eles atrelados a questões econômicas e políticas.

O desmatamento das florestas no Brasil vem trazendo consequências ecológicas e ambientais bastante visíveis, prejudicando as áreas de nascentes de rios, aumentando a exposição do solo, dificultando a regeneração e facilitando o estabelecimento de espécies invasoras (Sugai, 2007). Sabe-se que a retirada da vegetação natural e a intensa movimentação de solo com a remoção das camadas superficiais causam modificações físicas, químicas e biológicas no sistema (Cunha et al., 2003 apud Silva, 2013) e como consequência ocorre o comprometimento na

qualidade do solo, na microbiota edáfica e no processo de regeneração natural das espécies nativas.

Nos próximos parágrafos vamos ver de forma sucinta os dados referentes ao desmatamento nos principais biomas do Brasil (Cerrado, Caatinga, Pantanal, Amazônia e Mata Atlântica).

O Cerrado que ocupa 21% do território nacional, vem sofrendo com a expansão da agropecuária que está desmatando grandes áreas para o cultivo de culturas anuais (principalmente a soja), a criação de grandes áreas de pastagens e a ocupação de áreas urbanas (Cabral, 2013). Segue a figura 3 com a área desmatada até 2011.

Bioma (área total km ²)	Área desmatada no período anterior a 2002 (km ²)	Área desmatada no período 2002-2008 (km ²)	Área desmatada no período 2008-2009 (km ²)	Área desmatada no período 2009-2010 (km ²)	Área desmatada no período 2010-2011 (km ²)	Área Total de desmatam ento no bioma (Km ²)	% desmatam ento sobre a área total bioma
Cerrado (2.039.386)	890.636	85.074	7.637	6.469	7.247	997.063	48,89

Figura 3: Quadro da área desmatada do cerrado antes de 2002 até 2011.

Fonte: Ministério do Meio Ambiente, 2015.

A caatinga, único bioma 100% nacional, vem sofrendo com o desmatamento devido à pressão feita pelo sistema agropastoril e essa pressão varia de intensidade em função da localização, estrutura e tamanho dos remanescentes (Ministério do Meio Ambiente, 2011).

A Caatinga teve sua cobertura vegetal original e secundária reduzida de 443.039,06 km² para 441.117,88 km². Portanto, o bioma sofreu uma perda aproximada de 0,23% entre 2008-2009. No tocante ao desmatamento a Caatinga teve sua cobertura vegetal nativa suprimida, entre 2008-2009 em 1.921,18 km² (Ministério do Meio Ambiente, 2011).

Assim como o cerrado, o pantanal vem sofrendo com a expansão desordenada das atividades agropecuárias e os reflexos dessa expansão são: erosão do solo, assoreamento e contaminação dos rios, perda da fauna, flora e da biodiversidade (Ministério do Meio Ambiente, 2011). Na tabela 1 observamos os números referentes ao desmatamento no Pantanal.

Tabela 1: Estimativa preliminar do desmatamento ocorrido no Pantanal no período de 2008-2009, tendo como referência a área total do bioma de 151.313 km².

Área total do bioma	151.313 km ²
Área desmatada até 2008	23.160 km ²
Área desmatada no período 2008 a 2009	188 km ²

Fonte: Adaptado do Ministério do Meio Ambiente, 2011.

O desmatamento da Amazônia atualmente tem como principais responsáveis à agropecuária e a expansão das monoculturas. O crescimento das commodities promoveu e ainda promove a expansão da fronteira agrícola rumo a Amazônia, tendo como objetivo instalar-se em regiões de florestas e, conseqüentemente potencializando o desmatamento (SANTILLI e MOUTINHO, 2006).

O aumento no desmatamento da Amazônia foi observado no período militar (década de 80) devido à implementação de grandes projetos agropecuários no sul do Pará e no norte do Mato Grosso. Segundo dados do INPE, dos 30,6 milhões de hectares das florestas desmatadas no período entre 1990 a 2006, 25,3 milhões de hectares foram ocupados por pastos (CABRAL, 2013).

O avanço da agricultura e da pecuária no norte do país trouxe consigo o aumento no número de estradas e estas promovem aumento nos níveis de desmatamento. Um exemplo disso é o caso da BR-163, que foi construída com o objetivo de escoar a produção de grãos no norte do Mato Grosso, em direção ao mercado do Hemisfério Norte. Essa rodovia ainda não está totalmente asfaltada, mas sabe-se que o impacto causado por ela, assim como na construção de outras rodovias é enorme. O anúncio da construção da BR-163 na década de 70 provocou um aumento substancial na grilagem de terras e o desmatamento previsto para um período de 10 anos, aconteceu antes mesmo de começar as obras da construção da rodovia (Santilli e Moutinho, 2006). Na figura 4 podemos ver o avanço no desmatamento no período de 2007 a 2013.

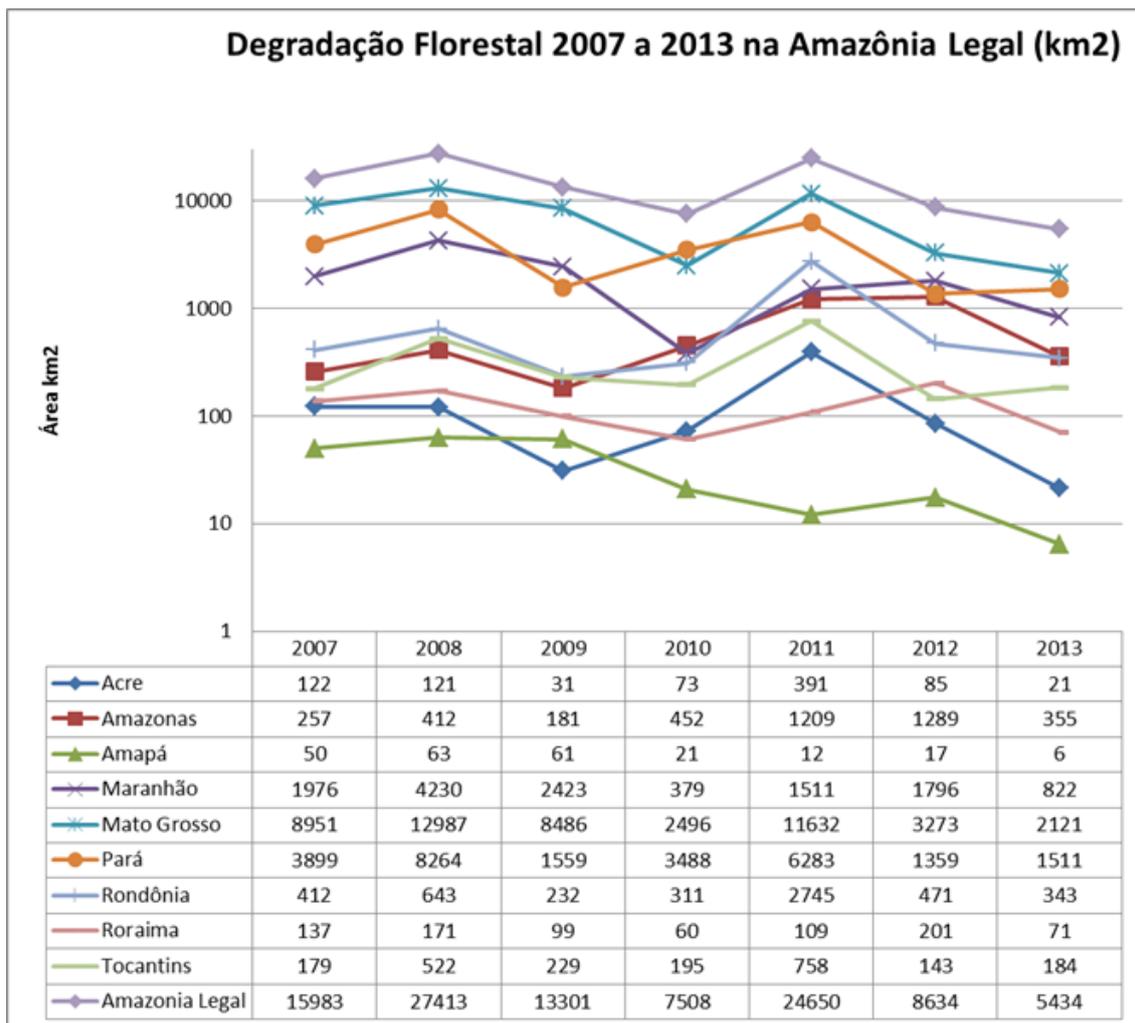


Figura 4: Quadro da degradação da Amazônia Legal entre os anos de 2007 a 2013.
Fonte: INPE, 2014.

Como citado no 1º parágrafo o desmatamento vem desde o período do Brasil Colônia e nesse período as áreas desmatadas eram aquelas que estavam ao redor da faixa litorânea, denominadas de Mata Atlântica. Certamente esse bioma foi o mais devastado ao longo dos anos e em consequência disso hoje temos apenas remanescentes dessa vegetação. Na figura 5 será apresentado um gráfico que mostra o desmatamento entre os anos de 1985 a 2014.



Figura 5: Desflorestamento da Mata Atlântica de 1985 a 2014.
Fonte: SOS Mata Atlântica, 2015.

Observamos pelo gráfico acima que o desmatamento da Mata Atlântica caiu de forma expressiva nos últimos anos. Porém, como vemos no quadro abaixo em alguns estados houve um aumento no desmatamento entre 2013 e 2014. A cor azul na figura 6 apresenta redução e a cor vermelha representa aumento no desmatamento.

Desflorestamentos entre 2013-2014, em hectares									
	UF	Área UF	Lei Mata Atlântica	% Bioma	Mata 2014	% Mata	Desmatamento 2013-2014	Desmatamento 2012-2013	Varição
1º	PI	25.158.115	2.662.017	11%	911.833	34,3%	5.626	6.633	-15%
2º	MG	58.653.439	27.623.397	47%	2.858.654	10,3%	5.608	8.437	-34%
3º	BA	56.472.020	17.976.964	32%	2.033.729	11,3%	4.672	4.777	-2%
4º	PR	19.932.306	19.639.352	99%	2.303.894	11,7%	921	2.126	-57%
5º	SC	9.571.782	9.571.782	100%	2.212.747	23,1%	692	672	3%
6º	MS	35.713.264	6.377.963	18%	707.717	11,1%	527	568	-7%
7º	SP	24.821.183	17.071.302	69%	2.378.985	13,9%	61	94	-34%
8º	RS	26.880.228	13.836.988	51%	1.090.991	7,9%	40	142	-72%
9º	PE	9.814.204	1.688.361	17%	200.332	11,9%	32	155	-79%
10º	GO	34.007.266	1.189.787	3%	29.949	2,5%	25	50	-51%
11º	ES	4.607.118	4.607.118	100%	482.592	10,5%	20	14	41%
12º	AL	2.776.873	1.524.163	55%	143.669	9,4%	14	17	-17%
13º	RJ	4.371.498	4.371.498	100%	819.969	18,8%	12	11	4%
14º	SE	2.190.735	1.018.955	47%	72.461	7,1%	10	137	-93%
15º	PB	5.644.914	597.979	11%	54.024	9,0%	6	-	-
16º	CE	14.891.290	865.242	6%	64.240	7,4%	-	4	-
17º	RN	5.280.748	350.780	7%	16.032	4,6%	-	109	-
							18.267	23.948	-24%

Figura 6: Quadro Desmatamento da Mata Atlântica entre 2013-2014.
Fonte: SOS Mata Atlântica, 2015.

2.3 Desmatamento no estado de São Paulo

O processo histórico de ocupação do território paulista foi intenso e em pouco tempo áreas extensas foram devastadas. A ocupação das áreas florestadas trouxe inúmeras consequências e dentre elas a perda de áreas para manutenção de florestas, principalmente as áreas de alta declividade e as matas ciliares (MACEDO, 1993).

A área de Mata Atlântica do estado São Paulo que cobre a faixa entre o litoral e a mata mais no interior do estado, têm entre elas muitas áreas urbanas e rurais, fazendo como que os remanescentes florestais pareçam distintos, embora no passado fizessem parte de uma floresta contínua e única. Os fragmentos da mata ainda existentes estão degradados pela caça e exploração das espécies de árvores comerciais (MEISTER e SALVIATI, 2009).

De 1854 a 2000 o estado de São Paulo teve um desmatamento de praticamente 90% de sua área total (figura 7), mostrando que é de vital importância à recomposição dessas áreas florestais. Essas áreas desempenham diversos papéis ecológicos, tais como: atuam no controle de enxurradas, ajudam a reduzir o assoreamento dos rios, controlam processos erosivos, e absorvem o excesso de nutrientes.

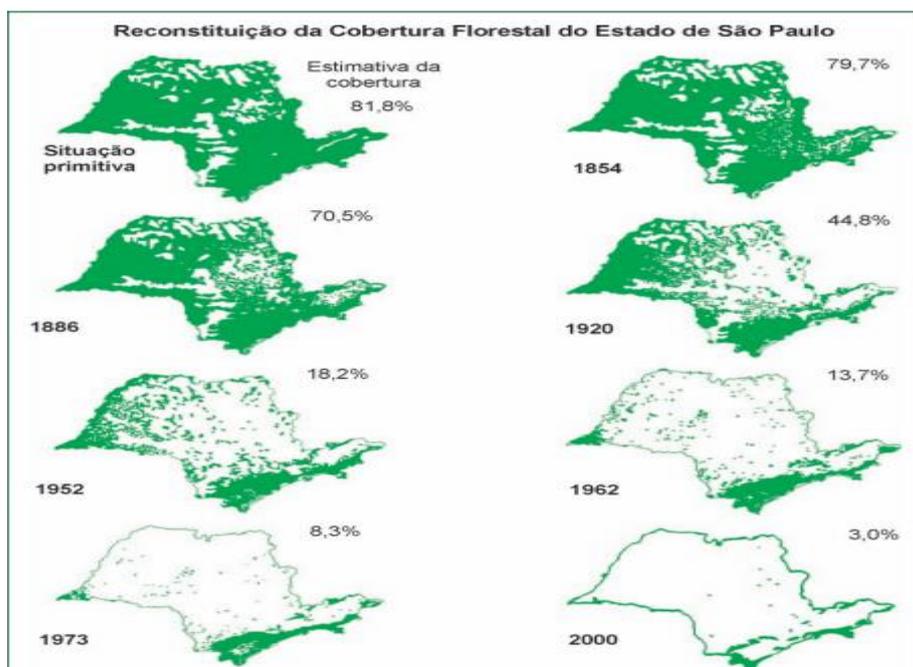


Figura 7: Desmatamento no estado de São Paulo.
Fonte: Instituto Florestal, 2005.

O desmatamento no estado de São Paulo está correlacionado com as atividades agrícolas e cada período teve uma cultura predominante no cenário agrário, onde podemos destacar o café, pastos, citros e mais recentemente o cultivo da cana de açúcar. Além da agricultura e pastagem, a expansão urbana contribuiu significativamente para a retirada de áreas florestais.

2.4 Consequências do Desmatamento

A preocupação a respeito das consequências sobre o desmatamento cresceu nos últimos tempos. Tudo porque a redução/perda da cobertura florestal interfere em vários aspectos, tais como: alteração no clima, perda da biodiversidade, redução dos insumos naturais, assoreamento dos corpos d'água, enchentes, degradação do solo, processos erosivos, etc. Todas essas consequências afetam a atividade econômica e a integridade cultural das populações dependentes da floresta (ANGELSEN e KAIMOWITZ, 2001).

Em meados dos anos 80, com a realização de convenções e eventos em prol do meio ambiente, ficou evidente a preocupação de diversos representantes mundiais a respeito do aumento do desmatamento no mundo e as consequências do mesmo, sendo o aumento da emissão de gás carbônico umas das principais preocupações. A redução/perda das florestas levantou a possibilidade de consequências drásticas para o planeta, sendo elas: o aumento da temperatura, problemas nas atividades econômicas, aumento no nível do mar e redução de espécies vegetais e animais (TESCARI e VARGAS, 2007).

No Brasil, o desmatamento é um dos principais causadores do aumento na emissão de gás carbônico (CO²). Segundo dados do Inventário Brasileiro de Emissões, 77% das emissões de CO² em 2005 estão atrelados às mudanças do uso da terra e das florestas. O aumento de CO² está vinculado diretamente ao aumento do desmatamento na Amazônia e no Cerrado na década de 90 (Cabral, 2013). Além de o desmatamento ser importante para o aumento de carbono atmosférico, causa também a extinção de espécies devido à destruição do habitat e o deslocamento de moradores das florestas indígenas (DEACON, 1999).

De acordo com o *Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente-PNUMA* (2004), a erosão do solo causa diversos efeitos, tais como redução na capacidade de filtrar os poluentes, redução da biodiversidade no solo, desequilíbrio

nos processos de ciclo da água e ciclagem de nutrientes. Os principais tipos de degradação do solo são a erosão hídrica (56%), a erosão eólica (28%), a degradação química (12%) e a degradação física (4%).

A Convenção das Nações Unidas de Combate à Desertificação (UNCCD) define desertificação como “degradação da terra em áreas áridas, semi-áridas e subúmidas secas” causada por fatores como variações climáticas e atividades antrópicas. Cerca de 70% das terras secas do mundo estão nessas condições por estarem degradadas, essa porcentagem expressa em hectares nos dá o valor de 3,6 bilhões de área (PNUMA, 2004).

2.5 Programas de incentivo a proteção das florestas no Brasil

Nas décadas de 1960 a 1980, o Governo Federal realizou três programas de incentivos ao reflorestamento. No período de 1965 a 1988 foi realizado o Programa de Incentivos Fiscais ao Florestamento e Reflorestamento (PIFFR). Na segunda metade da década de 1970 foi implementada uma política de incentivo ao reflorestamento em pequenos e médios imóveis rurais (o REPEMIR); e, no período de 1985 a 1988 foi implementado um programa de reflorestamento com algarobeira no Nordeste semi-árido (o Projeto Algaroba) (BACHA, 2008).

Os três programas utilizaram recursos financeiros ou recursos materiais para incentivar os produtores rurais a realizarem o reflorestamento. Portanto, ficou claro que esses programas funcionavam como subsídio aos produtores, porém cada programa tinha um mecanismo diferente para conceder o subsídio (BACHA, 2008).

Em 2004 foi criado o Plano de Ação para a Prevenção e Controle do Desmatamento da Amazônia Legal (PPCDAM), esse programa surgiu como resposta as crescentes taxas de desmatamento na Amazônia. O objetivo do programa é promover a redução das taxas de desmatamento por meio de um conjunto de ações integradas de ordenamento territorial e fundiário, monitoramento e controle ambiental e o fomento a atividades produtivas sustentáveis. Todas essas ações serão executadas envolvendo parcerias entre órgãos federais, governos estaduais, prefeituras, entidades da sociedade civil e o setor privado (FUNDO AMAZÔNIA, 2004).

A Lei 12.187 (12/2009) criou a Política Nacional sobre mudança do clima (PNMC). Um dos objetivos dessa política é consolidar e expandir as áreas

protegidas e incentivar reflorestamentos. Além disso, essa lei oficializa o compromisso da COP16 que está relacionado à redução de emissões de Gases de Efeito Estufa (GEEs), tendo como meta reduzir entre 36,1% e 38,9% das emissões projetadas até 2020. Como ferramenta fundamental para a redução das emissões, uma das medidas é a redução de 80% do desmatamento da Amazônia em relação à média entre os anos de 1996 a 2005 e a redução de 40% do desmatamento no Cerrado, em relação à média entre os anos de 1999 a 2008 (CABRAL, 2013).

As florestas desempenham um importante papel na mitigação das mudanças climáticas e devido a isso foi criado na Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC) em Copenhague a **REDD+**, que tem a sigla traduzida para: **Redução de Emissões** provenientes de **Desmatamento e Degradação Florestal + Conservação dos estoques de carbono florestal**, manejo sustentável das florestas e aumento dos estoques de carbono florestal (May, Calixto, Gebara, 2011), que é um incentivo para recompensar financeiramente países em desenvolvimento por seus resultados de Redução de Emissões de gases de efeito estufa provenientes do Desmatamento e da Degradação florestal, considerando o papel da conservação de estoques de carbono florestal, manejo sustentável de florestas e aumento de estoques de carbono florestal (MINISTÉRIO do MEIO AMBIENTE, 2015).

Segundo May, Calixto, Gebara (2011), para competir financeiramente com os fatores determinantes do desmatamento, que são: uso da terra para produção agrícola, extração da madeira, crescimento de áreas urbanas, aberturas de estradas, etc.; o REDD+ estabeleceu um valor econômico para o carbono florestal que permita a conservação da floresta.

De acordo com May, Calixto, Gebara (2011):

A nível internacional, as preocupações sobre REDD+ entre os países em desenvolvimento incluem os possíveis impactos negativos no seu crescimento econômico e a perda de soberania nacional, enquanto as preocupações dos países desenvolvidos incluem o vazamento, a permanência e as implicações econômicas da inclusão de REDD+ dentre os mecanismos do mercado internacional de carbono.

O Brasil desempenha papel de destaque nas propostas da REDD+, pois é um país que apresenta grande vulnerabilidade para seus remanescentes florestais e

devido a isso, é um forte candidato a receber financiamento para proteger as florestas restantes (May, Calixto e Gebara, 2011). A Amazônia é o maior remanescente florestal contínuo no mundo, e vem sofrendo grande pressão do sistema agropecuário, que avança de forma acelerada sobre a floresta, provocando desmatamento em diversos estados. O Brasil a fim de conter o desmatamento, lançou alguns programas em prol das áreas florestadas. O REDD+ poderia ser uma ferramenta para financiar o compromisso de longo prazo do país de atingir o desmatamento líquido zero (MAY, CALIXTO, GEBARA, 2011).

2.6 Programas de incentivo a proteção das florestas no estado de São Paulo

O artigo 23 da Lei Estadual 13.798 de 2009, instituiu o Programa de Remanescentes Florestais, sendo que a Lei foi regulamentada pelo Decreto Estadual 55.947, de 24.06.2010. Essa Lei tem o objetivo de delimitar, demarcar e recuperar as matas ciliares e demais áreas com fragmentos florestais, dando incentivo por meio de pagamento dos serviços ambientais (PSA) prestados pelos proprietários rurais e também incentivos econômicos a aqueles que desenvolverem políticas voluntárias de redução de desmatamento (FUNDAÇÃO FLORESTAL, 2015).

O estado de São Paulo conta com diversos projetos na área de Pagamentos por Serviços Ambientais (PSA), sendo um deles lançado no ano de 2011 denominado de projeto Mina D'água a partir do Decreto nº 55.947, de 24 de junho de 2010, que tem o objetivo de proteger as mais de três mil nascentes que o estado tem e para isso o governo investiu mais de R\$ 3 milhões na fase piloto do projeto (SISTEMA AMBIENTAL PAULISTA, 2011).

Um dos mecanismos para ampliar as áreas de proteção no estado de São Paulo foi a criação do Programa Estadual de Apoio às Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN), que foi instituído pelo DECRETO ESTADUAL Nº 51.150, DE 3 DE OUTUBRO DE 2006. Segundo dados do Instituto Florestal (2010) o estado de São Paulo contava com uma área de vegetação natural de 4,34 milhões de hectares e desse total aproximadamente 77% dessas áreas estavam inseridas em propriedades particulares, sendo de vital importância que os proprietários protegessem essas áreas. Portanto, a criação de RPPN é uma ferramenta

importante na proteção da biodiversidade em terras paulistas (FUNDAÇÃO FLORESTAL, 2015).

2.7 Reflorestamento no Mundo

Os primeiros relatos que temos sobre plantios de florestas foi em 1580 na Inglaterra, quando o Burghley realizou o plantio de 5 hectares de floresta, no parque de Windsor. O plantio foi feito com o intuito de garantir madeira de boa qualidade e em quantidade suficiente para a construção de navios. Da mesma forma que os ingleses se preocuparam com a falta de madeira, os franceses também se preocuparam, e o Ministro Henrique IV ordenou que plantassem carvalhos em locais públicos e ao redor das estradas (LEÃO, 2000).

Em 1689 na França, a lei florestal foi aperfeiçoada por Colbert e o mesmo decretou que os proprietários das terras deveriam plantar 5% das suas áreas e quem o desobedece seria punido com multas. Porém, a lei não foi efetiva em muitas províncias e como na sequência houve a Revolução Industrial, a população aproveitou esse período de instabilidade e derrubou muitas árvores (LEÃO, 2000).

Segundo Leão (2000), diversos programas de reflorestamento foram criados no mundo no período após as guerras mundiais com o intuito de recompor as áreas devastadas durante o período dos conflitos.

Quando o reflorestamento atravessou as fronteiras do continente europeu, que até então era o que mais se preocupava com as questões envolvendo a escassez da madeira, observou-se o plantio de espécies exóticas de rápido crescimento em países como: Índia, Paquistão, Vietnã e Filipinas. Esses países começavam a produzir madeira para suprir as necessidades regionais e de outros países (LEÃO, 2000).

Dados recentes divulgados pelo Greenpace revelam a quantidade de áreas reflorestadas em diversos países do mundo. A França em 2010 apresentava 16 milhões de hectares em áreas reflorestadas, o que corresponde a 29% do território do país. Para reflorestar, a França recebe fundos da União Europeia para fornecer subsídios a proprietários de terras para o gerenciamento adequado das florestas e sua **biodiversidade**. A Alemanha apresentava 11,1 milhões de hectares reflorestados em 2010, o que corresponde a 32% da área do país. Assim como a França, a Alemanha recebe incentivo monetário da União Europeia para fornecer subsídios

aos proprietários de terra para o **gerenciamento de florestas**. A China que teve um histórico de anos desmatando, no ano de 2010 apresentava 261 milhões de hectares reflorestados, o corresponde a 22% da área total de seu território. Todas as florestas são propriedade do Estado, que é responsável também pela supervisão do setor. Em países como Japão, Suécia e Finlândia, a cobertura florestal é em torno de 69% do território nacional (PLANETA SUSTENTÁVEL, 2000).

2.8 Reflorestamento no Brasil

As primeiras iniciativas de conservação e reflorestamento surgiram no século XIX em 1861, com D. Pedro II, que nomeou Major Manuel Gomes Archer a realizar o plantio de mudas na área das matas da Tijuca que haviam sido devastadas e para isso foi necessário o plantio de 127 mil mudas, que foram plantadas por escravos em uma área equivalente a 32 km. Hoje essa área que foi plantada em 1861 é conhecida como Floresta da Tijuca (KAGEYAMA et al, 2003).

No Brasil os plantios florestais que iniciaram em 1900 no estado de São Paulo, tinham como principal cultivo o eucalipto, que tinha a finalidade de abastecer as ferrovias. Em 1950 o Brasil já era o país com a maior área plantada de eucalipto no mundo (LEÃO, 2000).

No início do século XX surgiram ainda que discretas preocupações com as áreas desmatadas foi então com o intuito de preservar as florestas no território brasileiro, que em 1911 foi criado o Instituto Florestal Brasileiro. Porém, somente a criação do instituto não garantiria a preservação das áreas florestadas, havia a necessidade de uma legislação pertinente e foi então que em 23 de janeiro de 1934 surgiu o primeiro Código Florestal Brasileiro, que embora fosse um avanço na preservação das florestas, continha muitas irregularidades e pouco enfoque nas questões relacionadas ao reflorestamento (MORETTO; CARVALHO; NODARI, 2010).

O art. 49 do Código Florestal, citado em parágrafo único, diz que:

As árvores abatidas, salvo as que já se estiverem renovando por brotação, serão substituídas por mudas da mesma espécie ou por outra essência florestal julgada preferível, devidamente selecionada,

sempre com o espaçamento que a técnica exige (Decreto n. 23.793, de 23 de janeiro de 1934).

Embora houvesse a exigência do reflorestamento das áreas desmatadas, na legislação não estavam claras quais as espécies que deveriam ser utilizadas para o reflorestamento. Sendo assim, a escolha pelas espécies de reflorestamento era baseada na sua facilidade de plantio, foi então que uma série de espécies exóticas foram introduzidas no Brasil, gerando inúmeros prejuízos com relação à biodiversidade, como por exemplo, alterações na cadeia trófica, alteração na relação entre plantas e polinizadores, mudanças na estrutura da comunidade vegetal (MORETTO; CARVALHO; NODARI, 2010).

Em 1965 surgiu o novo código florestal que se propunha a cobrir as brechas do código anterior. Uma boa parte da legislação refere-se ao controle do corte indiscriminado das áreas florestais do país. Nesse código foram criadas leis de incentivo ao reflorestamento com a liberação de crédito para aqueles que queriam exercer tal prática. Porém, não havia especificidades para quais espécies deveriam ser plantadas na área de reflorestamento e devido a isso o reflorestamento passou a ser feito com espécies exóticas e frutíferas (MORETTO; CARVALHO; NODARI, 2010).

A maior parte das florestas plantadas no Brasil são de eucalipto e de pinus (exóticas). O eucalipto é uma espécie originária da Austrália e foi introduzida no Brasil em 1907. Já o pinus, é uma árvore conífera e adapta-se a clima mais frio. Ambas as espécies mencionadas são usadas na produção de celulose, porém o pinus é utilizado em pequena escala (BACHA, 2008).

O reflorestamento no Brasil está vinculado a 5 principais agentes, sendo eles: empresas produtoras de celulose, empresas siderúrgicas, empresas de produtos sólidos de madeira, governos estaduais e pequenos produtores. As empresas de celulose, no geral detêm as mais altas produtividades no reflorestamento no Brasil, porém essa produtividade varia de região para região (BACHA e BARROS, 2004).

Assim como as empresas de celulose, as siderúrgicas e as empresas de madeira, também consomem uma grande quantidade de madeira em suas atividades. No caso das siderúrgicas, elas precisam da madeira para produzir o carvão, quando a produção é feita por madeira plantada, observa-se que as espécies utilizadas no cultivo são os eucaliptos. Diferente das empresas de celulose,

tanto as siderúrgicas quanto as empresas de madeira, utilizam em seus processos produtivos matéria prima de floresta plantada e matéria prima de floresta nativa (BACHA e BARROS, 2004).

2.9 Restauração florestal no Brasil

Os conceitos de reflorestamento e restauração muitas vezes são usados de forma inadequada, para tanto vamos distinguir esses dois conceitos, para que não haja interpretação equivocada. Nos parágrafos acima vimos o conceito de reflorestamento, que geralmente está atrelado ao plantio de espécies únicas tal como o eucalipto e que apresentam a finalidade de corte e posteriormente a comercialização de madeira. O conceito de restauração distingue-se do conceito de reflorestamento, pois restauração é o termo usado para a recomposição da área degradada, com espécies de plantas nativas e objetivando retornar essa área degradada o mais próximo possível da condição natural, ou seja, da área antes de sofrer a degradação.

As restaurações florestais feitas pelos governos estaduais e municipais são feitas com espécies nativas e exóticas e a finalidade desses plantios, pode ser recreativo, científico ou comercial. No caso do plantio recreativo, as áreas contempladas são parques (municipais, estaduais e federais) e vale ressaltar que as espécies plantadas nessas áreas não tem nenhum fim produtivo e/ou comercial. Os plantios científicos são feitos em estações experimentais, e ao contrário do recreativo, a partir de um grau de maturidade desse plantio, o mesmo pode ser comercializado. E por fim, os plantios comerciais, são aqueles feitos em hortos florestais (BACHA e BARROS, 2004).

2.10 Reflorestamento no estado de São Paulo

A recuperação de ecossistemas florestais degradados é um caminho cada vez mais perseguido dentro do atual quadro de redução das florestas paulistas. No entanto, os métodos aplicados para essa recuperação se fundamentam em ideias muito divergentes e em geral refletem objetivos também diversos (RODRIGUES e GANDOLFI, 1996).

A maior parte das áreas reflorestadas no estado é feita com espécies exóticas (pinus e eucalipto). Em trabalho realizado por Kronka et al (2003) há uma tabela que apresenta a evolução das áreas com reflorestamento em 4 períodos distintos.

Tabela : Estimativa preliminar do desmatamento ocorrido no Pantanal no período de 2008-2009, tendo como referência a área total do bioma de 151.313 km².

Período	Total de hectares reflorestados com eucalipto e pinus (ha)
1961 a 1962	372.900 hectares
1971 a 1973	641.420 hectares
1991 a 1992	812.523 hectares
1999 a 2000	770.000 hectares

Fonte: Adaptado KRONKA et al, 2003.

2.11 Restauração florestal no estado de São Paulo

A restauração florestal é feita com espécies nativas e vem crescendo ao longo dos anos devido às exigências na legislação. Dentre as exigências da legislação, podemos destacar a importância da restauração florestal em áreas protegidas, tais como: Área de Preservação Permanente e Área de Reserva Legal. No estado de São Paulo os proprietários de áreas rurais devem destinar 20% de sua área total para área de Reserva Legal e manter ou recuperar a vegetação nas beiras de rios, topos de morros e encostas.

No estado de São Paulo, a restauração segue as orientações da resolução SMA 32 (2014), que em seu Art. 1º estabelece diretrizes e orientações para a elaboração, execução e monitoramento de Projetos de Restauração Ecológica, além de critérios e parâmetros para avaliar seus resultados e atestar sua conclusão. A recomposição de florestas nativas tem sido uma das principais prioridades da política do meio ambiente no País. Dentro dessa tendência de preocupação com o

meio ambiente e de adesão a políticas públicas visando à sustentabilidade, foram criadas diversas leis de proteção e conservação do meio ambiente. Atualmente, empresários, fazendeiros, mineradoras, comerciantes etc., estão tendo que se adequar à legislação ambiental para não serem punidos com multas.

2.12 Métodos de Restauração Ecológica

Nos últimos 15 anos o acúmulo significativo de conhecimento sobre os processos envolvidos na dinâmica de formações naturais (tanto preservadas, como em diferentes graus e tipos de degradação), tem conduzido a uma significativa mudança na orientação dos programas de recuperação, que deixam de ser mera ampliação de práticas agronômicas ou silviculturas de plantios de espécies perenes, objetivando apenas a reintrodução de espécies arbóreas numa dada área, para assumir a difícil tarefa da reconstrução das complexas interações da comunidade, respeitando suas características intrínsecas, de forma a garantir a perpetuação e a evolução da comunidade no espaço e no tempo (RODRIGUES; LEITÃO FILHO, 2000).

Grandes empresas privadas e estatais do setor energético têm contribuído muito com o desenvolvimento de metodologias de recuperação de matas ciliares, principalmente através de projetos de revegetação das margens dos reservatórios de usinas hidrelétricas. Várias universidades e centros de pesquisas também desenvolvem ótimos trabalhos, gerando muitos modelos de recuperação de matas ciliares (MARTINS, 2001). Dentro desse cenário de desmatamento existem vários métodos que vêm sendo utilizados para a restauração de áreas degradadas e nesse contexto a qualidade dos métodos utilizados é fundamental para o sucesso na restauração da área.

Técnicas de Restauração

A restauração é definida como processo que auxilia o restabelecimento de um ecossistema que foi degradado, danificado ou destruído, visando aproxima-lo o máximo possível da condição original. Já a recuperação de áreas degradadas, termo muito difundido no Brasil é definido como um processo que visa levar áreas degradadas a uma condição produtiva e sustentável, sendo a revegetação uma das

estratégias utilizadas nesse processo (Silva, 2013). Ainda temos o termo reabilitação, que tem o objetivo de restaurar a produtividade da terra, sem a preocupação com a similaridade com o ecossistema original (KAGEYAMA et al, 2003).

De modo geral a diferença entre os três termos citados acima: restauração, recuperação e reabilitação, estão relacionadas à definição das metas e objetivos e o tempo necessário para atingi-los. A restauração exige longos prazos, já a recuperação e a reabilitação exige um tempo menor para atingir seus objetivos (KAGEYAMA et al, 2003).

Ao definir qual técnica utilizar na restauração deve se levar em consideração o funcionamento dos processos ecológicos dentro de uma comunidade. Portanto, é necessário que ocorra uma avaliação do potencial de regeneração que a área apresenta e assim refletir sobre as ações mais apropriadas na restauração ecológica de uma área degradada (TRES et al, 2007)

Um dos fatores mais importantes ao iniciar um processo de restauração, é observar se há fragmento florestal próximo a área a ser restaurada, pois estes fragmentos são fontes de propágulos para a regeneração natural, sendo um fator importante para a colonização do local e o início do processo de sucessão secundário. Dentro desse contexto, o banco e a chuva de sementes mostram como era a vegetação original antes da degradação e são indicadores do potencial de resiliência de uma comunidade (TRES et al, 2007).

Temos que levar em consideração que o banco de sementes é um sistema dinâmico e a quantidade de sementes presentes no solo depende de dois fatores: as entradas e saídas. As entradas ocorrem por meio da chuva de sementes, no qual os agentes dispersores exercem a função. “As saídas, por sua vez, podem ocorrer por respostas fisiológicas, geneticamente controladas, ligadas a estímulos ambientais (luz, temperatura, umidade etc.), ou ainda através da morte, perda da viabilidade ou predação das sementes” (GASPARINO et al., 2006).

Assim como o banco de sementes do solo, a serapilheira exerce papel fundamental na restauração de áreas degradadas e esses dois mecanismos apresentam vantagens de possibilitar que o local degradado seja restaurado por um ecossistema semelhante, com espécies que existiam na área antes de ser degradada (SOUZA et al. 2006).

Como vimos acima, existem algumas condicionantes que interferem nos processos de restauração e devido a isso temos que entender quais são as técnicas que podem ser aplicadas na recuperação das áreas degradadas, para que o objetivo seja atingido. Atualmente as técnicas mais conhecidas na restauração são: nucleação, transposição de galharia, transposição de solo, poleiros, banco de sementes, condução de regeneração natural e plantio de mudas.

Nucleação

A técnica de nucleação é entendida como a capacidade que as espécies têm em propiciar melhorias na qualidade ambiental, sendo assim facilitando a ocupação dessa área por outras espécies (Reis, et al., 2003). A partir dos núcleos, a vegetação secundária cresce e permite que a recuperação da área degradada seja mais rápida (Soares, 2009). Os sistemas de nucleação são ações de restauração ambiental com a função de imitar a natureza e seus processos (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

Algumas plantas pioneiras têm capacidade de promover nucleação e esse mecanismo é de extrema importância para os processos de revegetação de áreas degradadas (Reis et. al., 2003). Segundo Robinson e Handel (1993), através de seus estudos sobre técnicas de nucleação, eles observaram que os núcleos promoviam um incremento de espécies, propiciando o surgimento de novas espécies na paisagem e que podem vir a atrair mais espécies de aves dispersoras.

Espécies arbóreas em áreas isoladas podem desempenhar papel nucleador, tudo isso porque em áreas abandonadas ou pastos isolados, tais espécies funcionam como área de proteção, repouso ou alimento para aves e morcegos. As aves e os morcegos exercem o papel de dispersores de semente e isso contribui para o aumento do ritmo sucessional de áreas florestais secundárias (REIS, et. al., 2003).

Segundo estudo realizado na Ilha de Krakatau na Indonésia, o plantio de espécies arbóreas frutíferas é umas das formas mais rápida e eficaz de restaurar uma área, pois irá atrair diversas espécies dispersoras que irão formar núcleos de biodiversidade em áreas degradadas (REIS, et. al., 2003).

O sucesso na implantação de técnicas nucleadoras na comunidade dependerá de alguns fatores, tais como o grau de degradação da área, proximidade ou não de áreas menos impactadas que servem como suprimento de propágulos, o controle de espécies exóticas invasoras a existência de animais capazes de transportá-los e a existência de plantas mantenedoras de nutrientes durante todo o ano. As plantas envolvem-se em vários níveis de interação com animais e os polinizadores possuem um papel fundamental nos processos de restauração garantindo o fluxo gênico e a formação de sementes (TRES, 2006).

Transposição de galharias

A restauração feita através da transposição de galharia consiste em levar galhos, tocos, resíduos florestais, resíduos agrícolas (bagaço de cana e outros) ou amontoados de pedras dispostos na forma de núcleos ou aglomerados ao longo da área a ser restaurada. Os emaranhados dos restos vegetais servem como local de abrigo, repouso, ninhos e caça de pequenos animais. Nas regiões de acúmulo de galhos pequenos animais se escondem que é o caso dos cupins, alguns insetos, larvas e besouros (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

Além das funções citadas acima, a galharia atua na incorporação de matéria orgânica no solo (gerada pela decomposição do material) e pode criar condições adequadas à germinação e crescimento de espécies mais adaptadas aos ambientes sombreados e úmidos (REIS et. al., 2003).

Vale ressaltar que a técnica de transposição de galharia exige cuidado, pois o uso de restos vegetais oriundos de áreas urbanas, pode trazer exemplares de espécies exóticas, sendo que sementes podem estar aderidas a este material e se tornarem contaminantes na área em restauração (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

O solo é um sistema complexo, que abriga diversos seres vivos, minérios e matéria orgânica. E a interação entre esses elementos é observada em características do solo, tais como: fertilidade, capacidade de troca iônica, estrutura, etc (REIS et. al., 2003).

As algas exercem papel de colonizador primário no solo, além disso, as mesmas conseguem fixar carbono e nitrogênio através do processo de fotossíntese e fixação de nitrogênio. Após a função exercida pelas algas, o solo passa a ser habitado por outros microrganismos, como os fungos e as bactérias (REIS et. al., 2003).

Transposição dos solos

A degradação do solo, causa entre as diversas consequências à redução da matéria orgânica. E uma das formas de restaurar a área degradada é através da transposição do solo, onde pequenas porções de solo não degradados são transpostos para áreas degradadas, trazendo grandes possibilidades de recolonização da área com microrganismos, sementes e plântulas (REIS et. al., 2003).

A técnica de transposição dos solos funciona da seguinte maneira: retira-se cerca de 5 a 10 cm da camada superficial do solo e deposita essa porção nas áreas degradadas com a intenção de recompor o solo (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

As porções de solo transpostos formam aglomerados de vegetação que se destacam na paisagem como locais de abrigo para a fauna e produção de sementes. Essas porções passam a atuar como pequenos habitats (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

Poleiros

Os poleiros naturais e artificiais são usados como atrativos para aves e morcegos, que desempenham papel fundamental na dispersão de sementes. Com a presença de poleiros, esses exemplares de animais podem circular entre áreas fragmentadas e através das fezes e material regurgitado, as aves e morcegos depositam sementes nas áreas próximas aos locais de pouso (SOARES, 2009).

Os poleiros naturais são aqueles produzidos a partir do plantio de espécies arbóreas de rápido crescimento, podendo ou não ter frutos como atrativos e copa

favorável para o pouso. Os poleiros artificiais são feitos a partir de varas de madeira (bambu, eucalipto, árvore morta) e a ligação entre um poleiro e outro, pode ser feito a partir de cabo de aço (SOARES, 2009).

Condução de regeneração natural

A regeneração natural refere-se às fases iniciais de estabelecimento e desenvolvimento das plantas, sendo alguns fatores fundamentais para esse estabelecimento, tais como: as condições quantitativas e qualitativas dos regenerantes, a presença de fragmentos florestais ao redor da área a ser regenerada e o manejo adequado da mesma (GAMA et al, 2003).

Para que ocorra regeneração natural em uma área degradada é necessário que os causadores da degradação sejam controlados, como por exemplo: pastoreio e incêndio. Alguns fatores como a existência de fonte de propágulos, presença de dispersores, boas condições microclimáticas e edáficas, ausência de predadores e agentes antrópicos, contribuem para o estabelecimento das plântulas (FARIA et al., 2001).

A regeneração natural é a forma mais barata de restauração. Mas para que isso ocorra, a área a ser restaurada deve apresentar condições de se regenerar naturalmente, caso essa condição não ocorra recomenda-se o uso de outras técnicas de restauração, tal como o plantio de mudas.

Plantio de Mudas

As técnicas citadas acima são recentes e pouco utilizadas, sendo que o plantio de mudas continua sendo a técnica mais popular em recuperação de áreas degradadas (Jakovac, 2007). As florestas podem regenerar-se naturalmente, ou artificialmente pela ação do homem, através da semeadura diretamente no campo ou pelo plantio de mudas.

O plantio de mudas é responsável pela maioria dos reflorestamentos realizados no Brasil (Davide e Silva, 2008), e pode ser feito de diversas formas, pode ser através do plantio aleatório de mudas (feito por dois grupos de espécies de mudas, denominadas espécies de recobrimento e espécies de diversidade), plantio

em linha com espaçamento 2x2 ou 2x3 metros, plantio de mudas em grupos adensados, onde o espaçamento entre as mudas é pequeno.

O grupo de recobrimento (anteriormente definido como preenchimento) é constituído por espécies que possuem bom crescimento “e” boa cobertura de copa, proporcionando o rápido fechamento da área plantada. Nessa categoria incluem-se as espécies pioneiras e secundárias iniciais (RODRIGUES, BRANCALION, ISERNHAGEN, 2009).

O grupo de diversidade inclui-se as espécies que não possuem bom crescimento “e/ou” nem boa cobertura de copa, mas são fundamentais para garantir a perpetuação da área plantada, já que são as espécies desse grupo que irão gradualmente substituir as do grupo de recobrimento quando essas entrarem em senescência, ocupando definitivamente a área restaurada e garantindo sua condução de forma sustentável. Nessa categoria incluem-se as espécies secundárias iniciais, secundárias tardias e/ou climaxes (RODRIGUES et. al 2009).

Durante o plantio, é importante que as mudas plantadas sejam nativas e de preferência com frutos e sementes atrativos para a fauna, e que desempenham funções tais como: forrageiras, abrigo, fixadoras de nitrogênio, etc. Além das características citadas, é importante escolher espécies ameaçadas de extinção, de forma a garantir a preservação da diversidade biológica local (SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

Como vimos anteriormente, existem vários métodos para recuperação de áreas degradadas, porém, alguns autores sugerem que o plantio direto de mudas é a forma mais adequada para recuperação (SILVA, 2013).

No processo de restauração florestal feito a partir da técnica de plantio de mudas, leva-se em consideração a qualidade das mudas, visando garantir o sucesso da área a ser restaurada, porém alguns métodos complementares são de extrema importância para que as mudas consigam atingir a fase adulta. Podemos citar como métodos complementares o preparo do solo antes do plantio e a manutenção da área após o plantio.

O preparo do solo inclui limpar e descompactar o solo, na sequência é feito a calagem (adição de cálcio e magnésio) do solo, e depois a adubação de base que visa suprir as necessidades nutricionais da planta, geralmente a adubação é composta pelos nutrientes: NPK (nitrogênio, fósforo e potássio). Para o plantio,

visando garantir a sobrevivência das mudas em períodos de estiagem ou com pouca irrigação, é adicionado um produto que recebe o nome de hidrogel, que na verdade é um polímero hidroretentor. Ele exerce a função de reter a água, liberando-a aos poucos, garantindo a umidade do solo. Esse mecanismo faz com que as mudas que ainda não desenvolveram suas raízes para buscar a água em áreas mais profundas do solo, consigam sobreviver em períodos de seca (NAVROSKI et al, 2015)

Após o plantio, é necessário fazer o controle de ervas daninhas que competem com as mudas em busca dos nutrientes no solo, esse controle no geral é feito a partir da aplicação de herbicidas a base de glifosato. Realizar o controle de formigas cortadeiras que danificam as folhas das mudas, podendo retardar o desenvolvimento das mesmas e chegando a causar até morte das mudas. Além dos controles citados anteriormente, devem ser feitas as adubações pós plantio, que são chamadas de adubação de cobertura realizadas no período de 3 a 24 meses após o plantio.

Sabe-se que o alto custo dos processos de restauração torna-se um fator limitante e diante disso a busca por técnicas que reduzam o custo tornou-se objetivo de estudo de diversos pesquisadores. Dentre os mecanismos que auxiliam na redução dos custos da restauração, está o uso de espécies exóticas, que é um dispositivo que está embasado pela Lei **12.651/2012**. Segundo a Lei, a área recomposta com espécies exóticas não poderá exceder a 50% (cinquenta por cento) da área total a ser recuperada (**BRASIL, 2012**).

Durante o processo de restauração, uma das maiores preocupações quando utilizada a técnica de plantio de mudas é com relação à qualidade das mudas. Porém, pouco se sabe a respeito da interação dos microrganismos presentes no solo com a muda plantada e qual a importância dos mesmos no processo de restauração.

2.13 Microrganismos no solo

Estudos para dimensionar a quantidade de microrganismos presentes no solo vem aumentando cada vez mais, tudo porque ambientes como o solo são capazes de abrigar uma grande variedade de espécies. Diversas pesquisas apontam que os microrganismos podem estimular significativamente o crescimento, desenvolvimento e o metabolismo das plantas. Isso ocorre porque os microrganismos apresentam capacidade de produzir substâncias estimulantes do crescimento e substâncias com

ação de antibiose contra patógenos, promovendo a imunização das plantas e aumentando a absorção pelas raízes (IGNATOVA et al, 2013).

Alguns estudos apontam que há uma correlação entre a quantidade de leveduras (fungos) com a quantidade de nitrogênio e carbono no solo, sendo que a diversidade de leveduras encontrada no solo é proporcional à quantidade de nutrientes, tais como: Nitrogênio, Fósforo e Potássio (NPK). Os pontos positivos dos fungos no solo podem ser notados através de ações como: ciclagem de nutrientes e efeitos sobre o crescimento das plantas (BOTHA, 2011).

Bactérias

Alguns microrganismos apresentam potencial benéfico para as plantas e dentre esses microrganismos podemos destacar o papel importante das bactérias. As bactérias pertencentes ao gênero rizóbio desempenham a função solubilizadora de fosfato nas plantas (Souchie et al, 2005). As rizobactérias são bactérias promotoras do crescimento de plantas e são representadas pela sigla RPCP (Kloepper et al., 1989). Esse grupo de bactérias pode ser encontrado na rizosfera, na superfície ou nas raízes das plantas (AHMAD et al., 2008).

As bactérias do gênero rizóbio podem formar associações benéficas com as plantas leguminosas e essa associação possibilita a fixação do nitrogênio, que é um nutriente importante para as plantas. Além do gênero rizóbio, o gênero azotobacter também faz a fixação de nitrogênio através de uma associação não simbiótica. As bactérias solubilizadoras de fosfato auxiliam os fungos micorrizos a se estabilizarem nas plantas e também podem junto com os rizóbios, favorecer o crescimento de nódulos nas plantas (Souchie et al, 2005). Além da interferência no crescimento das plantas evidenciada nos parágrafos acima, as rizobactérias podem atuar também como inibidoras de microrganismos deletérios (DE LEIJ et al., 1995)

O crescimento das plantas se dá ao fato de que algumas bactérias são capazes de fixarem nitrogênio e essas bactérias são chamadas de diazotróficas (Hahn, 2013). As diazotróficas vêm sendo pesquisada devido ao seu potencial de aplicação na agricultura, pois em diversas culturas observou-se um aumento na produtividade a partir da aplicação das mesmas (PENG et al., 2002).

As bactérias fitopatogênicas estão distribuídas em vários gêneros, espécies e subespécies. Atualmente, são reconhecidos 26 gêneros de bactérias fitopatogênicas, sendo que representantes de muitos desses gêneros já foram encontrados no Brasil (ALMEIDA e MALAVOLTA, 2001).

Bactérias fitopatogênicas em condições ambientais favoráveis podem causar danos e perdas na qualidade e na produtividade das plantas, sendo que esses danos variam desde manchas em folhas, flores e frutos podendo chegar até a morte da planta. As bactérias sobrevivem em plantas infectadas, em restos culturais ou no solo, se reproduzem rapidamente e a transmissão pode acontecer do solo infectado para a planta, de uma planta para outra, pela irrigação e pelo deslocamento de pessoas entre áreas de plantio (ALMEIDA e MALAVOLTA, 2001).

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) e Fungos Ectomicorrízicos Arbusculares (FECM)

A associação simbiótica entre fungos e raízes de plantas superiores é chamada de “micorrizas”. Nesse tipo de associação os fungos disponibilizam elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas, como o fósforo, zinco, manganês e cobre, e as plantas fornecem para os fungos os carboidratos. Existem dois tipos de micorrizas, as endomicorrizas, quando os fungos vivem internamente nas células das raízes e as ectomicorrizas, quando estão presentes envolvendo as células de raízes, porém sem penetrá-la (SILVA e COELHO, 2006).

Segundo Oliveira et al (2005) os fungos desempenham inúmeras funções nas áreas de saúde, nutrição, agricultura, energia e meio ambiente. Os fungos participam de ações como a ciclagem de nutrientes no solo, na degradação de substâncias tóxicas, promovendo o crescimento de plantas pelo auxílio na absorção de nutrientes e no controle de patógenos.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são considerados grandes aliados nos processos de restauração de áreas degradadas, pois influenciam no crescimento e na adaptação das plantas no solo (Colodete et al, 2014). Os FMAs junto às raízes das plantas formam as micorrizas (Colodete et al, 2014). Esses fungos auxiliam as plantas na absorção de nutrientes do solo, principalmente o

fósforo, além disso, favorece o crescimento das mudas no campo e contribui para uma taxa maior de sobrevivência das mesmas.

Os Fungos Ectomicorrízicos Arbusculares (FECM) pertencem a diversas famílias dos filos Basidiomycota e Ascomycota (Souza et al, 2004). As ectomicorrizas predominam em plantas das seis famílias mais utilizadas em silvicultura no mundo (Souza et al, 2006). Os fungos ectomicorrízicos foram testados pela primeira vez no plantio de espécies vegetais fora de seus habitats naturais e em locais que apresentavam dificuldade para estabelecer áreas reflorestadas, devido à inexistência de fungos compatíveis com as espécies de plantas introduzidas (SOUZA et al, 2004).

As ectomicorrizas promovem o aumento na área de absorção radicular, e isso faz com que nutrientes como fósforo (P), nitrogênio (N) e potássio (K) e a água, sejam mais absorvidos. Devido a isso, as ectomicorrizas influenciam no crescimento das plantas, mesmo em locais que apresentam solo pobre e degradado. Outros benefícios provenientes das ectomicorrizas são a maior resistência a aumento de temperatura, a solos ácidos, a estresse hídrico, a patógenos da raiz e a substâncias tóxicas no solo (SOUZA et al, 2004).

O uso de ectomicorrizas eficientes na promoção do crescimento de mudas de plantas pode ser uma alternativa capaz de promover ganhos na produção e aumento da oferta de madeira, através de produção e uso de inoculantes em programas de controle de micorrização para reflorestamentos (CANTON, 2012).

Segundo Scabora (2011), a recuperação de áreas degradadas não está ligada somente à reconstituição florística, mas também em mecanismos que permitam que o sistema recuperado seja auto-sustentável, ou seja, que haja interação entre as plantas e os componentes bióticos. Dentre as interações significativas na recuperação, enfatiza-se a associação das plantas aos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Portanto, devido à importância dos fungos micorrízicos na recuperação de áreas degradadas, é necessário que haja estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de tolerância entre a associação dessas duas espécies (SCHNEIDER et al, 2012).

Estudos apontam que em diversas situações de degradação do solo, os FMAs apresentam grande importância na restauração das áreas degradadas (Zuquette et al. 2013). Estes estudos apontam que um dos efeitos dos FMAs é com relação ao

crescimento das árvores. No Brasil já foram feitos vários testes inoculando os FMAs nas espécies arbóreas usadas na restauração, assim como nos viveiros na produção de mudas.

Além dos fungos micorrízicos, outros fungos são utilizados para o crescimento de plantas, sendo um deles os dark septate, que são fungos ascomicetos com pigmentação escura e hifas. São fungos benéficos ao desenvolvimento de plantas, que atuam principalmente no crescimento vegetal de forma direta e indireta. Os dark septate são encontrados em várias regiões do mundo e até mesmo em ambientes estressantes, tal como solos pobres ou com pouca disponibilidade de água. Uma das vantagens desse fungo quando comparados com os FMAs, é que eles podem ser cultivados em meio de cultura, esse fato permite que os estudos sejam mais rápidos com relação ao potencial de crescimento das plantas que os mesmos exercem. O isolamento adequado de espécies de dark septate pode ser uma estratégia agrônômica na redução do uso de fertilizantes (TORRES JUNIOR, 2014).

A restauração de áreas degradadas é um processo lento, que envolve muito estudo e aprimoramento das técnicas envolvidas. A junção dos fungos com outros fatores bióticos e abióticos do solo pode ser uma ferramenta a mais na restauração de ambientes degradados (OLIVEIRA et al, 2009).

A relação entre os microrganismos, solo e planta conforme descrito nos parágrafos acima, pode ser uma ferramenta a mais nos processos de restauração. Portanto, conhecer mais sobre essas inter-relações, visando utilizar esses microrganismos como inoculantes, em prol da nutrição e do melhor estabelecimento de espécies arbóreas em áreas degradadas ou de difícil estabelecimento, como nas pastagens, pode ser um mecanismo importante no sucesso da restauração (SOUCHIE et al, 2005).

Efeitos Negativos

Os fungos podem ser bastante prejudiciais para as plantas lhes causando diversos tipos de doenças. A quantidade de fungos que podem causar doenças chega a mais de 8.000 espécies, sendo que esses fungos patógenos podem atacar um ou mais tipo de plantas. Esses patógenos podem causar danos e perdas na qualidade e na produtividade das plantas. Entre as ocorrências de doenças fúngicas

no Brasil, destacam-se as manchas foliares e ferrugens, murcha, podridão, cancro, oídios e míldios (RUSSOMANNO e KRUPPA, 2010).

2.14 Análise Molecular

A diversidade dos microrganismos e o seu papel na natureza ainda é pouco explorado devido à dificuldade de cultivo da maior parte dos mesmos, sendo que apenas 1% do total de microrganismos presentes na natureza pode ser cultivado e isolado em meio de cultura, pois pouco se sabe sobre as condições ideais de cultivo da maioria desses microrganismos (Moreira, 2015). O uso da análise molecular tem resultado em sérias mudanças na taxonomia dos fungos nestes últimos anos, possibilitando uma classificação mais precisa (RUIVO, 2005).

A utilização das análises moleculares (extração de DNA, PCR, sequenciamento) vem sendo aprimoradas nas últimas décadas, e o uso dessas análises no estudo de população microbiana, é um grande avanço na identificação dessas espécies, pois permitiu a descoberta de novos grupos de organismos que até então não haviam sido cultivados. Os métodos convencionais apresentam limitações na identificação dos microrganismos, pois é baseado no cultivo em meio de cultura e isolamento dos microrganismos e muitas vezes não apresentam os resultados reais (FASANELLA, 2012).

Técnicas moleculares desenvolvidas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o sequenciamento de DNA, têm sido ferramentas úteis na identificação de vários organismos, dentre eles os fungos. Entre os marcadores moleculares utilizados para este propósito destaca-se o sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer), que separa os genes 18S e 28S do rDNA e que pode ser amplificada com primers específicos ancorados nessas duas regiões (BARBOSA et al., 2013).

As técnicas moleculares utilizadas nos estudos de microrganismos são baseadas na diferença de composição dos genes ribossômicos. O sequenciamento do gene (18S rRNA) ou regiões intergênicas ribossomais (ITS) é o mais utilizado na identificação dos fungos, pois apresentam regiões conservadas e variáveis nesta região do genoma. Através dessa técnica é possível identificar gênero e até mesmo espécies, e também correlacionar o genótipo com o ambiente estudado. Essa

técnica proporcionou avanços da descrição dos fungos nos mais diversos ambientes (FASANELLA, 2012).

Microrganismos retirados de amostras ambientais e isolados em meios de cultura, são diferentes daqueles mais frequentemente encontrados após a PCR e o sequenciamento do gene do 18S rRNA. O PCR é um importante método que permite amplificar genes específicos (REIS JUNIOR et al, 2002).

A pesquisa de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em solo apresentam obstáculos com relação à identificação das espécies, principalmente quando os fungos estão em forma de micélios. Porém, com o avanço da tecnologia e a utilização da biologia molecular na caracterização dos FMAs, possibilitou grandes avanços com relação à filogenia, ecologia, genética e evolução deste grupo de fungos (Souza, 2005). O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, para a pesquisa com FMA, têm permitido identificá-los dentro e fora das raízes (NOVAIS; SOUZA; SIQUEIRA, 2010).

3. Objetivo Geral

Avaliar os microrganismos presente no solo através de técnicas de biologia molecular e correlacionar estes fatores com o sucesso das mudas plantadas em cada ponto.

3.1 Objetivo Específico

- Identificar as principais espécies de fungos presentes no solo;
- Identificar a estrutura espacial dessa comunidade.

4. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Aguas (ANA). **Redução das áreas Florestais**. Disponível em: <<http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2015.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. **Screening of free-living rhizosferic bacteria for their multiple plant growth promoting activities.** Microbiological Research, Jena, v.163, n.2, p.173-181, 2008.

Almeida, I.M.G.; Malavolta Jr, V.A. **Principais doenças bacterianas e controle.** In: Imenes, S.D.L.; Alexandre, M.A.V. (Eds.). Pragas e doenças em plantas ornamentais. São Paulo: Instituto Biológico, 2001.

Angelsen, A., Kaimowitz, D. **Introduction: the role of agricultural technologies in tropical deforestation** . In: A. Angelsen, D. Kaimowitz (eds.). Agricultural technologies and tropical deforestation. Wallingford, Oxon, UK, Wallingford, Oxon, UK, p. 1-17, 2001.

Bacha, C.J.C.; Barros, A.L.M. **Reflorestamento no Brasil: evolução recente e perspectivas para o futuro.** Scientia Forestalis, n°66, p.191-203, 2004.

Bacha, C.J.C. **ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DO REFLORESTAMENTO NO BRASIL.** Rev. de Economia Agrícola, São Paulo, v. 55, n. 2, p. 5-24, 2008.

Barbosa, R.N. et al. **Utilização da região ITS na identificação de Aspergillus isolados em solos de Caatinga.** Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R1227-1.pdf>> Acesso em: 31 de janeiro de 2016.

Beltrame, T.P. **Restaurando a Ecologia na Restauração: avaliação de sistemas agroflorestais e espécies leguminosas em plantios de restauração ecológica.** Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós”. Curso de Pós Graduação em Ciências. Piracicaba-SP, 2013.

Botha, A. **The importance and ecology of yeasts in soil.** Soil Biology and Biochemistry, 43(1), p. 1–8, 2011.

BRASIL. **Decreto nº 23.793, 23 de janeiro de 1934.** Aprova o Código Florestal que com este baixa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 mar. 1935. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d23793.htm> Acesso em: 15 de abril de 2016.

Cabral, C.S.R. **Impactos econômicos da limitação do desmatamento no Brasil.** Ribeirão Preto, 2013.

Canton, G. C. **Efeito do manganês sobre a ecofisiologia e bioquímica de ectomicorrizas.** 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade de Vila Velha, Vila Velha, ES, 2012.

Colodete C.M, Dobbss L.B, Ramos A.C. **Aplicação das micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas.** Natureza on line 12 (1): p. 31-37, 2014.

Davide, A.C; Da Silva, E.A.A. **Produção de Sementes e Mudanças de espécies florestais.** Lavras-MG: Ed. UFLA, p. 174, 2008.

Deacon, R.T. **Deforestation and Ownership: Evidence from Historical Accounts and Contemporary Data**. Land Economics, Vol. 75, No. 3, p. 341-359, 1999.

De LEIJ, F.A.A.M. et al. **Field release of a genetically modified Pseudomonas fluorescens on wheat: establishment, survival and dissemination**. Bio/Technology, v.13, p.1488-1492, 1995.

FAO. **International online conference on the economics of climate change mitigation options in the forest sector**, Rome 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5170e.pdf>. Acesso em: 17 de abril de 2016.

FARIA, H. H.; SÉRGIO, F. C.; GARRIDO, M. A. O. **Recomposição da vegetação ciliar integrada à conservação de microbacia**. Revista do Instituto Florestal, n.21, p.1-22, 2001.

Fasanella, C.C. **Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós”. Curso de Pós Graduação em Ciências. Piracicaba-SP, 2012.

Fundo Amazônia. **PPCDAM**. Disponível em: http://www.fundoamazonia.gov.br/FundoAmazonia/fam/site_pt/Esquerdo/fundo_amazonia1.html. Acesso em: 17 de abril de 2016.

Fundação Florestal. **Programa de Remanescentes Florestais**. Disponível em: <http://fflorestal.sp.gov.br/>. Acesso em: 17 de abril de 2016.

Fundação Florestal. **Programa Estadual de Apoio às Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN)**. Disponível em: <http://fflorestal.sp.gov.br/>. Acesso em: 17 de abril de 2016.

Gama, J.R.V. et al. **Estrutura e Potencial Futuro de Utilização da Regeneração Natural de Floresta de Várzea Alta no Município de Afuá, Estado do Pará**. Ciência Floresta, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 71-82, 2003.

Gasparino, D. et al. **QUANTIFICAÇÃO DO BANCO DE SEMENTES SOB DIFERENTES USOS DO SOLO EM ÁREA DE DOMÍNIO CILIAR**. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.30, n.1, p.1-9, 2006

Hahn, L. **Promoção de Crescimento de Plantas Gramíneas e Leguminosas Inoculadas com Rizóbios e Bactérias Associativas**. Tese de doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós- Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. p. 175, 2013.

Ignatova, L. V.; et al. **Biodiversity of Micromycetes Isolated from Soils of Different Agricultures in Kazakhstan and Their Plant Growth Promoting Potential**. International Scholarly and Scientific Research & Innovation, v.7, n.7, 2013.

INPE. **Degradação na Amazônia.** Disponível em: <http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=3687>. Acesso em: 02 de abril de 2016.

Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente / Instituto Florestal Imprensa Oficial, 2005.

Jakovac, A.C.C. **O uso do banco de sementes florestal contido no topsol como estratégia de recuperação de áreas degradadas.** Dissertação (Mestrado) apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, 2007.

Kageyama, P.Y., Gandara, F.B., Oliveira, R.E. **Biodiversidade e restauração da floresta tropical.** In: Kageyama et al. Restauração Ecológica de Ecossistemas Naturais. Botucatu, FEPAF, p. 29-48, 2003.

Kloepper, J.W.; Lifshitz, R.; Zablutowicz, R.M. **Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity.** Trends Biotechnology, v.7, p.39-43, 1989.

Kronka, F.J.N.; et al. **Levantamento da vegetação natural e caracterização de uso do solo no estado de São Paulo.** Anais XI SBSR, Belo Horizonte, Brasil, INPE p. 2779-2785, 2003.

Leão, R.M. **A Floresta e o homem.** São Paulo: Editora da Universidade de SaoPaulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2000.

Lei nº 12.651, 25 de maio de 2012. **Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 mai. 2012. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12651.htm> Acesso em: 15 de abril de 2016.

Macedo, A. C. **Produção de Mudanças em viveiros florestais: espécies nativas.** São Paulo: Fundação Florestal, 1993.

MARTINS, S.V. **Recuperação de Matas Ciliares.** 1 ed. Viçosa : Ed. Aprenda Fácil, p. 12, 2001.

May, P.H., Calixto, B. e Gebara, M.F. 2011 **A política de REDD+ na mídia: um estudo de caso do Brasil.** Documento de trabalho 66. CIFOR, Bogor, Indonesia, 2011.

Meister,K.; Salviati, V. **O Investimento Privado e a Restauração da Mata Atlântica no Brasil.** Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, vol.2, nº2, 2009

Ministério do Meio Ambiente. **Áreas Desmatadas.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

Ministério do Meio Ambiente. **REDD+.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/>>. Acesso em: 10 de março de 2016.

Moreira, G. A. M. **Diversidade genética e funcional de leveduras presentes em solos de mineração e áreas do entorno.** Dissertação (Mestrado) em Biologia Microbiana do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana. Brasília-DF, 2015.

Moretto, S.P.; Carvalho, M.M.X.; Nodari, E.S. **A Legislação Ambiental e as Práticas de Reflorestamento em Santa Catarina.** V Encontro Nacional da Anppas 4 a 7 de outubro de 2010 Florianópolis - SC – Brasil.

Navroski, M. C. et al. **Influência do Hidrogel no Crescimento e no Teor de Nutrientes das Mudras de Eucalyptus dunni.** Floresta, Curitiba, PR, v. 45, n. 2, p. 315 - 328, 2015.

Novais, C.B.; Souza, F.A.; Siqueira, J.O. **Caracterização fenotípica e molecular de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mantidos em banco de germoplasma.** Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.45, n.8, p.806-896, 2010.

Oliveira, J.R.G et al. **O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba.** Revista Brasil. Bot., V.32, n.4, p.663-670, 2009.

Oliveira, C.A et al. **Otimização da Metodologia de Extração e Amplificação do DNA de Fungos do Solo.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005.

PENG, S.; BISWAS, J.C.; LADHA, J.K. et al... **Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice.** Agronomy Journal, n. 94, p. 925 – 929, 2002.

Planeta Sustentável. **Como o mundo protege suas florestas.** Disponível em: <<http://planetasustentavel.abril.com.br/noticia/ambiente/como-mundo-protege-suas-florestas-686195.shtml?func=2>>. Acesso em: 17 de abril de 2016.

PNUMA. **Perspectivas do Meio Ambiente no Mundo GEO-3.** Disponível em: http://www.wiiuma.org.br/geo_mundial_arquivos/cap2_%20terra.pdf. Acesso em: 17 de abril de 2016.

REIS, A.; BECHARA, F.C.; ESPÍNDOLA, M.B.; VIEIRA, N.K.; SOUZA, L.L. **Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais.** Natureza e Conservação. v.1, n.1, p.28-36, 2003.

Robinson, G.R.; Handel, S.N. **Forest Restoration on a closed landfill rapid addition of new species by bird dispersal.** Conservation Biology 7:271- 278, 1993.

Rodrigues, R.R.; Brancalion, P.H.S.; Isernhagen, I. (Org.). **Pacto pela restauração da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal.** São Paulo: LERF/ESALQ, Instituto BioAtlântica, 2009.

Rodrigues, R.R.; et al. **On the restoration of high diversity forests: 30 years of experiences in the Brazilian Atlantic Forest.** Biological Conservation, Essex, v. 142, n. 6, p. 1242-1251, 2009.

Rodrigues, R. R.; Leitão. Filho, H. F. **Matas ciliares: conservação e recuperação.** São Paulo: EDUSP, FAPESP, p. 320, 2000.

Rodrigues, R.R.; Gandolfi, S. **Recomposição de florestas nativas: princípios gerais e subsídios para uma definição metodológica.** Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v.2, n.1, p.4-15, 1996.

Ruivo, C. C. C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, Parque Estadual da Serra do Mar- Núcleo Picinguaba, São Paulo.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. Rio Claro, 2005.

Russomanno, O.M.R.; Kruppa, P.C. **Doenças fúngicas das plantas medicinais, aromáticas e condimentares.** Instituto Biológico, v. 72, n. 1, p.31-37, 2010.

Santilli, M.; Moutinho, P. **O desmatamento na Amazônia e a efetividade do Protocolo de Quioto.** Revista Ciência & Ambiente, (30), no prelo, 2006.

São Paulo. **Resolução SMA-32**, de 03 de abril de 2014. Estabelece as orientações, diretrizes e critérios sobre restauração ecológica no Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/resolucoes-sma/resolucao-sma-32-2014/>>. Acesso em: 15 de abril de 2016.

São Paulo. **Decreto nº 55.947**, de 24 de junho de 2010. Dispõe sobre o Projeto Mina D'agua. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/wpcontent/uploads/resolucao/2010/2010_res_est_sma_123.pdf> Acesso em: 15 de abril de 2016.

São Paulo. **Decreto nº 51.150**, 3 de outubro de 2006. Dispõe sobre o reconhecimento das Reservas Particulares do Patrimônio Natural. Disponível em: <http://licenciamento.cetesb.sp.gov.br/legislacao/estadual/decretos/2006_Dec_Est_51150.pdf>. Acesso em: 15 de abril de 2016.

Scabora, M. H. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de cerrado degradado em processo de revegetação.** Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, p.133, 2011.

Schneider, J.; et al. **Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio.** Quim. Nova, v. 35, n. 4, p. 709-714, 2012.

Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. **Restauração ecológica: sistemas de nucleação.** 1. ed. – São Paulo : SMA, p. 63, 2011.

Silva, D. K. A. **Diversidade e ecologia de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de dunas e restingas naturais e revegetadas após atividade de mineração no município de Mataraca, Paraíba/** Danielle Karla Alves da Silva– Recife: O Autor, p. 140, 2013.

Silva, R.R.; Coelho, G.D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Instituto de Botânica– IBt. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, 2006.

Sistema Ambiental Paulista. **Projeto Mina D'água.** Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/?s=projeto+Mina+D%E2%80%99agua>>. Acesso em: 15 de abril de 2016.

Soares, S. M.P. **Técnicas de Restauração de Áreas Degradadas.** Programa de Pós Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação dos Recursos Naturais, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2009.

SOS Mata Atlântica. **Deflorestamento.** Disponível em: <<https://www.sosma.org.br>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

Souchie, E. L. et al. **Mudas de Espécies Arbóreas Inoculadas com Bactérias Solubilizadoras de Fosfato e Fungos Micorrízicos Arbusculares.** Floresta, Curitiba, PR, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

Souza, P. A. et al. **Avaliação do banco de sementes contido na serapilheira de um fragmento florestal visando recuperação de áreas degradadas.** Cerne, Lavras, v. 12, n. 1, p. 56-67, 2006.

Souza, V.C et al. **Estudos sobre fungos micorrízicos.** Rev. bras. eng. agríc. ambient. vol.10 no.3 Campina Grande, 2006.

Souza, F. A. et al. **Identificação Molecular e Caracterização da Diversidade de Espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares do Gênero Gigaspora por PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 51, 2005.

Souza, L.A.B. et al. **Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.39, n.4, p.349-355, 2004.

Sugai, M. A. A. **Crescimento inicial de espécies arbóreas nativas associadas a fungos micorrízicos arbusculares para recuperação de áreas degradadas --** Palmas, 2007.

Tescari, A. S.; Vargas, E. V. **A biodiversidade como recurso estratégico: uma reflexão do ângulo da política externa.** Dossiê CEBRI, Ano 6, v. 2, 2007.

Torres Junior, C. V. **Influencia dos fungos dark septate sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz e tomate.** Dissertação de mestrado.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós Graduação em Agronomia- Ciência do Solo. Seropédica-RJ. 2014.

Tres, D.R et al. **Banco e Chuva de Sementes como Indicadores para a Restauração Ecológica de Matas Ciliares**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 309-311, 2007.

Tres, D.R. **Tendências da restauração ecológica baseada na nucleação**. In: MARIATH, J.E.A & SANTOS, R.P (orgs). Os avanços da botânica no século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. Sociedade Botânica do Brasil. 2006.

Zuquette L.V. et al. **Recuperação de áreas degradadas**. Revista Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia e Gestão 13: p.589-619, 2013.

CAPITULO II

Estrutura e composição das comunidades de fungos, em solos de uma área em restauração ao redor da UHE Promissão/SP.

RESUMO

O sucesso da restauração ecológica normalmente está atrelado ao desenvolvimento e sobrevivência das plantas cultivadas, porém pouco se sabe sobre a interferência dos heterotróficos, tais como os fungos. Para analisar a diversidade fúngica de uma área em restauração com mudas nativas, foram coletadas amostras de solos da área e posteriormente a mesma foi submetida a análises moleculares. Após a coleta dos solos, estes foram submetidos à extração de ácidos nucleicos totais. O DNA total obtido foi quantificado e submetido à técnica de Nested-PCR, onde foram obtidos fragmentos de DNA correspondendo a região ITS. Um total de 44939 sequencias foram geradas. A análise dos dados mostrou a ocorrência de 339 *Operational Taxonomic Units* (OTUs) de fungos do solo, com predominância do filo ascomiceto. O solo da região de Mendonça apresentou grande diversidade de fungos. Os gêneros *Cladosporium* e *Yarrowia* foram encontrados com frequência na maior parte dos pontos amostrados. Observamos a presença, mesmo em quantidades bem abaixo da maioria dos fungos, do fungo micorrízico arbuscular, *Glomus* sp. As análises de dados foram feitas estimadas na diversidade alfa e beta em Community Membership e Community Structure, utilizando os índices Jaccard, Distância Euclidiana, UNIFRAC e Bray-curtis. Os resultados das amostras de solo mostraram uma elevada correlação entre a diversidade Beta e a distância geográfica. Concluiu-se que a comunidade de fungos do solo do município de Mendonça, apresentou grande diversidade e que existem agregações de

comunidades fungais, ou seja, os fungos não estão aleatoriamente distribuídos pela área do plantio.

Palavras-chave: ITS 2, Nested-PCR, Fungos, Diversidade Alfa, Diversidade Beta.

Abstract

The success of ecological restoration is linked to the development and survival of cultivated plants, but little is known about the interference of heterotrophs such as fungi. To analyze the fungal diversity of an area restored with native seedlings, soil samples were collected and submitted to molecular analyzes. These were subjected to the extraction of total nucleic acids. The total DNA obtained was quantified and submitted to the Nested-PCR technique, where DNA fragments corresponding to the ITS region were obtained. A total of 44939 sequences were generated. Data analysis showed the occurrence of 339 soil fungus Operational Taxonomic Units (OTUs), with predominance of the ascomycete phylum. The soil of the Mendonça region presented high fungal diversity. The genera *Cladosporium* and *Yarrowia* were found frequently in most of the points sampled. Although relatively low in abundance, we also observed the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus* sp. Data analyzes were undertaken for alpha and beta diversity. The latter used Community Membership and Community Structure, with indices for Jaccard, Euclidian Distance, UNIFRAC and Bray Curtis. The results from soil samples showed a high correlation between Beta diversity and geographic distance. It was concluded that the soil fungal community in the municipality of Mendonça presented high diversity, and that there are aggregations of fungal communities, that is, the fungi are not randomly distributed by the plantation area.

Keywords: ITS 2, Nested-PCR, Fungi, Alpha diversity; Beta Diversity.

1. Introdução

O sucesso da restauração ecológica normalmente está atrelado ao desenvolvimento e sobrevivência das plantas cultivadas, porém pouco se sabe sobre a interferência dos heterotróficos, tais como os fungos. Embora o monitoramento do desenvolvimento das plantas seja importante, outros componentes dos ecossistemas também podem ser avaliados e fornecer informações importantes a respeito da área restaurada (AVIS, 2016).

Os fungos desempenham diversas funções nos ecossistemas, tais como a decomposição e ciclagem de nutrientes e podem ser avaliados como componentes de biodiversidade no solo. A avaliação dos fungos em áreas de restauração pode ser um elemento crítico na determinação do sucesso da área restaurada (Harris, 2009). Os microrganismos do solo recentemente se tornaram um foco para a ecologia da restauração e pesquisas sobre as interações entre microrganismos e plantas em ecossistemas degradados e não degradados começou a produzir resultados interessantes.

Nas práticas de silvicultura o uso de microrganismos tornou-se frequente nas últimas décadas, pois os efeitos benéficos dos mesmos podem ser observados em campo, principalmente nas extensas áreas de plantio de pinus e eucalipto. Embora na silvicultura essa metodologia seja aplicada há alguns anos, pouco se sabe a respeito do uso de microrganismos nas áreas de reflorestamento com espécies nativas.

O sucesso do plantio das espécies florestais em grande escala, como pinus e eucalipto dependem da sobrevivência e do estabelecimento das mudas no campo. Em regiões tropicais os solos apresentam algumas deficiências, como a baixa fertilidade, sendo que a presença de fungos como as micorrizas são fundamentais para o desenvolvimento das plantas e a recuperação das áreas degradadas (CHU et al, 2004).

Siqueira et al (1994) avaliou a resposta de espécies arbóreas nativas do sudeste brasileiro, com relação a inoculação de FMAs. As espécies inoculadas pertenciam a dois grupos sucessionais: pioneiras e secundárias. No total foram avaliadas trinta e uma espécies. Observou-se que as espécies pioneiras apresentaram melhores resultados para a inoculação de FMAs quando comparadas as espécies secundárias.

Embora os fungos micorrízicos arbusculares apresentem benefícios para o crescimento das plantas, eles apresentam algumas limitações, sendo a principal o desenvolvimento apenas em raízes vivas e este fato limita a sua aplicação em larga escala nos plantios, pois não há inoculantes comerciais padronizados oficialmente e que apresentem controle de qualidade (CALDEIRA et al, 1997).

Como vimos nos parágrafos acima, inúmeros são os estudos feitos com a inoculação de ECM, FMA em mudas de arvores nativas e espécies de silvicultura (pinus e eucalipto), visando à promoção do crescimento das mesmas. Porém, com relação a outros tipos de fungos pouco se sabe sobre a interferência dos mesmos no desenvolvimento das mudas em campo.

Um dos fatores que limita a descoberta dos microrganismos no solo e sua possível aplicação em escala comercial, é que ainda temos o uso dos métodos convencionais de identificação de microrganismos e esse método apresenta grandes limitações. Foi então que se observou a necessidade de aprimorar novas técnicas que passaram a utilizar os ácidos nucleicos para a identificação dos microrganismos. As limitações no uso dos métodos convencionais ficaram ainda mais evidentes em estudos voltados para a diversidade de microrganismos em ambiente específicos (REIS JUNIOR et al, 2002).

Estudos recentes apontam que a diversidade microbiana pode ser usada como indicador da qualidade do solo e além disso, é consenso que a diversidade microbiana possui importantes vantagens para o solo. O método molecular de estudo da diversidade microbiana é baseado em sequencia do DNA, em específico o gene 16S rDNA em bactérias, e 18S rDNA em fungos. Essa sequencia é amplificada pelo método de PCR e posteriormente é feito o sequenciamento, então obtém se os resultados da comunidade microbiana (ZILLI, 2003).

O gene 18S rDNA ou as regiões intergênicas ribossomais (ITS) do DNA ribossômico são amplamente usados como marcadores moleculares para fungos devido a presença de regiões conservadas e variáveis nesta região do genoma, além de ter um grande número de sequencias disponíveis em banco de dados (FASANELLA, 2012).

A utilização das técnicas moleculares na identificação de microrganismos no solo vem sendo aprimorada e recentemente o uso da metagenômica para a

identificação de genomas inteiros presentes em uma amostra de solo, permite uma avaliação mais detalhada destes microrganismos. O sequenciamento metagenômico é um grande avanço, pois fornece dados suficientes para a identificação da diversidade da comunidade microbiana. Porém, para o sucesso do sequenciamento metagenômico é necessário que as amostras sejam coletadas adequadamente, a extração de DNA seja eficaz, assim como a clonagem, a seleção das espécies e o sequenciamento (MESQUITA, 2011).

Técnicas de sequenciamento começaram a ser comercializadas em 2005 e com o decorrer dos anos evoluíram significativamente. A técnica de sequenciamento de DNA permite gerar a informação sobre milhões de pares de base em apenas uma única corrida. A plataforma de sequencia 454 FLX da Roche possui ampla utilização em todo o mundo e quando comparada com plataformas antigas tal como o Sanger, apresenta vantagens como a economia de tempo e de custos. A utilização desses sequenciadores vem promovendo grandes avanços na descoberta de comunidades microbianas em diferentes ambientes (CARVALHO e SILVA, 2010).

O objetivo do presente trabalho é a avaliação da diversidade fúngica no solo e sua função no desenvolvimento de plantios de espécies nativas em projetos de restauração florestal em APP's (Área de Preservação Permanente).

2. Metodologia

2.1 Caracterização da área

O estudo foi desenvolvido no município de Mendonça, em uma área de concessão da AES-TIETÊ. Mendonça está localizada a uma latitude 21°10'00" sul e a uma longitude 49°34'51" oeste, estando a uma altitude média de 483 metros (<http://www.mendonca.sp.gov.br>).

A fitofisionomia do município é caracterizada pela presença de Capoeira, Cerrado, Cerradão, Vegetação de Várzea e áreas de reflorestamento. Os solos são característicos de cerrado (AMBIENTESP, 2015).

Mendonça é circundada por grande parte pela Represa de Promissão e Represa Nova Avanhandava, ambas pertencem a AES-TIETÊ. O clima de ocorrência na região, segundo a classificação de Köppen é o AW, sendo a

temperatura média anual em torno de 23,2°C, o clima é caracterizado como tropical chuvoso com inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18°C. O mês mais seco tem precipitação inferior a 60mm e com período chuvoso que se atrasa para o outono e a quantidade de chuva média anual é em torno de 1.322,8mm (CEPAGRI-UNICAMP, 2015).

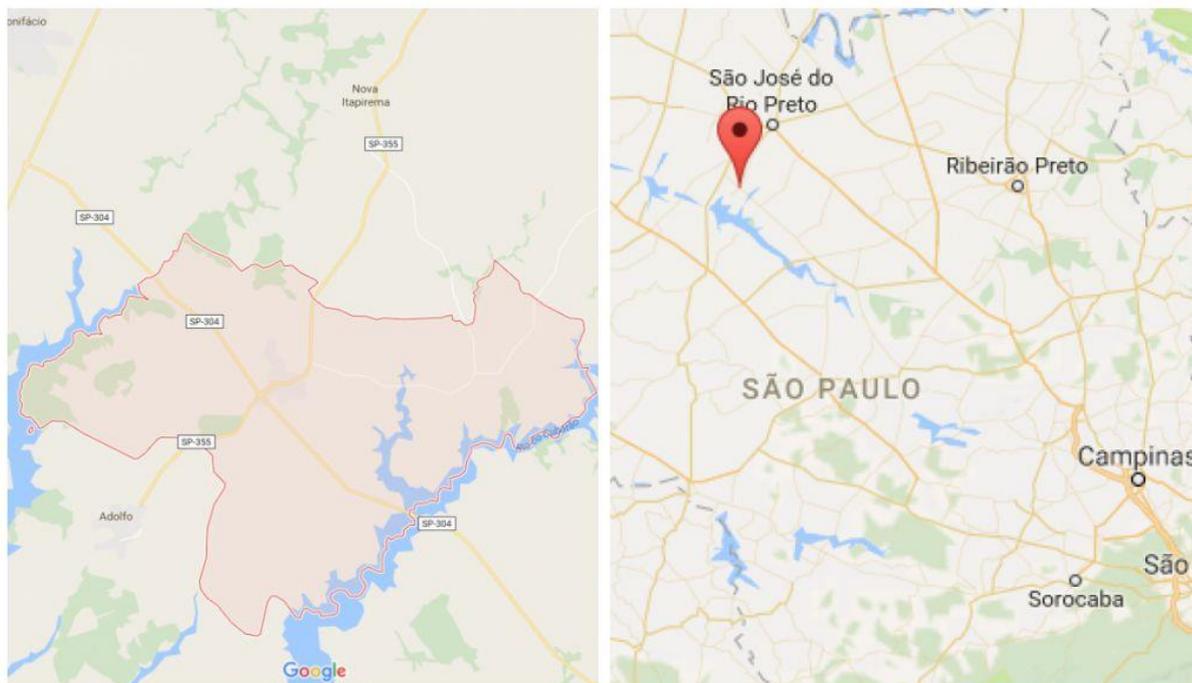


Figura 1: Localização do município de Mendonça no estado de São Paulo.

Fonte: Google Maps.

2.2 Desenho Amostral

A área de estudo está a 30 metros de uma área represada, sendo o levantamento de espécies realizado em uma área com reflorestamento de aproximadamente 200-m x 160-m e nessa área foram coletadas amostras de solo de pontos distintos (Figura 1).

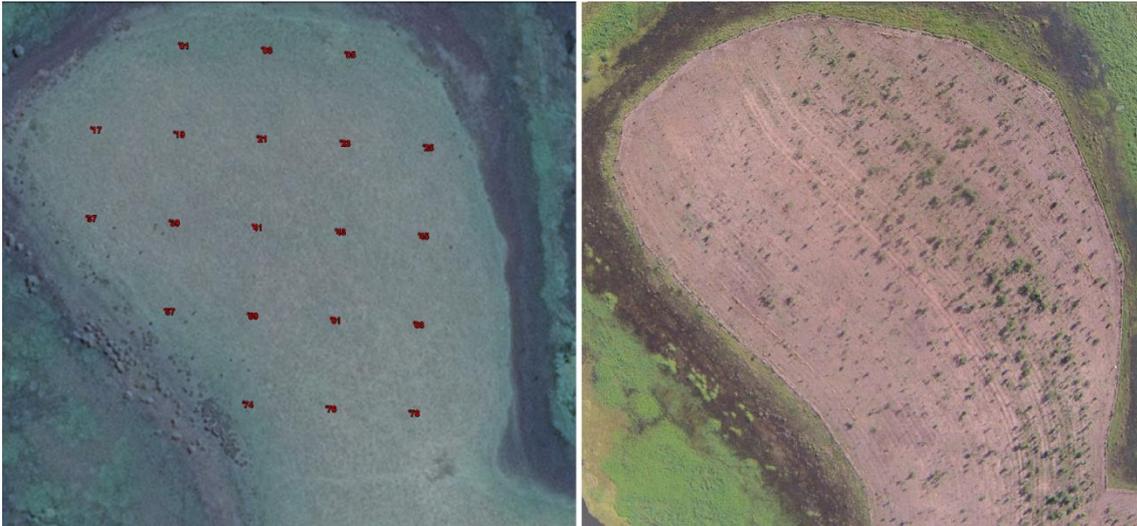


Figura 2: Área reflorestada com os pontos de coleta de solo.
Fonte: Imagem do Google Earth (esquerda) e drone (direita).

A área reflorestada continha mudas diversas, pertencentes a dois grupos funcionais: ao grupo de recobrimento (pioneiras) e ao grupo de diversidade (não pioneiras) (RODRIGUES et al, 2009).

Este plantio atraiu a nossa atenção porque mostrou um padrão muito heterogêneo de crescimento de mudas (figura 1), com algumas faixas de plantio contendo árvores aparentemente saudáveis e bem desenvolvidas, enquanto outras tiveram plantios iniciais sem sucesso, mesmo depois de várias tentativas de replantios e manutenção. Embora este padrão possa ser devido a outras variáveis (química do solo, bactérias e outros agentes patogênicos, etc.), optamos por avaliar a presença dos fungos no solo, pois estes organismos conferem benefícios extremamente importantes para as raízes de plantas, principalmente no desenvolvimento inicial das mudas (MEDINA et al., 2004).

3. Coleta e Análise

As amostras do solo foram coletadas entrelinhas do plantio para evitar a interferência dos adubos, e a coleta foi feita com o auxílio do trado na quantia de 250 gramas e em profundidade de 15 centímetros após limpeza de superfície do solo e para cada ponto retirou-se aleatoriamente 8 sub-amostras dentro de um raio de 3 metros.

No total foram amostrados 20 pontos, sendo a distância entre cada ponto em média de 18 metros, e na sequência as amostras foram enviadas para a análise molecular.

As 8 sub-amostras de cada ponto foram misturadas em um saco plástico para ficar homogênea. Na sequência, em um tubo Falcon de 50 ml inseriu-se 35 ml da amostra do solo que foram retiradas da amostra de 8 sub-amostras de solo que haviam sido misturadas em um saco plástico e completou o tubo com etanol. As amostras ficaram acondicionadas em álcool 92.8° e na geladeira.

Após a retirada do recipiente do campo com as amostras de solo conservadas em etanol, inicia-se o processo de extração de DNA.

3.1 Extração de DNA

Os tubos Falcon de 50 ml com o solo amostrado foram encaminhados para o laboratório e armazenado a -20°C por menos de uma semana, antes da extração do DNA. Antes da extração do DNA, o tubo Falcon foi agitado durante 5 min num agitador Genie II para assegurar uma mistura homogênea de solo e etanol. Uma sub-amostra de 2 ml foi removida do tubo de 50 mL e macerado utilizando um agitador de lise Savant FastPrep à velocidade máxima durante 20 segundos. O produto macerado foi submetido à extração de DNA usando o kit solo NucleoSpin da marca MachereyNagel, e o protocolo de extração foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

3.2 PCR (Reações em Cadeia de Polimerase)

O DNA extraído foi utilizado em reações de Nested PCR realizadas utilizando o conjunto de primers específicos para fungos e seguindo os parâmetros de Toju et al (2012). Estes primers foram desenhados para não amplificar DNA de plantas, e isso é um fator importante, pois em nossas amostras havia resíduos de braquiárias entre outras plantas. A primeira reação de PCR foi feita com os iniciadores ITS1-F_KYO2 (5'-TAG AGG AAG TAA AAG TCG TAA-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). O produto da reação inicial foi diluído 10x e submetidos a uma segunda PCR, na qual visou-se especificamente o operon ITS2 utilizando o iniciador inverso ITS4 e iniciador direto ITS3_KYO2 (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG

ATG AAG AAC GYA GYR A-3'), que continha um adaptador que possibilitou adicionar tags de identificação molecular (MIDs) em uma terceira rodada de PCR. Esta é uma estratégia de redução de custos laboratoriais que elimina a necessidade de comprar iniciadores com a sequência de fusão de 454 para cada MID. Em trilhas anteriores, não se detectou perda significativa de fidelidade de PCR com base na adição de uma terceira PCR, presumivelmente porque esta ronda de PCR utilizou iniciadores 100% conservados. Na terceira reação de PCR, o iniciador reverso (5'- CTA GCC TTG TGC CCA GCC CGC TCA GTC CTC TTG CGC TTA ATA TGC-3') continha a sequência original do ITS4, bem como o iniciador reverso de fusão 454 B sequência (sublinhada). As sequências dos iniciadores modificados para o iniciador adiante foi 5'- CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GNN NNN NGG CCA CGC GTC GAC TAG TAC-3' , onde a sequência sublinhada corresponde o 454 de fusão iniciador A, as letras "N" são o MID e a sequência em *itálico* identifica a sequência de adaptador (Figura 2).



Figura 3: Amplicon Fusion Primer com MID.

Fonte: 454 Sequencing Technical (Roche), 2009.

Ambas reações de PCR, a primeira e a segunda, foram realizadas três vezes e reunidas para minimizar a variabilidade de PCR. Também foi incluído um controle negativo sem DNA adicionado. Para cada uma, uma reação de 25- μ l de PCR foi realizada utilizando o sistema de PCR da Promega GoTaq. As reações incluíram - 1 μ l de de DNA, 0,2mM de iniciadores diretos e inversos, 1x de PCR tampão, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,1mM de mistura de dNTP e 1 unidade de polimerase Taq. Configurações do termociclador para a PCR inicial incluiu um passo de desnaturação de 10 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 20 seg, 50°C durante 30 seg, e 72°C durante 40 seg. Por último, foi feito o alongamento a 72°C durante 7 min.

O segundo Nested PCR foi realizado com os mesmos perfis de temperatura, exceto que a desnaturação inicial foi executada por apenas 1 min. A terceira PCR continha 1/10 do modelo diluído a partir da segunda PCR e aderiu ao ciclos idênticos de temperatura.

A eficácia das reações e a ausência de contaminação nos controles negativos foram verificadas por eletroforeses do produto PCR em um gel de agarose a 1%. Posteriormente, uma alíquota de 10-mL de cada reação PCR foi adicionada a uma amostra que foi submetida à emulsão PCR previamente descrita. As concentrações amplificadas foram estimadas usando fluorômetro Qubit e as concentrações equimolares de cada amostra foram reunidas, e utilizou-se o kit de purificação PCR QIAquick (Qiagen, Alemanha).

As amostras foram sequenciadas utilizando 1/8 da placa do equipamento 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX (Roche), realizado nas instalações da Macrogen (Coreia do Sul).

3.3 A análise dos dados

Inicialmente, as sequências mais curtas do que 150 pb (incluindo adaptadores, MIDs e iniciadores) foram removidos das análises. Em seguida, descartamos todos os MIDs e iniciadores (*primers*) imperfeitos usando o BioEdit. Posteriormente foi feito o alinhamento das sequências utilizando o servidor Mafft (MAFFT, 2016), as colunas contendo as posições alinhadas para iniciadores diretos e inversos foram removidos e as sequências restantes foram colocadas através de agrupamento dos OTUs.

O programa USEARCH v.1861.01.08 (Edgar, 2010) foi utilizado para identificar quimeras e agrupar sequências filtradas por qualidade, como no *pipeline* genérico para 454 descrito pelo autor (http://drive5.com/usearch/manual/upp_454.html). Um corte de similaridade de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) de 97% foi adotado para o agrupamento de sequências. Os OTUs foram atribuídos a táxons fungais utilizando o banco de dados Fasta do UNITE (sh_general_release_dynamic_s_01.08.2015). As sequências de OTUs obtidas contribuíram para o GenBank.

3.4 Análise estatística

Para a análise estatística calculamos os índices de diversidade alfa e beta. Em linhas gerais dizemos que quanto menos espécies as diferentes comunidades compartilham, mais alta é a diversidade beta.

Os coeficientes de similaridade são utilizados para se medir a diversidade beta. Estes coeficientes utilizam parâmetros qualitativos e quantitativos para a comparação entre as comunidades. Para avaliação da similaridade e dissimilaridades entre as comunidades fungicas, foram usados os índices de Jaccard, Bray-Curtis, Distância Euclidiana e UNIFRAC (ambos *weighted* e *unweighted*).

O conjunto de comandos no MOTHUR v.1.36.1 (Schloss et al., 2009) foi usado para obter as estimativas de diversidade Beta para ambos *Community Membership* e *Community Structure*. Este último utilizou três índices comparando cada uma das 18 amostras com a função *dist.shared* para calcular **Bray-Curtis** (usando o comando *braycurtis* em MOTHUR) **distância euclidiana** (*structeuclidean*) e para avaliações baseadas na distribuição de OTUs foi utilizado o programa **UNIFRAC** (*unifrac.weighted*) como uma medida de diversidade beta.

A matriz de distância de pares usada na análise UNIFRAC foi elaborada a partir de pontuação no BLAST entre todas as sequências OTU e foi gerado usando o utilitário *-calc_distmx* em USEARCH.

Community membership foi calculada usando comandos que geram os índices Jaccard usando o comando (*jclass*) e distância euclidiana usando o comando (*memeuclidean*) e também o UNIFRAC pelo comando (*unifrac.unweighted*).

Em todas as estimativas *MOTHUR* de diversidade alfa e beta, nas amostragens foi utilizado para minimizar o impacto dos tamanhos de amostra diferentes, o utilitário *subsample = T*, que utiliza sempre a menor amostra como padrão para as outras amostras. A partir de então é que se comparam as diferenças. Quando os utilitários não acomodavam as amostras, foi utilizado um conjunto de dados normalizado (*normalize.shared*).

Análises de autocorrelação entre as distâncias de diversidades Beta e distâncias geográficas entre os pontos de coleta foram calculadas usando testes de Mantel, também com o programa *MOTHUR*. O teste Mantel é usado para verificar a correlação significativa entre duas matrizes de distancia

Um correlograma de Mantel foi usado para verificar se há correlação entre duas matrizes de distância, medindo a correlação entre cada classe de distâncias usando o software estatístico R.

Usamos o comando correlação Pearson no *MOTHUR* para testar a correlação de cada OTU compreendendo mais de 1% do total com dados de cobertura de copa do conjunto de dados normalizado.

O NMDS (Escalonamento Multidimensional Não-Métrico) foi usado para explorar as interações significativas entre as várias matrizes de distância de diversidade beta e OTUs individuais, bem como a porcentagem de cobertura do dossel para cada um dos 18 pontos de coleta.

Em todos os casos em que uma estatística foi derivada de comparações múltiplas, uma correção de Bonferroni foi aplicada aos valores de significância.

3.5 Cálculo dos Índices Alfa

Estimativas de diversidade alfa foram calculadas utilizando diversidade filogenética e outras medidas disponíveis no *MOTHUR*.

Os índices calculados foram Chao, Shannon e Simpson, e esses índices avaliam a diversidade para cada área. Os índices de diversidade calculam por meio de fórmulas matemáticas a diversidade de espécies em uma comunidade, resultando em uma análise mais aprofundada e gerando dados como riqueza e abundância.

3.6 Análise da cobertura de copas

Foi medida a copa das coberturas das árvores de cada 1 dos 20 pontos amostrados e definiu-se um círculo de raio de 15 m em torno de cada ponto de coleta e em seguida foi calculada a proporção da área de copa visível, usando como base uma foto aérea tirada pelo Drone e para fazer as marcações das copas das árvores usou-se o programa ArcGIS v.10.4.

4. Resultados

Os ácidos nucléicos foram extraídos com sucesso das amostras de solo da área em restauração com mudas nativas. Inicialmente foram amostrados 20 pontos para a análise molecular, porém em dois pontos a extração de DNA falhou. Os resultados obtidos do sequenciamento do solo apresentou uma diversidade grande de fungos, no total foram encontrados 44939 sequencias totais que foram distribuídas em 339 OTUs (Anexo C) nos 18 pontos sequenciados. Os OTUs que representam acima de 1% do total das amostras são 17, que estão representados na tabela 1.

Tabela 1: OTUs acima de 1% do total das amostras.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Genero	Espécie
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	<i>Alternaria sp</i>
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	<i>Aspergillus sp</i>
Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	Chaetomium	<i>Chaetomium sp</i>
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Phaeosphaeriaceae	Stagonospora	<i>Stagonospora sp</i>
Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Rhytismatales	Rhytismataceae	Lophodermium	<i>Lophodermium sp</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Incertae_sedis	Candida	<i>Candida etchellsii</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Incertae_sedis	Candida	<i>Candida galli</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Incertae_sedis	Candida	<i>Candida haemulonis</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Incertae_sedis	Candida	<i>Candida neustonensis</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Incertae_sedis	Candida	<i>Candida parapsilosis</i>
Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	Cladosporium	<i>Cladosporium halotolerans</i>
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Onygenales	Onygenaceae	Monascella	<i>Monascella botryosa</i>
Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	Penicillium	<i>Penicillium melinii</i>
Fungi	Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Incertae_sedis	Rhodotorula	<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>
Fungi	Basidiomycota	Wallemiomycetes	Wallemiales	Wallemiaceae	Wallemia	<i>Wallemia sebi</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Pichiaceae	Yamadazyma	<i>Yamadazyma triangularis</i>
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Incertae_sedis	Yarrowia	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Os níveis taxonômicos foram atribuídos a cada OTU usando o comando -ublast do programa usearch8.1.1861_win32.exe. Este comando usa o algoritmo BLAST.

Dos 17 OTUs listados acima, 95% são ascomicetos, e 5% basidiomicetos. Com relação à ordem, 86 % estão concentradas em quatro ordens, sendo elas: 44% Saccharomycetales; 24,2% Capnodiales; 10,3% Eurotiales; 7,2% Rhytismatales. Os outros 14% estão distribuídos entre: Onygenales; Pleosporales; Sordariales; Sporidiobolales; Sporidiobolales.

A quantidade de OTUs encontrado em cada ponto amostrado apresentou valores variados. Podemos observar na tabela 2 cada OTU, sua abundancia e ocorrência em cada ponto.

Tabela 2: Táxons de fungos que foram amostrados com frequência de mais de 1%.

Espécie UNITE	Localização																	
	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>17</u>	<u>19</u>	<u>21</u>	<u>23</u>	<u>37</u>	<u>39</u>	<u>41</u>	<u>43</u>	<u>45</u>	<u>57</u>	<u>59</u>	<u>61</u>	<u>63</u>	<u>74</u>	<u>76</u>	<u>78</u>
Cladosporium_halotolerans	316	1204	948	691	807	18	420	307	729	785	20	1057	0	842	504	0	62	9
Yarrowia_lipolytica	0	1849	0	0	330	25	0	0	2358	1993	29	0	0	1013	0	0	0	0
Candida_etchellsii	239	361	0	0	7	0	2033	17	0	189	5	0	0	85	0	0	0	0
Lophodermium_sp	265	76	0	0	0	44	0	21	0	0	609	0	0	1	494	336	532	227
Candida_parapsilosis	31	109	0	0	158	15	166	0	42	73	0	0	934	27	0	484	6	3
Penicillium_melinii	17	0	0	0	625	87	0	257	0	0	53	0	0	566	29	7	49	194
Aspergillus_sp_DY115_21_8_M4	7	0	90	76	0	430	161	308	34	26	0	369	211	42	0	62	26	3
Alternaria_sp	7	0	0	0	0	0	0	222	0	0	0	0	0	39	0	1407	12	2
Candida_galli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1181	0	0
Wallemia_sebi	1	7	968	0	7	2	0	1	2	29	0	21	0	1	0	0	3	0
Candida_neustonensis	0	0	82	388	70	0	30	4	57	16	0	0	18	19	1	46	0	1
Monascella_botryosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	703
Candida_haemulonis	0	0	0	0	223	54	0	75	343	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yamadazyma_triangularis	2	0	18	16	26	0	8	0	2	551	0	0	36	33	0	0	0	0
Rhodotorula_mucilaginosa	2	0	173	49	0	80	0	4	9	78	0	0	289	0	0	0	0	0
Chaetomium_sp	153	5	0	0	0	0	268	3	0	0	0	0	0	0	47	0	2	22
Stagonospora_sp_AX113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	470	0	0	0	0	0	0

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

De acordo com a tabela 2, observamos que a espécie *Cladosporium halotolerans* foi encontrada em 16 dos 18 pontos amostrados. A segunda espécie mais comum foi a *Yarrowia lipolytica*, que foi encontrada nos pontos 5, 21, 23, 41, 43, 45, e 61. A *Stagonospora sp* foi encontrada apenas no ponto 57. Embora seja

difícil de testar estatisticamente, devido o número limitado de amostras que temos, aparentemente há uma sobreposição da *Y. lipolytica* nas áreas que apresentaram melhor desenvolvimento das mudas (Figura 1).

Para visualização da distribuição geral dos OTUs nos 18 pontos amostrados, a figura 4 mostra a localização dos mesmos. Além da distribuição geral, nas figuras (5, 6 e 7) temos a distribuição dos OTUs para cada ponto amostrado. Observamos que algumas cores são predominantes ao longo da área amostrada, sendo elas: laranja (*Yarrowia*); azul claro (*Cladosporium*); cinza claro (*Candida*).

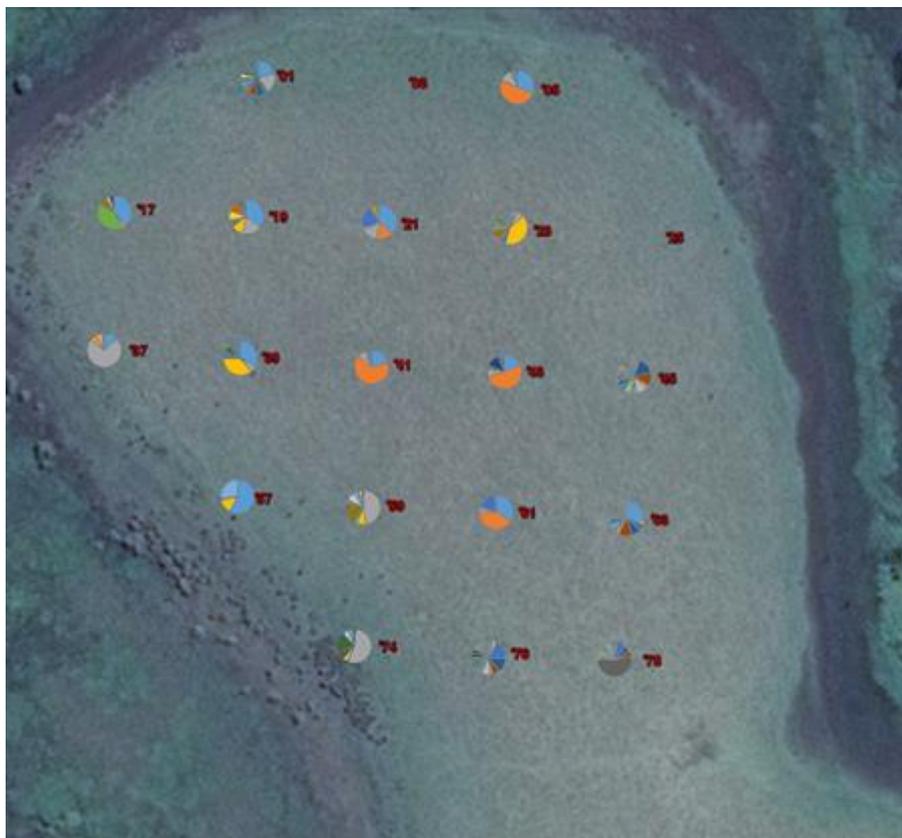


Figura 4: Imagem Google Earth com a distribuição dos OTUS em cada ponto.
Fonte: Adaptado do Google Earth

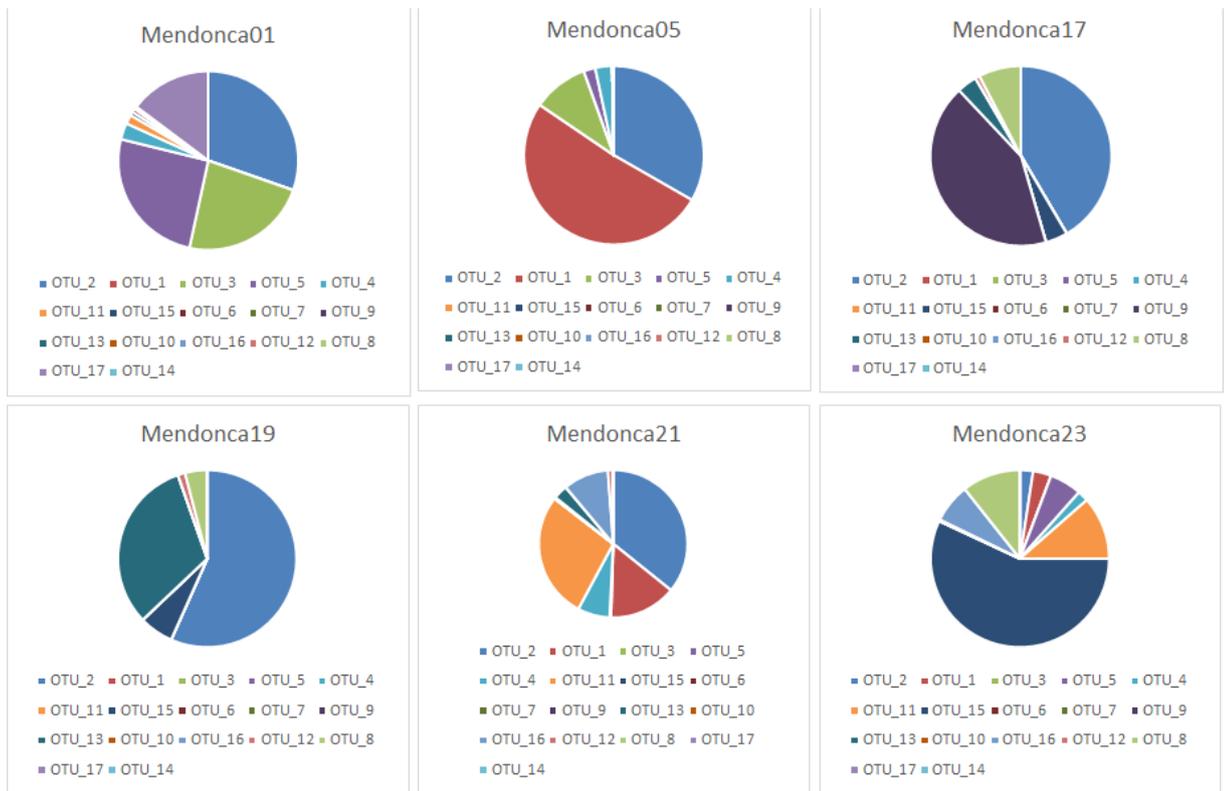


Figura 5: Gráfico com a distribuição dos OTUS em cada ponto.

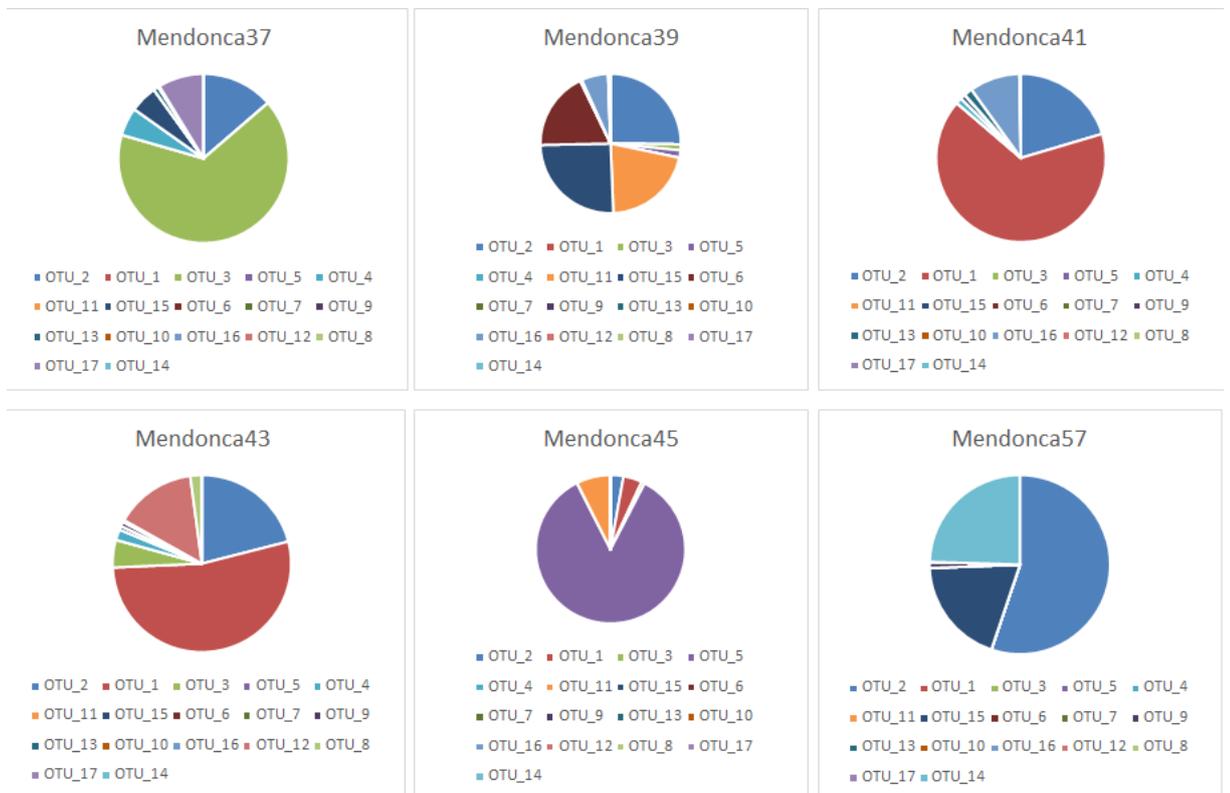


Figura 6: Gráfico com a distribuição dos OTUS em cada ponto.

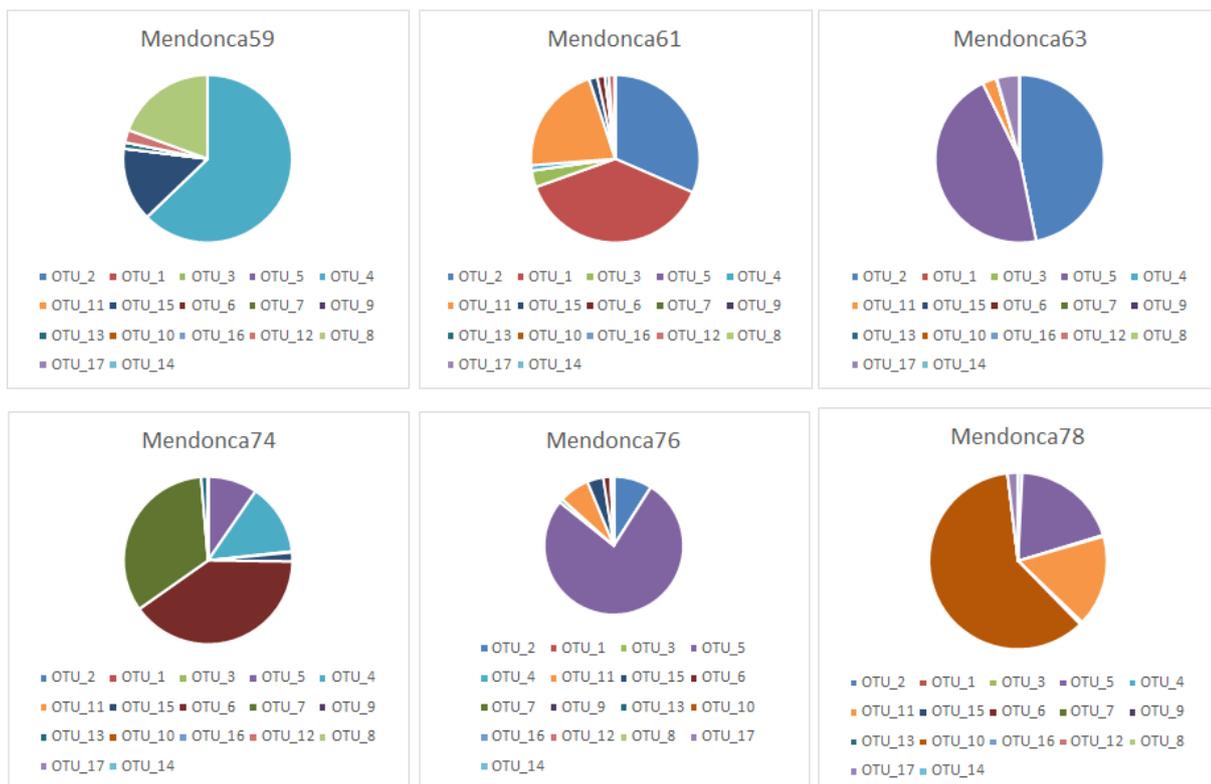


Figura 7: Gráfico com a distribuição dos OTUS em cada ponto.

Além dos táxons listados na Tabela 1 e 2, vários membros do filo Glomeromycota também foram encontrados, estes em quantidades significativamente menores (menos de 0.1 % do total das sequências; Tabela 3). Glomeromycota é principalmente composta por fungos micorrizas, que são associados a benefícios para plantas. Contudo, a distribuição destas espécies não foi correlacionada com áreas de bom desenvolvimento de mudas.

O projeto tentou avaliar o uso de FMA como fator de sucesso das mudas que estavam bem desenvolvidas na área de estudo, porém não existiu padrão nessas análises e os dados mostraram que a distribuição dos FMAs são heterogêneas, pois esses fungos dependem da simbiose com as plantas para sobreviverem.

Tabela 1: Táxons identificados de amostras de solo pertencendo ao filo Glomeromycota.

Glomus_sp_10_SUN_2011 c__Glomeromycetes;o__Glomerales;f__Glomeraceae;g__Glomus;s__Glomus_sp_10_SUN_2011	4
Entrophospora_sp c__Glomeromycetes;o__Diversisporales;f__Acaulosporaceae;g__Entrophospora;s__Entrophospora_sp	4
Rhizophagus_intraradices c__Glomeromycetes;o__Glomerales;f__Glomeraceae;g__Rhizophagus;s__Rhizophagus_intraradices	3
Funneliformis_sp c__Glomeromycetes;o__Glomerales;f__Glomeraceae;g__Funneliformis;s__Funneliformis_sp	2
Entrophospora_sp c__Glomeromycetes;o__Diversisporales;f__Acaulosporaceae;g__Entrophospora;s__Entrophospora_sp	31
Entrophospora_sp c__Glomeromycetes;o__Diversisporales;f__Acaulosporaceae;g__Entrophospora;s__Entrophospora_sp	46

Após a identificação molecular dos fungos presentes na área amostrada, os mesmos foram caracterizados quanto aos índices de riqueza e diversidade, utilizando as métricas ecológicas. Os índices de diversidade alfa (Shannon e Simpson) e o índice de riqueza (Chao) foram calculados no software *Mothur*, utilizando as configurações padrões. A Tabela 4 e a figura 8 mostram os índices de diversidade alfa calculados no *software Mothur* para as áreas de coleta, contendo o número total de espécies por área, os Índices de Chao, Shannon, Simpson e a Filodiversidade.

Os pontos que apresentam a maior riqueza são 45 e 78, com o valor do índice de Chao de 108,83 e 96,70 respectivamente. O ponto 57 foi o que apresentou o menor valor do índice Chao, sendo 11,07. O índice Shannon que considera igual peso entre espécies raras e abundantes mostrou que os pontos 45 e o 76 são os que apresentaram maior diversidade e o ponto que apresentou menor diversidade foi o 37. Além dos valores de Shannon, temos o índice de Simpson, que apresenta o grau máximo de diversidade expresso próximo ao valor zero. Nesse índice os pontos com maior diversidade são o 01 e o 45, apresentando os respectivos valores: 0,1015 e 0,1095. O ponto que apresentou menor diversidade Simpson foi o 37 com 0,4394.

Embora o ponto 57 seja o local com menor quantidade de espécies observadas, os índices Shannon e Simpson utilizados evidenciaram que este não é o local com menor diversidade de espécies.

Tabela 4: Índices de diversidade alfa calculados no *software Mothur*.

Group	Espécies Observadas	Chao	Shannon	Simpson	Filodiversidade
Mendonca01	66,14095	73,352507	2,869478	0,101505	0,0059
Mendonca05	14,90239	15,766156	1,48479	0,323837	0,0013

Mendonca17	11,452	11,851063	1,538003	0,29275	0,0008
Mendonca19	20,8354	20,925323	2,241702	0,15524	0,0013
Mendonca21	20,07837	20,549265	1,952556	0,198989	0,0016
Mendonca23	67	73	2,776284	0,160176	0,0069
Mendonca37	12,51436	13,149841	1,267628	0,439466	0,0007
Mendonca39	38,26541	39,774239	2,293375	0,154117	0,004
Mendonca41	19,97113	22,481999	1,397871	0,405829	0,0019
Mendonca43	22,19531	23,848916	1,706586	0,295697	0,0017
Mendonca45	97,27044	108,837631	3,367226	0,109554	0,0045
Mendonca57	10,27848	11,079402	1,34656	0,324093	0,0009
Mendonca59	21,91487	24,601985	1,937613	0,249489	0,0007
Mendonca61	17,06794	19,815125	1,590528	0,269468	0,0013
Mendonca63	60,37849	65,253846	2,662043	0,146899	0,005
Mendonca74	21,32117	24,529148	1,696262	0,255238	0,0013
Mendonca76	74,19152	80,237366	3,100735	0,112965	0,0052
Mendonca78	79,60897	96,701137	2,490086	0,192832	0,0044

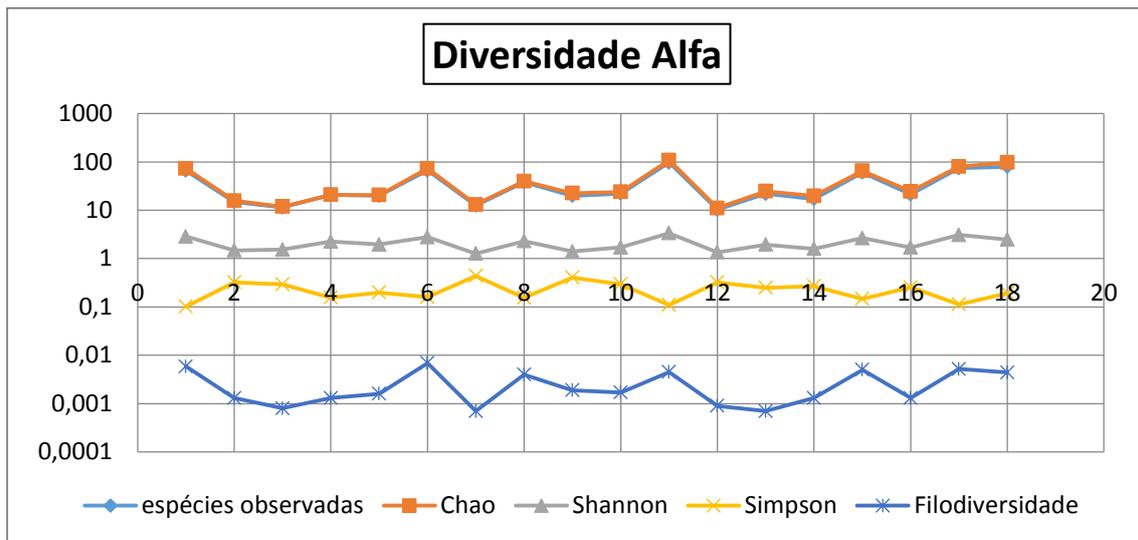


Figura 8: Gráfico índice de diversidade Alfa.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2017.

Na figura (8) foram tabelados e comparados os resultados para os índices de Riqueza e Abundância, bem como para os Índices de Simpson e Shannon. No gráfico o índice de espécies observadas está sobreposto pelo índice Chao.

Os dados da tabela 5 mostram que a diversidade alfa medida como 'diversidade filogenética' esta significativamente correlacionada com cobertura de copa. Porém, quando aplicada à correção de Bonferroni, que ajusta os valores de p, observamos que o p-value não é mais significativa.

Tabela 5: Índice de diversidade alfa correlacionado com a cobertura de copa

		R	p-value
Porcentagem da copa	Espécies observadas	0,501106874	0,034138
Porcentagem da copa	Índice Chao	0,504837164	0,032616
Porcentagem da copa	Shannon	0,441909033	0,066341
Porcentagem da copa	Simpson	-0,334547831	0,174795
Porcentagem da copa	Diversidade filogenética	0,526	0,02495

Mesmo após a correção de Bonferoni, observamos que em alguns pontos a biodiversidade de fungos está relacionada com o desenvolvimento da copa, isso se deve ao fato de que onde foram observados valores maiores do Índice Chao a cobertura da copa também é maior.

Diversidade beta

O índice de diversidade beta mede como a variedade (e em alguns casos as abundâncias) de espécies difere entre comunidades ou amostras ao longo de gradientes. O presente estudo utilizou os parâmetros *Community Membership* (membros da comunidade) e *Community structure* (estrutura da comunidade). *Community Membership* em linhas gerais consideram presença/ausência de espécies e para as análises utilizou os índices Jaccard (*jclass*), Distancia euclidiana (*memeclidean*) e UNIFRAC unweighted. *Community structure* considera a abundância dos microrganismos e os testes realizados foram: Bray-Curtis, distancia euclidiana (*structeuclidean*) e *UNIFRAC weighted*.

Foi efetuado um teste de Mantel entre a matriz de distancia das diferentes áreas amostradas com base nos índices de diversidade beta. Os resultados do teste Mantel nos revelam se os fungos estão distribuídos aleatórios ou não.

Os resultados apontam que índices de diversidade beta foram altamente correlacionados com distância entre os pontos, exceto o índice de diversidade *structeuclidean* ($p > 0,05$) (Tabela 6). Isto sugere que dentro do plantio estudado, com dimensões de aproximadamente 200-m x 160-m, existem agregações de comunidades fungais, ou seja, os fungos não são aleatoriamente distribuídos pela área do plantio.

Tabela 6: Significado estatístico de permutações de autocorrelação entre matrizes de distância espacial e de diversidade Beta entre os 18 pontos amostrados na pesquisa.

Community membership		
	Coeficiente de correlação (Mantel)	p-value
jclass:	0.247	<0.001
memeuclidean:	0.237	0.004
unweighted UNIFRAC:	0.217	0.002

Community structure		
	Coeficiente de correlação (Mantel)	p-value
Bray-Curtis:	0.208	0.007
struceuclidean:	0.077	0.157
weighted UNIFRAC:	0.146	0.042

Além do teste Mantel, foi feito o Mantel correlograma que analisa qual(is) distância(s) são as mais responsáveis pela distribuição dos fungos (Figura 9).

Na horizontal temos as categorias de distância e na vertical à força da correlação. Acima da linha vermelha a correlação é positiva (quando a distância aumenta a diversidade Beta também aumenta). Se for abaixo da linha vermelha, a situação é o inverso. O teste Mantel foi significativo ao nível de 5% e essa significância está relacionada principalmente a categoria de distância geográfica, que é de 34 metros.

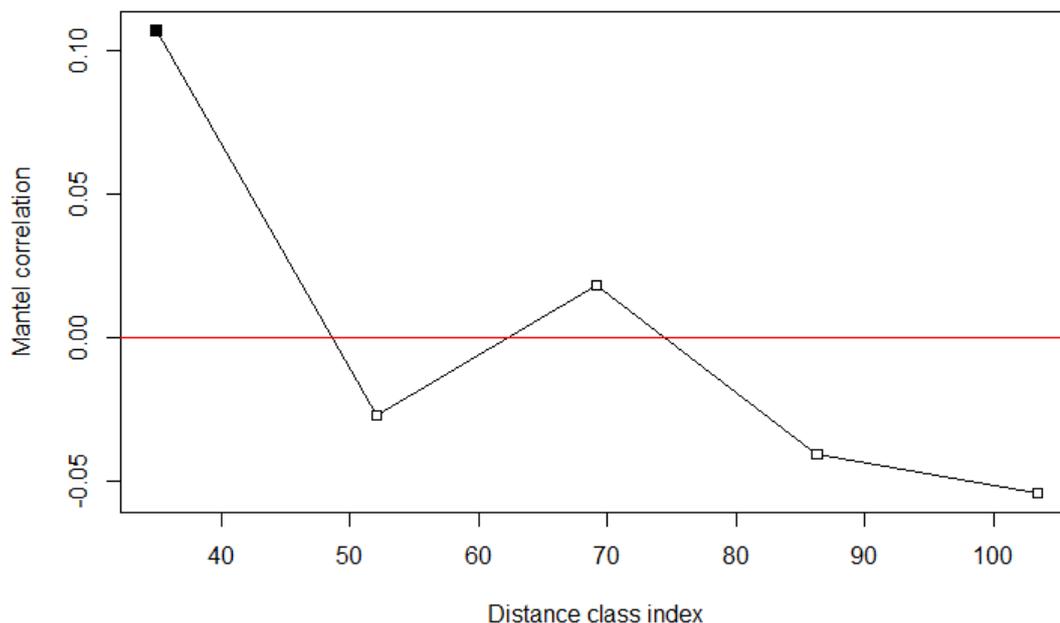


Figura 9: Gráfico Correlação entre Diversidade Beta vs distancia

A correlação de Pearson permite comparar as medidas de dissimilaridade. Nos gráficos abaixo destacamos alguns OTUs que apresentaram resultados significantes ao nível de 5% nessa correlação, embora como se possa observar, desviam das regras para fazer a correlação de Pearson, pois apresentam muitos zeros e não faz uma curva paramétrica.

Embora não siga os padrões comuns apresentados em uma correlação de Pearson, tivemos três pares de OTUs associados uns aos outros que apresentaram alguns pontos com correlação significantes ao nível de 5%. Os gráficos nos mostram que com mais dados amostrais, é provável que esses OTUs sejam mesmo interessantes para se correlacionar.

O OTU 8 (*Rhodotorula mucilaginosa*) apresentou correlação significativa ao nível de 5% com o OTU 4 (*Candida parapsilosis*).

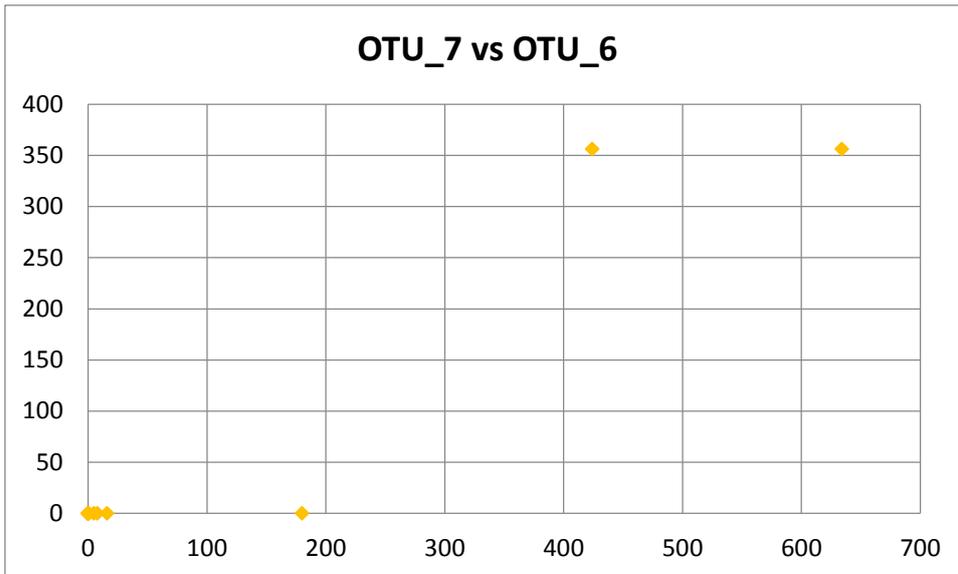


Figura 12: Gráfico Correlação de Pearson.

Além de correlacionar OTU vs OTU, fizemos a correlação de Pearson OTU vs cobertura. Observamos que o OTU 5 (*Lophodermium* sp) apresentou forte correlação com o desenvolvimento da copa.

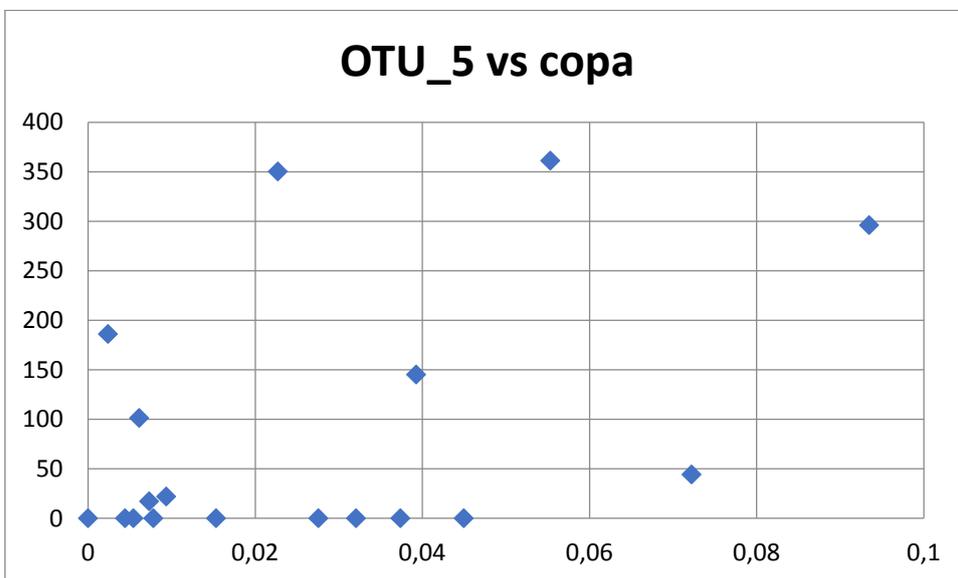


Figura 13: Gráfico Correlação de Pearson.

Para comparar todos os pontos de amostra foi feita a análise NMDS (Escalonamento Multidimensional Não-Métrico), que é uma maneira de simplificar os dados em uma matriz. Usando os dados de diversidade beta na comparação entre

as amostras, foi feita a análise NMDS em três dimensões (3 eixos), para entender as dissimilaridades ou similaridades entre os pontos de coleta de uma forma mais simplificada.

Os eixos da análise NMDS foram correlacionados com cobertura de copa. Os resultados na Tabela 7, evidenciam que na análise *Community membership* os índices *Jclass* eixo 1 e *Memeuclidean* no eixo 2 e na *Community structure* análise Bray-Curtis eixo 2 houve significância ao nível de 5% entre os valores de NMDS e os valores de copa desses pontos e isso sugere que a variação dos dados pode estar correlacionada com a cobertura. A análise UNIFRAC mostrou valores superior a 0,05. O Unifrac compara a distância filogenética entre as comunidades para detectar diferenças na estrutura da comunidade (SCHLOSS et al., 2009).

Tabela 7: NMDS matriz vs cobertura

Community membership						
	Eixo 1	p-value	Eixo 2	p-value	Eixo 3	p-value
Jclass	0.488	0.027	-0.377	0.101	0.098	0.684
Memeuclidean	-0.157	0.511	0.455	0.042	-0.295	0.208
unweighted UNIFRAC	-0.377	0.101	0.280	0.234	0.271	0.250

Community structure						
	Eixo 1	p-value	Eixo 2	p-value	Eixo 3	p-value
Bray-Curtis	-0.068	0.776	0.458	0.041	0.063	0.794
Structeuclidean	-0.156	0.515	-0.005	0.983	0.146	0.542
weighted UNIFRAC	-0.384	0.094	-0.278	0.238	-0.033	0.889

Uma matriz NMDS relacionando as matrizes de diversidade beta e a significância com os OTUs individuais foi feita. Neste caso, foi aplicada a correção de Bonferroni, que ajusta os valores de p quando vários testes estatísticos são realizados simultaneamente em um único conjunto de dados, com a finalidade de reduzir as chances de obtenção de resultados falso-positivos (erros de tipo I). Os resultados obtidos mostram-se na Tabela 8, onde pode se afirmar que tanto para *community membership* quanto para *community structure*, o OTU 5 (*Lophodermium* sp) esta correlacionado com a matrizes de diversidade beta. Os resultados apontam

que o OTU 5 é responsável pelo padrão de distribuição e variação dos dados entre os 18 pontos de coleta.

Tabela 8: NMDS Matriz vs OTUs mais significativos (correção de Bonferroni)

Community membership								
	OTU	Eixo 1	p-value	Eixo 2	p-value	Eixo 3	p-value	comprimento
Jclass	OTU_5	0.293	0.212	-0.752	<0.0001	-0.192	0.421	0.830
memeuclidean	OTU_5	-0.189	0.428	0.765	<0.0001	-0.422	0.062	0.894
unweighted UNIFRAC	OTU_5	-0.739	<0.0001	0.299	0.202	0.378	0.100	0.883

Community structure								
	OTU	Eixo 1	p-value	Eixo 2	p-value	Eixo 3	p-value	comprimento
Bray-Curtis	OTU_2	-0.184	0.441	-0.210	0.378	-0.875	<0.0001	0.918
structeuclidean	OTU_1	-0.465	0.037	0.319	0.171	-0.734	0.0001	0.927
	OTU_2	0.304	0.195	-0.441	0.050	-0.740	<0.0001	0.914
weighted UNIFRAC	OTU_5	-0.427	0.059	-0.788	<0.0001	-0.113	0.639	0.903

Os dendogramas foram feitos usando o comando *tree.shared* no programa MOTHUR, que calculou a diversidade beta e gerou diversas matrizes. Os dendogramas abaixo mostram os resultados para cada tipo de análise.

O dendrograma do índice de similaridade de Jaccard, Distancia euclidiana e UNIFRAC (unweighted) que estão relacionados as análises beta de membership notamos que os pontos 41 e 43 estavam consistentemente semelhantes, como pode ser visto no dendrograma (Figuras 14,15,16). Houve ainda a presença de pontos isolados tais como o 57 e 76.

Para os índices na *Community Structure* (Bray-Curtis, Distancia euclidiana e UNIFRAC weighted) notamos que os pontos 43 e 05 estavam semelhantes nos três índices (Figura 17,18,19). Os pontos 78 e 37 apareceram isolados.

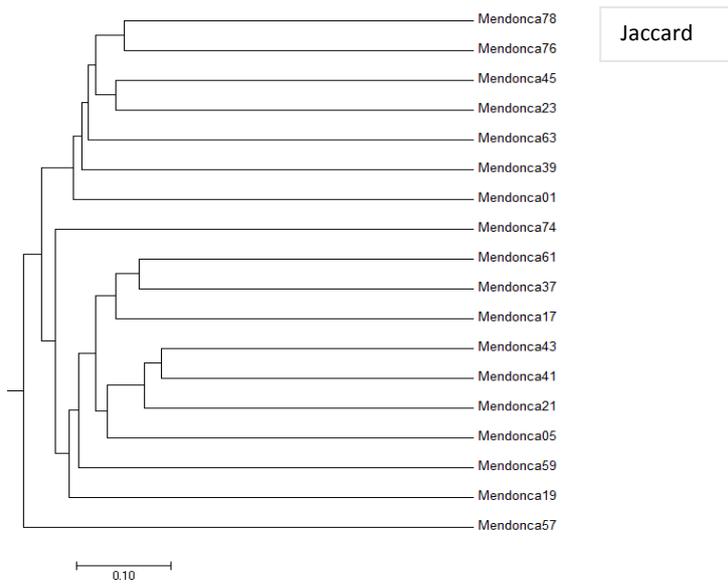


Figura 14: Dendrograma usando o índice de similaridade de Jaccard entre os 18 pontos amostradas.

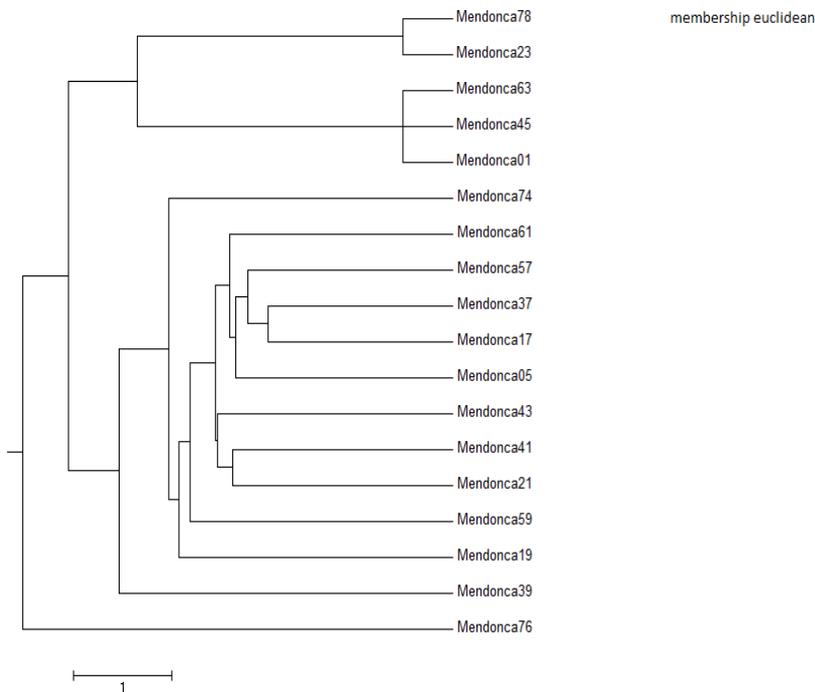


Figura 15: Dendrograma usando o índice de similaridade de Distancia euclidiana (Membership) entre os 18 pontos amostradas.

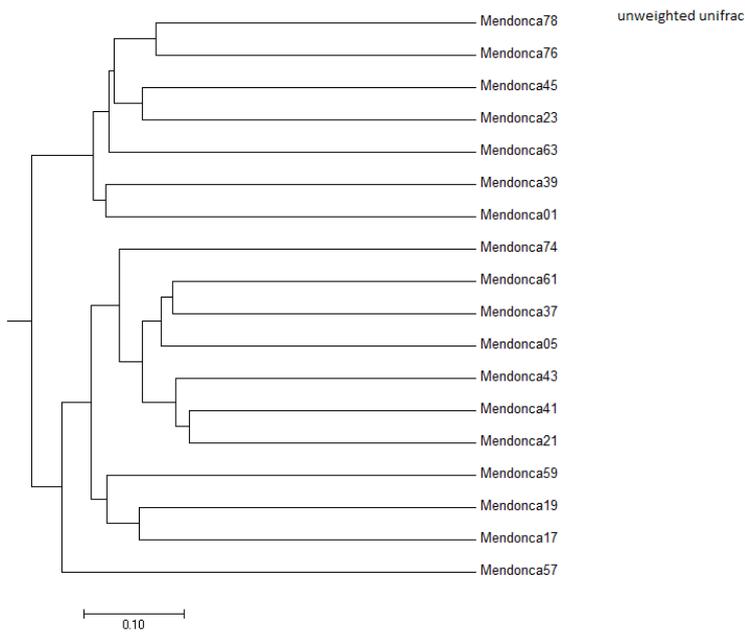


Figura 16: Dendrograma usando o índice de similaridade de UNIFRAC (unweighted) entre os 18 pontos amostradas.

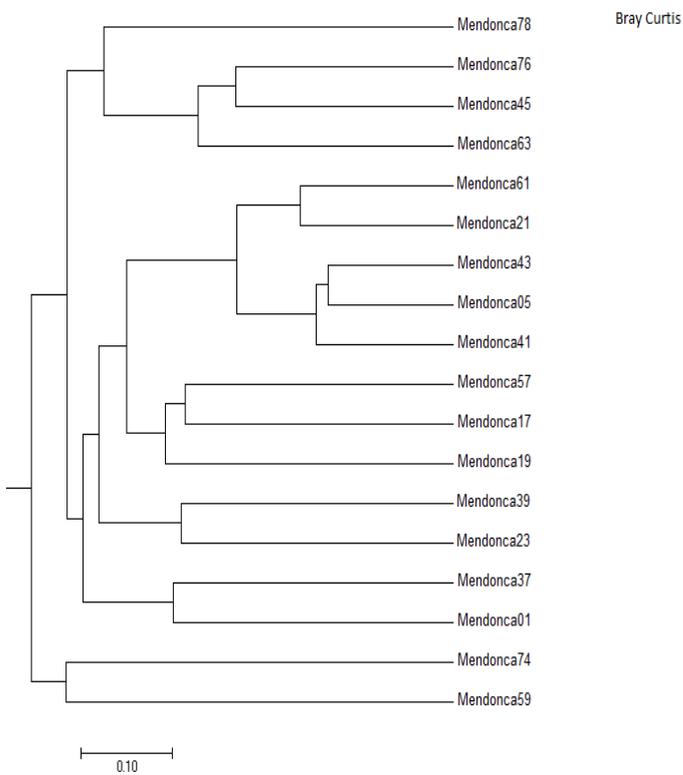


Figura 17: Dendrograma usando o índice de similaridade de Bray-Curtis entre os 18 pontos amostradas.

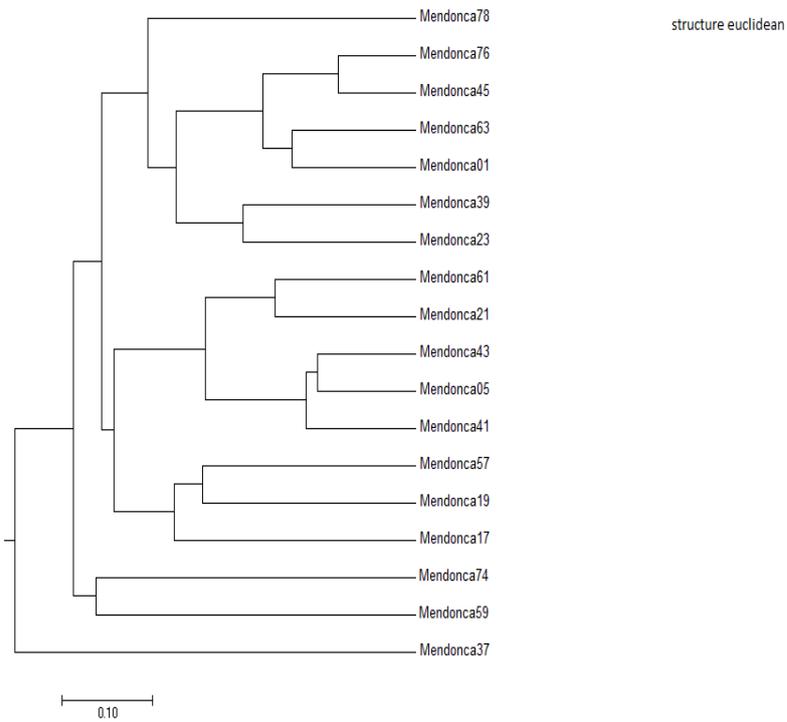


Figura 18: Dendrograma usando o índice de similaridade de Distancia euclidiana (Structure) entre os 18 pontos amostradas.

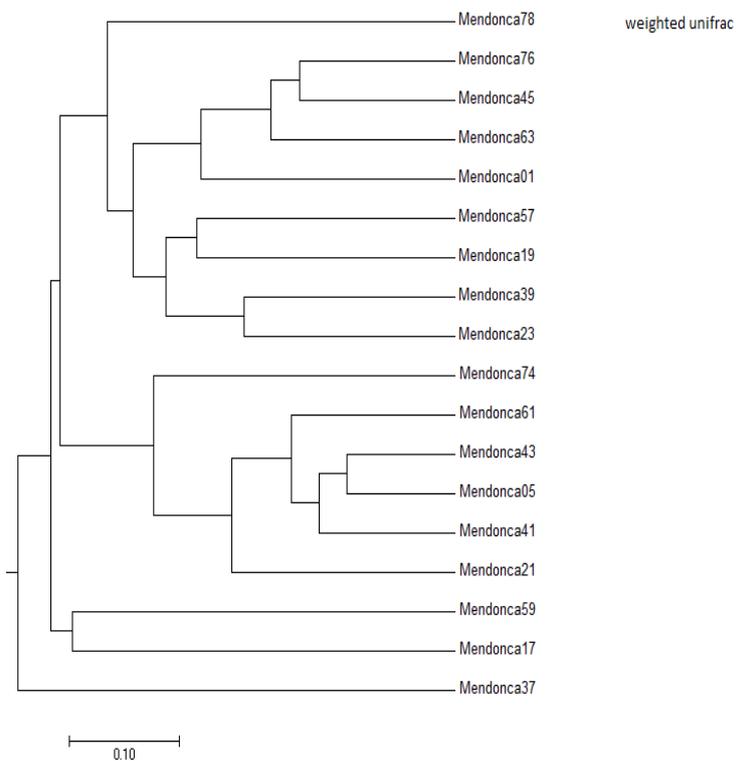


Figura 19: Dendrograma usando o índice de similaridade de UNIFRAC (weighted) entre os 18 pontos amostradas.

5. Discussão

O presente estudo nos forneceu informações relevantes a respeito das espécies de fungos presentes em pastos neotropicais dominados por *Brachiaria* spp. Embora se saiba que o solo é um ambiente microbiano extremamente diversificado (Vital et al, 2002), acreditamos que exista um padrão que ocorre amplamente no Brasil em pastos abandonados, onde ocorre a maioria dos esforços de reflorestamento.

Um dos OTUs encontrados com maior frequência em nosso estudo foi o *Cladosporium halotolerans*. Espécies de *Cladosporium halotolerans* foram relatadas em uma revisão de literatura feita por Bensch et al (2012), na qual diz que a mesma é uma espécie sapróbia e que já foi observada em diversos ambientes, tais como: água com grande quantidade de sal em regiões subtropicais, em ambientes internos, gelo ártico, lesões humanas e animais, plantas, rochas, madeira de coníferas, moldura da janela e raízes micorrízicas. Oliveira et al (2014) revelaram a presença de *Cladosporium halotolerans* dentro das folhas de *Vitis labrusca* (um tipo de uva). E em amostras de solo, a *C. halotolerans* foi encontrada no Mar Negro da Bulgária (SMOLYANYUK e BILANENKO, 2011).

Um dos fungos de maior ocorrência em nossa área de estudo foi a *Yarrowia lipolytica* que pode ser observada em diversos ambientes e apresenta forte ligação com áreas com grandes quantidades de gordura. Zinjarde et al (2014) descreveu as habilidades fisiológicas da *Yarrowia* para a degradação de hidrocarbonetos, tais como alcanos e compostos aromáticos, além da sua capacidade em tolerar alguns metais pesados, o que qualifica a *Y. lipolytica* como promissora em alguns processos de biorremediação ambiental. Em estudo recente a *Y. lipolytica* foi descrita como um organismo auxiliar no desempenho do fungo micorrízico arbuscular (FMA), resultando no aumento do crescimento vegetal e na absorção de fósforo (Vassilev et al., 2001). Entretanto, as bases desse efeito benéfico para o fungo tampouco foram ainda exploradas (LOBÃO, 2007).

Alguns trabalhos semelhantes ao que desenvolvemos mostra a avaliação dos fungos em áreas de restauração florestal, tais como o trabalho desenvolvido por Avis et al (2016), que realizaram o monitoramento dos fungos em diversas áreas de restauração na Costa Indiana- EUA. No total 42 locais foram pesquisados ao longo de dois anos para avaliar a presença de fungos saprófitos, micorrizicos e fungos parasitas. Estes locais eram áreas restauradas, pré restauradas, ou áreas de referencias e suas condições eram arborizadas, semi arborizadas ou áreas de pastagens. No total foram encontradas 277 espécies de fungos, sendo a maior parte encontrada em áreas arborizadas, embora alguns foram encontrados em pastagens. Observou-se que plantas invasoras reduzem a riqueza de espécies fúngicas.

Para o monitoramento da área Avis et al (2016) utilizou dois índices de similaridade (Jaccard e Overlap) e também as relações de diferentes guildes fungicas . Os estudos revelaram que as relações entre as guildes fungicas pode ser usado como indicador no inicio da restauração e os índices de similaridade em fases posteriores.

Segundo Colodete et al (2014) os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem grandes aliados nos processos de restauração de áreas degradadas, pois influenciam no crescimento e na adaptação das plantas no solo. Em nossos estudos houve a tentativa de estabelecer um protocolo de FMAs relacionando-as com o desenvolvimento das plantas, porém observamos que a distribuição dos FMAs são heterogêneos, impossibilitando fazer essa correlação.

Harris (2003) avaliou a qualidade do solo por meio das características da comunidade microbiana e qual o potencial de restauração dessa área após a degradação. Foram utilizadas medidas como o tamanho, a composição e a atividade da comunidade microbiana do solo. Essas medidas fornecem informações valiosas para restaurar terras degradadas e quais práticas de gestão devem ser utilizadas para restabelecer a estrutura e função do ecossistema.

Segundo Harris (2009), os microorganismos desempenham papéis críticos no funcionamento do solo, por meio da ciclagem de nutrientes, formação estrutural, e interações com as plantas tanto positivas como negativas. Esses papéis são importantes no restabelecimento de funções e da biodiversidade na restauração de ecossistemas. As medições dos fungos no solo mostram a importância de tais organismos no desenvolvimento das plantas e devido a isso os mesmos podem

auxiliar nos processos de restauração, sugerindo que a manipulação da comunidade fúngica se apresenta promissora no aumento da taxa de recuperação de sistemas degradados.

Uma das dificuldades apontada para trabalhos desenvolvidos com fungos, é que a maioria dos microrganismos do solo são difíceis de cultivar (menos de 1% cresce em placas Petri com meio de cultura, i.g ágar) e devido a isso devemos contar com outros meios de análises, tal como o uso da biologia molecular na identificação das espécies (HARRIS,2009).

O uso da biologia molecular, por meio da extração de DNA do solo vem sendo usada para mostrar as comunidades de microrganismos presente no solo. A extração de DNA do solo, seguido da técnica de amplificação por PCR e posteriormente o sequenciamento das amostras, mostrou-se ser eficiente para quantificar a diversidade da comunidade fungica nos solos. HE et al (2005), avaliou as diferenças entre as comunidades fungicas do solo de florestas subtropicais naturais e em áreas com plantio de Araucárias, essa analise foi feita através da extração de DNA associada à clonagem do rDNA 18S e seguido do sequenciamento.

O presente estudo ao invés de utilizar a região rDNA 18S optou por usar a região ITS para o sequenciamento das amostras, pois o mesmo apresenta um banco de dados robusto.

Segundo Anderson e Parkin (2007), os resultados apresentados a partir da região do ITS de vários solos foram diferentes e isso mostra que existe diferença entre a comunidade fungica total e os fungos ativos no momento da amostragem.

O uso da tecnologia do 454 para as regiões ITS no sequenciamento de rDNA foi utilizado no estudo conduzido por Buée et al (2009), que analisou seis diferentes amostras de solo florestais na região de Burgundy na França. A técnica de pirosequenciamento da região ITS do rDNA identificou entre 600 a 1000 OTUs em cada amostra de solo, sendo que 81% dos OTUs encontrados pertencem aos filos Basidiomiceto e Ascomiceto. A mesma técnica descrita por Buée et al foi utilizada no presente trabalho e os resultados apontaram a presença de 339 OTUs nos 18 pontos de coleta, sendo a maior parte dos OTUs pertencente aos Ascomicetos.

Lim et al (2010) avaliou a diversidade de fungos presentes no solo em três ilhas distintas da Coréia e da China, através da técnica de pirosequenciamento da região do gene do rRNA 18S. No total foram obtidas 9.698 sequencias, das quais

revelaram a presença de 372 OTUs nas amostras avaliadas. Os resultados apontaram que a maior parte dos OTUs encontrados pertencem aos filos Basidiomiceto e Ascomiceto, sendo que os Ascomicetos apresentaram-se dominantes. Em nossa área de estudo repetiu-se o mesmo resultado com relação aos filos, predominância de 95% dos Ascomicetos.

6. Conclusão

O presente trabalho buscou avaliar a possibilidade dos fungos (naturalmente presentes no solo) contribuir para o desenvolvimento das mudas em áreas de restauração. Para isso usamos a técnica de extração de DNA do solo, seguida da nested PCR e associada ao sequenciamento. Esse protocolo se mostrou eficiente para acessar a diversidade das comunidades de fungos de solos florestais e foi através dessa técnica que quantificamos e qualificamos os fungos presente no solo na área estudada.

Os resultados da etapa laboratorial revelaram a presença de 339 OTUS, dos quais 17 foram representados com mais de 1% do total das amostras. Uma espécie (*Yarrowia lipolytica*) mostrou um potencial bastante promissor como um catalizador do bom desenvolvimento das mudas plantadas. Curiosamente, esta espécie de fungo foi previamente descrita na literatura como um co-fator no desenvolvimento de plantas, principalmente porque solubiliza fósforo mineral.

As análises das amostras de solo mostraram uma elevada correlação entre a diversidade Beta e a distância geográfica. Este fato é um importante indicador que sugere que há agregação de comunidades de fungos em pequenas e médias distâncias (entre 34 e 150 metros). Esta pode ser uma consideração importante na amostragem de projetos de trabalhos futuros com as comunidades de fungos em pastagens.

As contribuições adicionais a nossos trabalhos por outros pesquisadores delinearão ainda mais os táxons pertinentes que se correlacionam com o eventual sucesso dos plantios. Esta pode tornar-se uma importante ferramenta para a identificação dos locais mais viáveis para a implantação de APPs.

7. Referencias Bibliográficas

Anderson, I.C.; Parkin, P.I. **Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules.** Journal of Microbiological Methods, v. 68, p. 248–253, 2007.

Avis, P.G.; et al **Monitoring fungi in ecological restorations of coastal Indiana, U.S.A.** Restoration Ecology, p.9, 2016.

Bensch, K.; et al. **The genus Cladosporium.** Studies in Mycology. v.72: 1–401, 2012.

Bueé, M.; et al. **454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity.** New Phytologist, Malden, v. 184, p. 449-456, 2009.

Caldeira, M. V. W.; et al. **CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM RESPOSTAS A INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.** Ciência Florestal, Santa Maria, v.7, n.1, p. 1-10, 1997.

Carvalho, M.C.C.G.; Silva, D.C.G. **Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas.** Ciência Rural, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, 2010.

CEPAGRI. **Dados meteorológicos.** Disponível em: <<http://www.cepagri.unicamp.br/>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2016.

Chu, E.Y ; et al. **EFEITOS DA INOCULAÇÃO MICORRÍZICA E DA ADUBAÇÃO FOSFATADA EM MUDAS DE *Vochysia maxima* Ducke.** R. Árvore, Viçosa-MG, v.28, n.2, p.157-165, 2004.

Colodete, C. M.; Dobbss, L. B.; Ramos, A. C. **Aplicação das Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas.** Natureza on line, v. 12, n. 1, p. 31-37, 2014.

Edgar, R.C. **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST,** Bioinformatics v.26(19), p.2460-2461, 2010.

Fasanella, C.C. **Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo.** Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p. 98, 2012.

Harris, J. **Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration.** European Journal Soil Science, Oxford, v.54, n.4, p.801-808, 2003.

Harris, J. **Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers?** Science 325: p. 573- 574, 2009.

HE, J. Z.; XU, Z.; HUGHES, J. **Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes.** FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 247, n. 12, p. 91-100, 2005.

Lim, Y.W.; et al. **Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing.** Journal of Microbiology, v. 48, n.3, p. 284-289, 2010.

Lobao F.A.; et al. **Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ transport mediated by the plasma membrane ATPase of Yarrowia lipolytica.** FEMS Microbiol Lett. v. 274: p.17–23, 2007.

MAFFT. **Alinhamento de sequencias.** Disponível em: <<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>>. Acesso em: maio de 2016.

Medina, A.; et al. **Increase plant growth ‘nutrient uptake’ and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast.** Soil Science 169: p. 260-270, 2004.

Mesquita, V. A. **Caracterização da diversidade microbiológica de solo do Cerrado de Minas Gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 70, 2011.

Oliveira, R.J.V.; et al. **Cladosporium species from hypersaline environments as endophytes in leaves of Cocos nucifera and Vitis labrusca.** Mycotaxon v. 129 (1), p. 25–31, 2014.

Prefeitura Municipal de Mendonça. **Localização do município.** Disponível em: <<http://www.mendonca.sp.gov.br>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2016.

Promega GoTaq. **Protocolo de PCR.** Disponível em: <<https://www.promega.com.br/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-dna-polymerase-m300-protocol/>>. Acesso em: maio de 2016.

Reis Junior, F.B.; et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 33, 2002.

Rodrigues, R.R.; Brancalion, P.H.S.; Isernhagen, I. **Pacto pela restauração da mata atlântica:** referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo :LERF/ESALQ : Instituto BioAtlântica, p. 256, 2009.

Schloss, P.D.; et al. Introducing mothur: **Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities.** Appl Environ Microbiol. v.75(23), p.7537-41, 2009.

Siqueira, J.O.; Carneiro, M.A.C.; Davide, A.C.; Curi, N.; Vale, F.R. **Resposta à fósforo e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) por espécies florestais de**

diferentes grupos sucessionais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, p. 20, 1994.

Sistema Ambiental Paulista. **Fitofisionomia de Mendonça.** Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2016.

Smolyanyuk, E. V.; Bilanenko, E.N. **Communities of Halotolerant Micromycetes from the Areas of Natural Salinity.** Microbiology, v. 80, p. 877–883, 2011.

Technical Bulletin Genome Sequencer FLX System. **Amplicon Fusion Primer Design Guidelines for GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry.** 454 Sequencing Technical Bulletin No. 013-2009 Disponível em: <http://www.igsb.org/uploads/pdf/TCB09013_AmpliconFusionPrimerDesignGuidelines.pdf>. Acesso em: 28 dezembro de 2016.

Toju, H.; Tanabe, A. S.; Yamamoto, S. & Sato, H. **High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples.** v.7(7), 2012.

Vassilev, N.; Vassileva, M.; Azcon, R.; Medina, A. **Application of free and Calcium alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system.** Journal of Biotechnology. 91, p.237–242, 2001.

Vital, M.J.S.; et al. **Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima- Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology. 33, p.230-235, 2002.

Zilli, J.E. **Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo.** Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003

Zinjarde S.; Apte M.; Mohite P.; Kumar A. ***Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications.** Biotechnology Advances. v.32 (5), p.920-933, 2014.

CAPITULO III

Revisão de literatura dos principais OTUs

Resumo

Os fungos desempenham diversas funções nos ecossistemas, tais como: decomposição e ciclagem de nutrientes e podem ser avaliados como componentes de biodiversidade no solo. O conhecimento sobre a composição e fisiologia dos microrganismos no solo pode ter grande impacto nas estratégias de recuperação das áreas degradadas. O objetivo deste capítulo é contribuir na geração de dados sobre a estrutura e fisiologia dos fungos presentes na área estudada pelo projeto e na prospecção de genes de interesse para o reflorestamento com mudas nativas. A revisão de literatura do presente capítulo foi sobre os OTUs que representam acima de 1% do total das amostras, sendo o total de 17 OTUs (*Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Chaetomium sp*, *Stagonospora sp*, *Lophodermium sp*, *Candida etchellsii*, *Candida galli*, *Candida haemulonis*, *Candida neustonensis*, *Candida parapsilosis*, *Cladosporium halotolerans*, *Monascella botryosa*, *Penicillium melinii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wallemia sebi*, *Yamadazyma triangularis*, *Yarrowia lipolytica*). Os OTUs citados anteriormente tiveram registros de uso em áreas de biorremediação, decomposição de alimentos e até mesmo na área farmacêutica. Porém, com relação à presença dos mesmos atrelados a projetos de restauração, ainda temos pouca literatura sobre isso. Sendo, portanto necessário o aumento de pesquisas nessa temática, justo que a demanda por áreas de restauração florestal está crescendo nos últimos anos.

PALAVRAS CHAVE: Fungos; OTUs; Restauração.

Abstract

Fungi perform several functions in ecosystems, such as: decomposition and cycling of nutrients and can be evaluated as components of biodiversity in the soil. The knowledge about the composition and physiology of the microorganisms in the soil can have a great impact on the recovery strategies of the degraded areas. The objective of this chapter is to contribute to the generation of data on the structure and physiology of fungi present in the area studied by the project and in the prospection of genes of interest for reforestation with native seedlings. The literature review of this chapter was on OTUs representing over 1% of the total samples, with a total of 17 OTUs (*Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Chaetomium sp*, *Stagonospora sp*, *Lophodermium sp*, *Candida etchellsii*, *Candida galli*, *Candida haemulonis*, *Candida neustonensis*, *Candida parapsilosis*, *Cladosporium halotolerans*, *Monascella botryosa*, *Penicillium melinii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wallemia sebi*, *Yamadazyma triangularis*, *Yarrowia lipolytica*). The OTUs cited above had records of use in areas of bioremediation, food decomposition and even in the pharmaceutical area. However, with respect to the presence of those linked to restoration projects, we still have little literature on this. Therefore, it is necessary to increase research on this subject, fair that the demand for areas of forest restoration is growing in recent years.

KEYWORDS: Fungi; OTUs; Restoration.

1. Introdução

Segundo POUYÚ-ROJAS e SIQUEIRA (2000) atualmente existem diversos estudos envolvendo tecnologias para recuperação de solos que foram degradados por diversas atividades e que visam à formação de matas ciliares, principalmente em áreas sob a influência dos reservatórios de usinas hidrelétricas. Esses estudos analisam a viabilidade das diferentes técnicas de restauração com nativas e avaliam também a influência dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no desenvolvimento de algumas plantas (POUYÚ-ROJAS e SIQUEIRA, 2000).

A inoculação de FMAs na formação de mudas de espécies nativas favorece o desenvolvimento das mesmas principalmente em áreas com baixa fertilidade no solo. Porém, outros fatores, tal como a existência de propágulos fúngicos no solo, também influenciam no desenvolvimento das mudas (POUYÚ-ROJAS e SIQUEIRA, 2000).

Os fungos desempenham diversas funções nos ecossistemas, tais como: decomposição e ciclagem de nutrientes e podem ser avaliados como componentes de biodiversidade no solo. A avaliação dos fungos em áreas de restauração pode ser um elemento crítico na determinação do sucesso da área restaurada (Harris, 2009). Os microrganismos do solo recentemente se tornaram um foco para a ecologia da restauração e pesquisas sobre as interações entre microrganismos e plantas em ecossistemas degradados e não degradados começou a produzir resultados interessantes.

O conhecimento sobre a composição e fisiologia dos microrganismos no solo pode ter grande impacto nas estratégias de recuperação das áreas degradadas. Até algum tempo atrás, pouco se sabia sobre as comunidades microbianas no solo de áreas degradadas e nos solos com vegetação, por esse motivo é de suma importância avaliar o potencial dos mecanismos fisiológicos dos mesmos e buscar utiliza-los a favor da restauração de áreas degradadas (PESSOA FILHO, 2010).

Esse capítulo visa contribuir na geração de dados sobre a estrutura e fisiologia dos fungos presentes na área estudada pelo projeto e na prospecção de genes de interesse para o reflorestamento com mudas nativas. No decorrer do capítulo foi feita uma revisão sobre os principais OTUs encontrados na área de

estudo e em quais locais os mesmos já foram encontrados, além das formas de análises de dados usadas para quantificar e qualificar os fungos.

2. Revisão OTUs

***Alternaria* sp**

Nees ([1816](#)) apud Woudenberg et al (2013), descreve o fungo *Alternaria* pela primeira vez e sua descrição foi feita baseada pela *Alternaria tenuis* e Ness acreditava que essa era a única espécie do gênero até então.

O fungo *Alternaria* sp. tem sido descrito como organismos saprófitos (associadas a partes mortas da planta) ou parasitas de plantas (Silva e Melo, 1999). O desenvolvimento do fungo *Alternaria* sp ocorre em ambientes de clima tropical (predominantemente quente e úmido), porém encontra-se exemplares desse gênero em locais de clima temperado, com temperaturas amenas. Essa vantagem adaptativa das espécies do gênero *Alternaria*, permite que a mesma se devolva em diversos locais no mundo (Andrade, 2011). Além de estarem presentes no solo, as espécies de *Alternaria* sp podem se desenvolver em sementes de plantas também. Há relatos de estudos epidemiológicos, que apontam que fungos do gênero *Alternaria* estão associados a casos clínicos, principalmente com o desenvolvimento de asma (Sánchez e Bush, 2001).

Andrade (2011), descreve que as espécies pertencentes ao gênero *Alternaria* sp desenvolvem-se em plantas vivas e em decomposição. Aly et al (2008) descreveu as espécies do *Alternaria* como fungos que causam doenças em diversas culturas agrícolas, a patogenia é observada tanto na fase de pré-colheita quanto na fase de pós-colheita.

Santos et al (2001), identificou os fungos presentes nas sementes de *Acacia mearnsii* (arvore de ampla ocorrência no continente Africano). A contaminação das sementes e frutos florestais pode ocorrer no solo, local o qual é colonizado por diversos fungos, incluindo os fungos saprófitas e parasitas, tais como o *Alternaria* sp. Em sementes de diversas espécies observou-se a presença do fungo *Alternaria*, seja no local do armazenamento da semente ou no solo.

A doença causada pelos fungos *Alternaria* acometem todo o mundo e dentre as espécies mais afetadas por esse fungo estão às hortaliças. O fungo *Alternaria* afeta as plântulas, folhas, caules, hastes, flores e frutos de várias hortaliças tais como solanáceas, apiáceas, aliáceas, crucíferas, curcubitáceas e chichoriáceas. (Töfoli e Domingues, 2010).

Lupicka et al(1997), isolaram cepas fúngicas retiradas do solo arenoso / argiloso e dentre as espécies estava a *Alternaria* sp. Nesse estudo verificou-se que o *Alternaria* sp não desenvolve-se na presença do fósforo como única fonte de substrato.

Zafar et al(2007), descreveu a tolerância a metais pesados e ao potencial de absorção, por fungos filamentosos isolados a partir de solo agrícola contaminado com metais pesados. Os resultados mostraram a capacidade dos fungos isolados do solo crescerem na presença de metais pesados. Dentre os fungos isolados estava o gênero *Alternaria* sp.

Conceição et al (2005), isolou fungos filamentosos provenientes do rio Atibaia, SP e de refinarias de petróleo na cidade de Paulínia. Diversos fungos foram selecionados e dentre eles estava o gênero *Alternaria* sp, que demonstraram potencial para serem introduzidos em processos de biorremediação. Os resultados apresentados são promissores para o tratamento de resíduos e efluentes fenólicos.

Os relatos apresentados acima evidenciam que a *Alternaria* muitas vezes pode ser considerada um patógeno. Em nossa área de estudo a *Alternaria* foi encontrada em alta frequência nos pontos 39 e 74 e nesses pontos observamos que as mudas não apresentaram um bom desenvolvimento.

***Aspergillus* sp**

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo biólogo italiano, Pietro Micheli em 1729. O nome escolhido foi devido a sua forma, que ao ser observado em microscópio parecia com um *aspergillum*. Os *Aspergillus* pertencem à família das *Aspergillaceae*, à classe *Ascomycetes* e à subclasse *Euascomycetae*. Segundo Carvalho (2013) existe mais de 200 espécies de *Aspergillus* (CARVALHO, 2013).

Borges et al (2011), isolou e identificou os fungos que ocorrem em monocultivo de erva-mate (espécie que ocorre na Mata Atlântica), com o objetivo de encontrar espécies patogênicas na cultura de erva mate e os fungos com potenciais usos no controle de pragas. Para esse estudo foram coletadas amostras de solo no município de Campo Grande – Santa Catarina e após as análises o gênero *Aspergillus* foi encontrado em todas as estações do ano na qual as amostras foram coletadas.

Segundo Borges et al (2011), as espécies saprófitas, fitopatogênicas e entomopatogênicas ocorreram na área, demonstrando que apesar do sistema de monocultura, a diversidade dos fungos filamentosos de solo é compatível com áreas de diversas culturas, apresentando inclusive inóculos de espécies que podem ser utilizadas para o controle de pragas e doenças da erva-mate.

Banik e Dey (1982), coletaram amostras de solo do campo experimental da Universidade Calcutta em Baruipur- Índia com o objetivo de avaliar os organismos capazes de solubilizar fosfatos. Fungos e bactérias foram isolados do solo e dentre os fungos estava o gênero *Aspergillus*, que mostrou capacidade de solubilizar grandes quantidades de fosfato inorgânico. Além do fosfato, o *Aspergillus* apresentou capacidade de decompor a celulose presente no solo.

Passos et al (2009), avaliou o potencial de biodegradação do fenol por espécies do gênero *Aspergillus sp.* Para o estudo foi utilizado a espécie de fungo *Aspergillus sp.* denominada LEBM2. Após a coleta de amostras de solo contaminado por hidrocarbonetos na região de Rio Grande - Rio Grande do Sul, a *Aspergillus sp.* LEBM2 foi isolada e demonstrou através dos resultados que possui alta resistência aos compostos de fenol. Esses resultados nos mostram o potencial de biodegradação dessa espécie, sendo assim, um fungo promissor em processos de bioaugmentação.

Amostras de solo de uma região de Cerrado no estado de Minas Gerais foram coletadas para a análise, objetivando verificar a presença de fungos no mesmo e selecionar os possíveis fungos produtores de celulase. Após a coleta do solo, os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram isolados e inoculados em meio específico. Os resultados mostraram ampla ocorrência do gênero *Aspergillus* em toda a área de coleta e observou-se a produção de celulase em grande quantidade pela espécie *Aspergillus sulphureus* (MONTEIRO, 2012).

Santos et al (1997), coletou sementes de Baru (uma espécie típica do Cerrado) de diferentes pontos. As sementes analisadas estavam aparentemente saudáveis, sendo a análise baseada na sanidade das mesmas. Os resultados apontaram a presença do gênero *Aspergillus* nas sementes.

Oliveira et al (2007), coletou solos de áreas com diferentes tratamentos do bioma Caatinga no Sergipe. Os tratamentos do solo foram: solo sob a palma (*Opuntia ficus*); solo sob bancos de proteína (*Gliricida sepium*); solo sob a caatinga; solo sob pastagem. Após as análises dos solos, os resultados apontaram uma maior diversidade de fungos em solos sob a Caatinga. Fungos do gênero *Aspergillus* foram encontrados em grande quantidade em solos sob a palma.

Lima et al (2001), coletaram amostras em uma área de cultivo de amendoim para avaliar a presença de fungos no solo e a partir disso verificar qual o melhor meio de cultura para o isolamento de espécies do gênero *Aspergillus* sp. As amostras do solo foram coletadas em Seropédica - Rio de Janeiro e para identificar e quantificar as espécies de *Aspergillus* sp, foi utilizado o meio de cultura com acréscimo de NaCl (cloreto de sódio). Os resultados mostraram que as espécies de *Aspergillus* desenvolvem-se bem na presença de NaCl.

Cihangir e Sarikaya (2004), coletaram amostras de solo e isolaram os fungos encontrados para verificar a atividade lipolítica dos mesmos. Uma nova espécie do gênero *Aspergillus* foi isolada e apresentou grande produção da lipase. Após esse resultado alguns fatores que afetam a produção da lipase pelo *Aspergillus* sp. foram investigados. Após os resultados do presente estudo, conclui-se que o *Aspergillus* sp. pode ser usado como uma nova fonte microbiana potente na produção de lipases.

Os solos contêm grandes reservas de fósforo, que em grande parte vem do acúmulo de fertilizantes químicos aplicados para fins agrícolas. Entretanto, a maior parte do fósforo no solo encontra-se em forma de fósforo insolúvel e sendo assim não pode ser utilizado pelas plantas. A partir disso, Pradhan e Sukla (2005), isolaram os fungos provenientes do solo de um campo de arroz da Índia, para avaliar o potencial dos mesmos em solubilizar fosfatos insolúveis. Dois isolados de fungos foram testados quanto à eficiência de solubilização em meio sólido e líquido. Os resultados mostraram que entre os isolados que possuíam a capacidade de solubilizar fosfato insolúvel, estava o gênero *Aspergillus* sp.

Ahmad et al (2005), coletaram solos com resíduos de esgoto e efluentes industriais e a partir dessas amostras isolaram fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, para avaliar o potencial de bio sorção desses fungos com relação ao Cromo e o Cádmiio. O experimento foi realizado na Índia em uma área que foi preparada recebendo esgoto e efluentes industriais. O gênero *Aspergillus* sp. apresentou grande ocorrência na área e resistência a metais pesados. Concluiu-se que os fungos presentes no solo poluído desenvolveram tolerância e aumentaram seu potencial de bio sorção de metais.

A revisão de literatura apresentada acima evidencia que o *Aspergillus* apresenta capacidade de solubilizar grandes quantidades de fosfato. Em nossa área de estudo o *Aspergillus* foi encontrado em grandes quantidades principalmente no ponto 23 e nesse ponto observamos que as mudas apresentaram um bom desenvolvimento.

***Chaetomium* sp**

Chaetomium pertence à divisão dos ascomicetos, que são fungos que produzem esporos específicos, chamados ascósporos. São fungos que apresentam crescimento rápido, formam colônia e tem textura cotonosa, sendo que a coloração vai desde branca, depois cinza a verde-escuro, podendo chegar até a cor de marrom escuro a preto. O gênero *Chaetomium* apresenta a característica de atividade celulósica e devido a essa característica os mesmos apresentam deterioração rápida, o que os qualifica como fungos saprófitos. Foram encontrados representantes de *Chaetomium* sp em detritos vegetais, excrementos, palhas, papéis, tecidos, sementes, entre outros (GRANDI, 1992).

Amostras de raízes de duas plantas (*ctenanthe oppenheimiana* e *maranta bicolor*) foram coletadas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga por Grandi (1992), para avaliar os fungos presentes que exerçam a função de decompositores de raízes. Os resultados apontaram a presença de duas espécies de *Chaetomium* sp., que foram utilizadas em estudos posteriores.

Oliveira et al (2007), coletou solos de áreas com diferentes tratamentos do bioma Caatinga no Sergipe. Os tratamentos do solo foram: solo sob a palma (*Opuntia ficus*); solo sob bancos de proteína (*Gliricida sepium*); solo sob a caatinga;

solo sob pastagem. Após as análises os resultados apontaram uma maior diversidade de fungos foi encontrada sob o solo da Caatinga, e dentre os gêneros identificados estava o *Chaetomium* sp.

Candeias et al (2016), identificou e selecionou fungos endofíticos de raiz de sisal, que apresentaram potencial para o biocontrole do patógeno *Aspergillus niger*. Foram coletadas amostras de raízes de sisal em quatro pontos distintos em uma fazenda produtora de sisal na Bahia. Após as análises os resultados demonstraram que as espécies pertencentes ao gênero *Chaetomium* foram eficientes no controle biológico de fitopatógenos.

Cavalcanti et al (2006), coletaram amostras de solo de três pontos diferentes na região de Xingó, a vegetação típica dessa região é a Caatinga e o trabalho realizado teve como objetivo analisar a presença de fungos nessa região. As análises foram feitas tanto em camada de solo superficial, como em camadas de 20 centímetros de profundidade. As amostras foram coletadas no período chuvoso e no período de estiagem. Os resultados revelaram a presença de *Chaetomium* em camadas superficiais do solo e coletadas no período de estiagem.

Banik e Dey (1983) realizaram a caracterização dos microrganismos presente em solo aluvial, com o objetivo de caracterizar os organismos que solubilizam compostos de fosfatos. Os resultados apontaram que os fungos do gênero *Chaetomium* sp apresentaram capacidade de solubilização de compostos tais como: $AlPO_4$ (fosfato de alumínio), $Ca_3(PO_4)_2$ (fosfato de cálcio) e o ácido oxálico.

O *Chaetomium* sp pode desempenhar a função de controlador biológico de espécies patogênicas. Sales Junior et al (2006), estudou o potencial do controle biológico de *M. cannonballus* com *Chaetomium*. Foram testados substratos com infestação de *Chaetomium* em diferentes quantidades. Após isso, foram inoculadas sementes de meloeiro e as mudas resultantes dessa inoculação foram transplantadas para vasos com substrato com *M. cannonballus*. Os resultados mostraram que os substratos que receberam maiores quantidades de *Chaetomium* foram mais eficientes no controle de *M. cannonballus*.

Amostras de solo de áreas de pastagens foram coletadas na comunidade de Nappan, província de Nova Scotia Canadá. Após a coleta foram isolados os fungos pertencentes ao gênero *Chaetomium* para avaliar a produção de metabólitos tóxicos pelos mesmos. Os resultados apontaram que o *Chaetomium* sp produz algumas

micotoxinas, tais como: chetomin, chaetoglobosin e pigmentos amarelos e essas micotoxinas em alguns casos avaliados inibem o crescimento de bactérias (BREWER e TAYLOR, 1978) .

Folhas de trigo na Austrália foram coletadas e posteriormente foi avaliado o potencial do fungo *Chaetomium* com relação ao efeito inibitório em fungos *Pyrenophora tritici-repentis*. O fungo *P. tritici* causa a doença chamada de mancha amarela, que é uma das mais importantes doenças do trigo. Os resultados demonstraram que os fungos *Chaetomium* são capazes de produzir micotoxinas que inibem o *P. tritici* in vitro e podem afetar esse fungo patógeno quando ocorrer nas folhas de trigo (ISTIFADAH et al, 2006).

A revisão de literatura apresentada acima evidencia que o *Chaetomium* apresenta diversas atividades, tais como: saprófitos, controle biológico e produção de micotoxinas. Em nossa área de estudo o *Chaetomium* foi encontrado em poucos pontos, sendo que em quantidades mais significativas nos pontos 1 e 37 e nesses ponto observamos que as mudas estavam na faixa que não apresentaram um bom desenvolvimento .

***Lophodermium* sp**

Lophodermium é um [gênero](#) de [fungos](#) que pertence à família [Rhytismataceae](#). Espécies pertencentes a esse gênero encontram-se distribuídas em escala global e esse gênero é conhecido por colonizar folhas de espécies da família Pinaceae. O gênero *Lophodermium* abriga mais de 250 espécies de fungos que habitam a região foliar e tem sido estudado em espécies herbáceas (JOHNSTON, 2001).

O gênero *Lophodermium* tem sido estudado em diversos países do mundo, por viver como uma espécie endofítica em folhas de coníferas. Osorio e Stephan (1991), observaram a presença de *Lophodermium piceue* em folhas de coníferas da Noruega. Após a morte dessas folhas, seja por senescência natural ou danos provocados por seca, insetos, poluição, etc, o fungo *Lophodermium* começa a formar corpos de frutificação. Após o estudo do ciclo de vida do *Lophodermium*, ficou claro que em alguns casos, todo o ciclo pode durar menos de um ano, sendo que no início o fungo habita de forma endofítica as folhas das coníferas. Barklund (1987), relatou a presença de *Lophodermium piceae* como endófito predominante

em coníferas no Sul da Suécia. O fungo não pareceu ser patogênico e foi mais comum em folhas jovens e saudáveis, do que nas doentes.

Segundo Ortiz-Garcia et al (2003), o gênero *Lophodermium* compreende fungos ascomicetos que são patógenos e endófitos assintomáticos sobre uma diversidade de plantas hospedeiras. O gênero de fungo *Lophodermium* pertencente à ordem Rhytismatales, tem registros de ocorrência em diversas partes do mundo, e está associado a acículas de coníferas. Esse gênero inclui espécies patogênicas, que causam danos as acículas, tais como queima ou seca e inclui também espécies saprófitas em acículas mortas ou em senescência. A ocorrência do gênero *Lophodermium* no Brasil pode ser observada em diversas espécies de Pinus (AUER et al, 2001).

Koide et al (2005), estudou a sucessão de fungos em matéria de serapilheira em decomposição de *Camellia japônica* (um tipo de arbusto comum no sul do Japão). Foram estudados os fungos que atuam na decomposição da lignina e holocelulose, presentes na serapilheira. Os resultados apontaram a presença do gênero *Lophodermium* sendo capaz de atacar lignina, tendo como consequência a perda de massa da mesma.

O *Lophodermium* foi encontrado em 10 pontos, sendo que em quantidades mais significativas nos pontos 45, 63 e 76. Observamos que o *Lophodermium* foi encontrado tanto em áreas na que apresentaram um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas, como em áreas em que não houve um bom desenvolvimento.

***Stagonospora* sp**

Stagonospora é um gênero que pertence à família Phaeosphaeriaceae. Várias das espécies neste gênero são patógenas de plantas.

Ernst et al (2003) avaliaram a presença de fungos endofíticos em *Phragmites australis* (conhecida como Caniço, um planta que se desenvolve em áreas úmidas e margens de corpos d'água). As amostras de *P. australis* foram coletadas em áreas ao redor do Lago Constance. Após a coleta das amostras, os fungos endófitos foram isolados a partir das sementes, e dentre os fungos isolados estava presente o gênero *Stagonospora*.

Ernst et al (2003), observou que os fungos *Stagonospora* reforçaram a biomassa das sementes de *P. australis*, portanto, podem proporcionar um vigor maior à espécie, pois quando os derivados de sementes germinassem e estabelecessem novas mudas de caníço, as mesmas nasceriam mais reforçadas. Além da transmissão do *Stagonospora* pelas sementes, as mudas jovens estariam infectadas novamente após serem plantadas em solos infectados com *Stagonospora*. Conclui-se que os endófitos de *Stagonospora* transportadas por sementes podem fornecer uma vantagem competitiva durante o estabelecimento das novas mudas de caníço.

Em trabalho semelhante com relação a presença de fungos endofíticos, foi observado a presença com espécies de *Salicornia perennis* (também chamado de espargos do mar, um tipo de planta suculenta halofita) de espécies do gênero *Stagonospora* (Petrini e Fisher, 1986). Fisher e Punithalingam (1993), descrevem uma nova espécie endofítica de fungo *Stagonospora* em uma samambaia (*Pteridium aquilinum*).

Diversos trabalhos relatam a ocorrência de uma espécie de *Stagonospora* como patógenos de trigo. *Stagonospora nodorum* é um fungo que causa a doença denominada de septoriose, mancha das glumas e dos nós do trigo ou mancha de *Stagonospora*. O *Stagonospora* afeta desde o desenvolvimento inicial até o desenvolvimento final do trigo, causando grandes perdas nas lavouras de cultivo em diversos lugares no mundo. MÜHL (2006), realizou um estudo em casa de vegetação e em campo para analisar a resistência da mancha de *Stagonospora* causada por *Stagonospora nodorum* em diferentes genes de trigo e ver os efeitos da doença com relação ao rendimento do mesmo, sendo essa análise testada em diferentes estágios fenológicos.

Amostras de solo de dois municípios em Minas Gerais e um município do Mato Grosso foram processadas para a extração de cistos de *H. glycines*. Observou-se a presença de fungos do gênero *Stagonospora* parasitando os cistos de *H. glycines*. A presença dos fungos no solo parasitando esses cistos tem papel importante como reguladores de nematoides no solo (SILVA et al, 1994).

Estudos apontam a aplicação de espécies do gênero *Stagonospora* como controladores biológicos de espécies como *Convolvulus arvensis* (conhecida como

trepadeira de campo), que é uma das ervas daninhas mais importantes a nível mundial (PFIRTER e DÉFAGO, 1998).

Em nossa área de estudo a *Stagonospora* foi encontrada apenas no ponto 57. Nesse ponto observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que não apresentaram um bom desenvolvimento, com elevado índice de mortalidade de mudas.

Candida neustonensis

A revisão de literatura feita sobre a espécie de *Candida neustonensis* revelou poucas informações sobre a mesma, sendo o único relato encontrado feito a partir de um estudo feito na superfície do mar de Taiwan. Talvez essa espécie já tenha sido encontrada em outras áreas, porém era classificada como outra espécie. O relato feito sobre a descoberta da nova espécie de cândida está descrito nos parágrafos abaixo.

Chang et al (2010), descreveu uma nova espécie de levedura ascomiceto, denominada de *Candida neustonensis*. Em seu estudo foi proposto quatro cepas (SN92T, SN47, SJ22, SJ25) que foram isoladas de uma pequena camada da superfície do mar em Taiwan. Estas quatro cepas de levedura foram morfológicamente, fisiologicamente e filogeneticamente idênticas umas as outras. As quatro cepas de *C. neustonensis* foram isoladas a partir de uma amostra de água do mar, coletadas da microcamada da superfície do mar em Keelung, em Taiwan.

Chang et al (2010), no início de suas observações devido as características filogenéticas acreditava ser uma espécie pertencente ao clado *Pichia guilliermondii*. Porém, após as análises moleculares, conclui que se tratava de uma nova espécie, com base em suas características fisiológicas e por apresentar mais de 4% divergência em relação aos seus parentes. Os resultados sugerem que *C. neustonensis* é uma nova espécie, filogeneticamente distintos de *C. xestobii*, *C. fukuyamaensis* e *P. guilliermondii*.

A *Candida neustonensis* foi encontrada em 12 pontos, sendo que em quantidades mais significativas nos pontos 17,19 e 21. Observamos que a *Candida neustonensis* foi encontrada tanto em áreas na que apresentaram um bom

desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas, como em áreas em que não houve um bom desenvolvimento.

Candida etchellsii

A partir da revisão de literatura sobre a espécie *Candida etchellsii*, diversos trabalhos apontam a importância dessa espécie para a indústria alimentícia. Foi encontrada a presença da *C. etchellsii* na melhora da qualidade e do sabor do molho de soja, na produção de queijo feito a partir de leite de cabra e além da indústria alimentícia, foi observado a presença da *C. etchellsii* em folhas de cana de açúcar, em solo da região Amazônica e também para biorremediação de áreas contaminadas.

No trabalho de Feng et al (2012), eles testaram a inoculação da *Candida etchellsii* em duas etapas. O processo descrito neste estudo foi provado ser uma alternativa viável para a aplicação na indústria alimentícia, visando a melhoria do sabor e qualidade do molho de soja. Segundo Feng et al (2012), a *Candida etchellsii* apresenta alta tolerância ao sal, sendo portanto uma levedura com ampla aplicação na produção de molho de soja.

No trabalho feito por Ancasi e Maraz (2014), em uma região da província de Jujuy na Argentina, foram analisadas 30 amostras de queijos frescos de leite de cabra e foi encontrado a presença de diversas espécies de leveduras, dentre elas a *Candida etchellsii*. A presença no queijo de leveduras fermentadoras, proteolíticas e lipolíticas sugerem sua importante contribuição para o sabor dos queijos. Algumas cepas de *Candida etchellsii* produzem características tecnológicas desejáveis.

Amostras de folhas de diferentes plantas foram coletadas com o objetivo de identificar a presença de fungos endofíticos e após as análises observou-se a presença de *Candida etchellsii* nas folhas de cana de açúcar (PINOTTI, 2010).

Além da área alimentícia, observou a presença de *C. etchellsii* em solo. No estudo realizado por Vital et al (2002), eles estudaram duzentos e quarenta linhagens de leveduras que foram isoladas de amostras de solos da Estação Ecológica de Maracá, na Amazônia. As espécies foram identificadas pelo método convencional e por meio de análises moleculares. Das espécies analisadas 82% das

leveduras eram ascomicéticas e 18% basidiomicéticas. As espécies dominantes foram *Candida etchellsii*, *Candida famata*, *Candida robusta*, *Candida rugosa*, *Candida valida*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa*. O objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência de leveduras com atividades micocinogênicas no solo da Amazônia.

As leveduras isoladas podem ser usadas para a biorremediação de resíduos contendo crômio, uma vez que parecem ter o potencial para acumular o metal tóxico do ambiente. Muneer et al (2007), coletou águas residuais de um curtume em Kasur, e observou-se que a *C. etchellsii* apresenta resistência ao Cr6+ (crômio hexavalente). As estipes isoladas da *C. etchellsii* foram inoculadas em um meio de cultura e apresentaram capacidade de remoção de 65-80% do Cr6 + após o período de 72 horas de incubação.

Muneer et (2009), avaliou a combinação de leveduras (*C. etchellsii*), bactérias e protozoários na biorremediação de crômio em águas residuais de indústrias de curtumes. Verificou-se que os três tipos de microrganismos cultivados em conjunto num meio de cultura poderia coletivamente absorver 90% de Cr6 (crômio hexavalente). Portanto, a eficiência na remoção do crômio apresentada por essa combinação é superior quando comparada apenas com a capacidade isolada da *C. etchellsii* em remover o crômio.

A revisão de literatura sobre a *Candida etchellsii* nos mostra que o mesmo foi encontrado em ambientes com alta concentração de sal. Em nossa área de estudo a *Candida etchellsii* foi encontrada em 8 pontos, sendo que em quantidades mais significativas nos pontos 37 e 05. Nesses pontos observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que não apresentaram um bom desenvolvimento, com elevado índice de mortalidade de mudas.

Candida galli

A *Candida galli* pertence ao clado da *Yarrowia*, que possui um pequeno número de espécies sexuadas e assexuadas de levedura ascomicetos, incluindo a espécie de *Yarrowia lipolytica* (sexuada) e de algumas espécies assexuadas, tal

como a *C. Galli* (LIMTONG, 2008). A *C. galli* é filogeneticamente relacionada com *Y. lipolytica*, mas com diferenças genéticas marcantes que permitem a separação em duas espécies. Sendo a *C. galli* a única espécie capaz de crescer em meio isento de vitamina (SÁNCHEZ et al, 2014).

Observou-se a presença de *Candida galli* na área alimentícia com produção de laticínios e na produção de carne, em amostras de água de florestas de manguezal, na área de biorremediação, sendo a levedura capaz de transformar compostos químicos. Há também estudos relacionados a patogenicidade em humanos.

Ozturk (2015), durante o processamento da pastirma (um tipo de carne bovina) encontrou a *Candida galli* (11%). Ainda na área alimentícia, assim como a *Yarrowia*, a *C. galli* foi encontrada na carne crua, no leite, queijo e queijo cottage (NAGY, 2014).

Péter et al (2004), coletou amostras do peito de frango e do fígado de galinha, e posteriormente fez as análises. Os resultados apontaram que a levedura predominante apresentava diferença genética significativa quando comparada com cepas da *Yarrowia lipolytica*, além da diferença genética observou também uma diferença nas propriedades fisiológicas das cepas estudadas. A partir de então, as pas estudadas receberam a descrição como sendo uma nova espécie de levedura anamórfica e a essa levedura foi dado o nome de *Candida galli*.

Em um estudo realizado na Província de Phang Nga, Tailândia, foi coletado e isolado através do processo de filtração, amostras de água de duas florestas de manguezal. Duas estirpes de leveduras foram analisadas e pelo grau de semelhança apresentado pela sequência de pares de nucleotídeos, concluiu-se então ser espécies de *Candida galli* (LIMTONG, 2008).

Segundo Ashengroph et al (2011), a estirpe de *Candida galli* PGO6 foi encontrada em água contaminada com petróleo em uma região do Golfo Pérsico, sendo essa levedura capaz de formar vanilina e ácido vanílico durante a biotransformação do isoeugenol. Este estudo foi a primeira evidência para a biotransformação do isoeugenol em vanilina e ácido vanílico por uma estirpe de levedura.

Sánchez et al (2014), descreveu as propriedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e nutricionais de uma cepa isolada a partir de uma amostra de unhas

em um caso de *tinea unguium*. Após as análises os resultados mostraram ser cepas de *C. galli*.

Em nossa área de estudo a *Candida galli* foi encontrada apenas no ponto 74. Nesse ponto observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que não apresentaram um bom desenvolvimento, com elevado índice de mortalidade de mudas.

Candida haemulonis

A *Candida haemulonis* foi descrita em diversas áreas, tais como: pântanos e turfas, em estudos de degradação de fenol, em raízes de mandioca e além das áreas descritas anteriormente, observou-se a presença desta levedura em infecções de glândula mamária e também em casos clínicos, como sendo uma levedura que apresenta potencial de infecções em corrente sanguínea.

Thormann e Rice (2007), fizeram uma revisão de literatura com ênfase nos fungos que ao longo dos últimos anos têm sido relatados em áreas de pântanos e turfas (turfa é uma substância formada pela decomposição de vegetais acumulados em terrenos alagadiços) e resumiu quais as funções que desempenham nesses importantes ecossistemas. Para reunir as informações sobre os fungos conhecidos como turfeiras, os pesquisadores revisaram jornais micológicos e ecológicos e em uma de suas revisões encontraram a presença de *Candida haemulonis* em áreas de pântanos em regiões do Canada e da Rússia.

Segundo Franckin (2016), bactérias, fungos e algas podem estar envolvidos em casos de mastite bovina. Dentre os fungos, o gênero *Candida* é um dos mais descritos em episódios da doença. Os fungos filamentosos estão amplamente distribuídos na natureza, mas as leveduras são mais frequentemente relacionadas às infecções da glândula mamária. A *C. haemulonis* foi encontrada em cerca de 3% das amostras de leveduras que foram isoladas.

Sivasubramanian e Namasivayam (2015), desenvolveram estudos relacionados à degradação de fenol utilizando consórcio microbiano isolado a partir de fontes ambientais. Um consórcio microbiano constituído por cinco estirpes apresentou bons resultados na de degradação de fenol. O consórcio poderia

degradar até 99% de fenol após 72 h de incubação. Esse consórcio consistiu de espécies de *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida haemulonii* e *Streptomyces alboflavus*.

Ferreira et al (2010), identificou a presença de leveduras em uma microflora microbiana a partir de raízes de mandiocas. Para identificar as leveduras aplicou-se técnicas de identificação molecular. Foram isoladas 24 estirpes a partir das raízes e posteriormente foram agrupadas e identificadas em cinco grupos, sendo um deles a *C. haemulonii*.

Cendejas-Bueno et al (2012), descrevem a *Candida haemulonii* como uma das espécies de leveduras raras que podem ser isoladas de fontes clínicas humanas. A espécie foi descrita pela primeira vez a partir do intestino de um peixe grunhido azul-listrado em 1962. O primeiro isolamento desta levedura a partir de um ser humano, foi feita a partir do sangue de um paciente com insuficiência renal, em 1984. Desde então, vários casos de infecções devidas a esta levedura têm sido descritos na literatura, variando de superficial a infecções profundas. Casos de doenças fúngicas relacionada ao cateter, infecções da corrente sanguínea, osteíte e surtos em unidades de terapia intensiva têm sido relatados recentemente.

A revisão de literatura sobre o *Candida haemulonii* nos mostra que o mesmo pode ser aplicado em áreas contaminadas (biorremediação) e há evidências deste fungo em solos úmidos.

Em nossa área de estudo o *Candida haemulonii* foi encontrado em 4 pontos, sendo que em quantidades mais significativas nos pontos 21 e 43. Nesses pontos observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que apresentaram um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas.

Candida parapsilosis

Diversos estudos apontam a presença da *Candida parapsilosis* em áreas de remediação ambiental, solo, água do mar e como agente de transmissão de doença, principalmente em ambientes hospitalares.

Azcón et al (2009), em seus estudos, observou o uso de plantas para fins de biorremediação, devido a sua capacidade de tolerar metais pesados. A combinação entre fungos micorrízicos arbusculares e microrganismos saprófitos benéficos,

podem contribuir para fitorremediação, através de estratégias, tais como sequestro ou acumulação de metais pesados, mantendo as concentrações de metais nas plantas abaixo dos valores críticos e com isso melhora a nutrição e o crescimento das plantas.

Azcón et al (2009), realizou um experimento a partir da inoculação de cepas microbianas adaptadas a metais pesados, tais como: bactérias (*Bacillus cereus*), leveduras *Candida parapsilosis* e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). E após a inoculação, observou-se que as mesmas apresentaram eficácia no crescimento e na nutrição das plantas em um solo multi-contaminado. Além da questão nutricional, foi avaliado se os microrganismos apresentavam capacidade para diminuir a translocação dos metais do solo para as raízes das plantas. Segundo Azcón et al (2009), as plantas inoculadas com FMA e *C. parapsilosis* apresentaram maior desenvolvimento simbiótico e acumulam mais Mn e Zn, indicando a habilidade de biassorção por estas cepas.

Arenz et al (2006), realizou um estudo sobre a diversidade de fungos em solos e madeira na região do Mar Ross da Antártica. Os microrganismos foram identificados a partir de amostras do solo, madeira e outros locais na região do Mar de Ross da Antártica, utilizando os métodos convencionais de meio de cultura ou identificação molecular. Dentre as amostras analisadas, foi identificado leveduras e fungos filamentosos nas amostras do Vale Seco, da montanha Transantártica e nos solos da área do Mar de Ross. Após a identificação verificou se a presença da *Candida parapsilosis* nas amostras de Vale Seco.

Costa (2006), realizou coletas de amostras de solo no período seco e chuvoso em três municípios do semi-árido baiano, Mucugê, Ipirá e Paulo Afonso, com o intuito de realizar um levantamento a cerca das espécies de leveduras do solo semi-árido da Bahia. As leveduras coletadas nas amostras do solo foram isoladas em meio de cultura e posteriormente foi realizada a identificação da mesma através das características morfofisiológicas. E dentre as espécies identificadas, foi encontrada a *C. parapsilosis*.

Loureiro et al (2005), com o objetivo de isolar e identificar as leveduras presente no solo e na água do mar das praias de Bairro Novo e Casa Caiada, Olinda, Pernambuco, Brasil, coletou 32 amostras de solo e água em ambas as praias durante o período seco e período chuvoso. Foram obtidas 292 amostras de

leveduras, distribuídas em quatro gêneros e 31 espécies. A *C. parapsilosis* foi encontrada na superfície da areia no período chuvoso, porém no geral representa baixa frequência quando comparada a outras espécies.

Viragh et al (1993), clonou e sequenciou dois genes da *C. parapsilosis* Candida e observou que as mesmas codificam ácido proteases. A *Candida parapsilosis* separa o ácido protease (ACP), quando cultivada na presença de albumina de soro bovino como a única fonte de nitrogênio.

Pacheco et al (2015), avaliou o potencial de patogenia da *C. parapsilosis*, relatando que a mesma é um importante causador de infecções hospitalares. Na Europa e Ásia, os casos de candidíase provocados por *C. parapsilosis* superam o número de casos ocasionados por *C. albicans*. No Brasil, é responsável por 25,8% dos casos de candidíases. A *C. parapsilosis* já é considerada a segunda espécie mais comum de Candida.

A revisão de literatura sobre a *Candida parapsilosis* nos mostra que o mesmo foi encontrado em solos semi árido. Em nossa área de estudo a *Candida parapsilosis* foi encontrada em 12 pontos, sendo que em quantidades mais significativas nos pontos 59 e 74, e nesses pontos observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que não apresentaram um bom desenvolvimento, com elevado índice de mortalidade de mudas.

Cladosporium halotolerans

O gênero *Cladosporium* pertence à família [Davidiellaceae](#), possui aspecto aveludado e coloração escura, tem ampla ocorrência como patógenos em plantas. Bensch et al (2012), fez uma revisão de literatura do gênero *Cladosporium*, com informações detalhadas a respeito da filogenia, sistemática e ecologia das espécies pertencentes a esse gênero. A espécie *Cladosporium halotolerans* é uma espécie sapróbia, que foi relatada em diversos ambientes, tais como: água com grande quantidade de sal em regiões subtropicais, em ambientes internos, gelo ártico, lesões humanas e animais, plantas, rochas, madeira de coníferas e moldura da janela e raízes micorrízicas.

Al-Musallam et al (2011), observou a diversidade de fungos em ambientes hipersalinos que habitam a área de sabkha no Kuwait, onde foi realizada coleta de amostras de solo e água em um período de cinco meses. As amostras foram coletadas de um lago que apresenta oscilação com relação à quantidade e a qualidade da água. Após a coleta das amostras foram feitas as análises físicas e químicas e o isolamento dos fungos do solo e da água. Os resultados apontaram a presença do *Cladosporium halotolerans* nas amostras, que são leveduras halotolerantes, ou seja, sobrevivem em ambientes com grande quantidade de sal.

Heinrichs et al (2013), em seu estudo realizou a análise de biofilmes e de fungos pigmentados escuros que ocorrem nas torneiras de água doméstica, considerando que estes locais são zonas potenciais de entrada para esses microrganismos. As amostras tomadas a partir de todo o tratamento de água e sistema de distribuição, bem como da canalização doméstica e sistemas sanitários foram analisadas e a *C. halotolerans* foi encontrada em tratamento de água, em tubulações, biofilmes e pias. Em análises de superfícies de vidro, observou-se a presença de *C. halotolerans* em biofilmes. A *Cladosporium halotolerans* não apresenta relevância clínica.

Oliveira et al (2014), coletou folhas de *Vitis labrusca* (um tipo de uva) no mês de fevereiro em 2010 no município de São Vicente Ferrer - Pernambuco. Os resultados revelaram a presença de *Cladosporium halotolerans* dentro das folhas (endófito).

A análise de três fontes de água potável para a identificação de fungos e leveduras filamentosas realizado por Pereira et al (2009), revelou a presença de três gêneros dominantes, sendo eles: *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*. A análise foi feita em água da superfície, lençóis freáticos e água de nascente e o resultado relatado apontou a presença de *C. halotolerans* em água de nascente.

Cladosporium halotolerans foi relatada em um estudo realizado por Smolyanyuk e Bilanenko (2011), na qual eles avaliaram as comunidades de microrganismos halotolerantes em áreas de salinidade natural. As áreas estudadas foram águas hipersalinas, solos áridos salinos e bancos de sal natural. A *C. halotolerans* foi encontrada em amostras isoladas retiradas do solo da costa do Mar Negro da Bulgária.

A revisão de literatura sobre o *Cladosporium* nos mostra que o mesmo foi encontrado em ambientes salinos e é um fungo sapróbio. Em nossa área de estudo o *Cladosporium* foi à espécie mais encontrada nos pontos amostrados, dos 18 pontos que foram sequenciados, em 16 pontos encontramos representantes do *Cladosporium*. Observamos que o *Cladosporium* foi encontrado tanto em áreas na que apresentaram um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas, como em áreas em que não houve um bom desenvolvimento.

Monascella botryosa

A respeito da *Monascella botryosa*, há poucos relatos a cerca desta espécie. A literatura até em então apresenta pouca informação, sendo necessário ampliar os estudos sobre esse gênero e espécie. A *Monascella botryosa*, segundo Guarro e Arx (1986), tem características intermediárias entre a ordem Pezizales e os Eurotiales, tem características da familia Monascaceae Schroter ou Onygenaceae, sendo essa classificação uma questão de escolha, pois ambas as famílias são indistinguíveis.

Guarro e Arx (1986), em Mallorca na Espanha coletaram amostras de solo dessa região e após análises observou-se que a espécie encontrada nesse solo não pertencia a nenhuma espécie até então descrita, foi então que descobriram uma nova espécie de fungo. Posteriormente essa espécie recebeu o nome de *Monascella botryosa*.

A revisão de literatura sobre a *Monascella botryosa* evidencia a presença do mesmo em solos. Em nossa área de estudo a *Monascella botryosa* foi encontrada apenas no ponto 78, e nesse ponto observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que apresentaram um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas.

Penicillium melinii

O *Penicillium melinii* é uma espécie de fungo anamórfica que pertence ao gênero *Penicillium* e que tem grande ocorrência em estudos relacionados a solo.

No trabalho apresentado por Ahmed e Holmstrom (2015), foi realizado um estudo sobre a associação dos microrganismos com as superfícies minerais, sendo essa associação uma questão importante para a compreensão de processos como intemperismo mineral, biomineralização, biorremediação e bioincrustação. Para o estudo em questão foram isolados alguns microrganismos a partir de um perfil de solo podzol da região central da Suécia, sendo um desses microrganismos o *Penicillium melinii*. Os resultados por Ahmed e Holmstrom (2015), apontaram que o *P. melinii* apresenta a dissolução do biotite (mineral composto por ferro, magnésio, potássio e alumínio) tanto anexado quanto solto as superfícies minerais.

Amostras de solos do município de Tupanatinga, na região do Parque Nacional do Catimbau Pernambuco, foram coletadas para a análise de microrganismos. As análises do solo demonstraram a presença de grande quantidade de fungos do gênero *Penicillium* e sendo uma das espécies identificadas o *Penicillium melinii* (GALVÃO et al, 2013).

Além do município de Tupanatinga, amostras do solo do Parque Nacional do Catimbau/Pernambuco, foram coletadas no município de Buique. Cruz et al (2013), estudou as espécies de *Penicillium* na área da Caatinga e na área da Mata Atlântica. Após as seis coletas realizadas nessas áreas, foram feitas as análises macro e microscópicas. Os resultados apontaram a presença de *P. melinii* em solos da caatinga.

Em estudo realizado em uma floresta boreal com madeira mista em Quebec-Canadá por Bellis et al (2007), foram coletadas amostra de solos dessa área para avaliar a influência das associações de fungos microscópicos com a comunidade vegetal. Foram realizadas análises multivariadas, sendo que os resultados apontaram que a variação em associações de fungos microscópicos foi explicada pela composição de espécies de plantas em sub-bosque, pela composição química do solo e pelas espécies de árvores dossel. Dentre os fungos presentes nas amostras de solo, o *Penicillium melinii* estava presente em mais de 50% das amostras analisadas. O *Penicillium melinii* tem afinidade com solos ácidos, e o pH das amostras de solo do local de estudo é em torno de 4,9.

A composição da comunidade de fungos foi avaliada em solo dominado por *Fagus orientalis*, *Quercus petraea* e *Pinus nigra*, na região de Trácia na Turquia. Embora o *P. melinii* tenha aparecido nos solos dos três locais avaliados, houve

variação acentuada na composição da comunidade de fungos entre os solos dos três locais, devido principalmente à variedade das espécies de árvores (KARA e ASAN, 2007).

Pasqualetti et al (2012), realizou um estudo correlacionando áreas contaminadas por metais pesados com a comunidade de fungos. A área de estudo pertenceu a um local de mineração no sudoeste da ilha de Sardenha-Itália, na qual eram realizadas atividades de extração de chumbo. O *P. melinii* foi encontrado nas análises de solo poluído. Os resultados das análises do solo apontaram uma diminuição significativa na abundância de fungos em solos poluídos.

O fungo *P. melinii* foi isolado a partir de colônia de *Ascidium* sp, através da coleta de amostras de água da Costa das Ilhas Shikotan, localizada no Mar de Okhotsk. O objetivo do estudo de Balabanova et al (2012), foi descrever a purificação e a caracterização da nuclease a partir do fungo *Penicillium melinii*, sendo que os resultados podem fornecer informações sobre o seu possível papel fisiológico e ecológico no ambiente marinho. A partir dos experimentos realizados em laboratório foi possível descrever um novo método econômico e eficaz para obter uma nuclease específica de cadeia simples, a partir do meio de cultura inoculado com o fungo *P. melinii*.

A revisão de literatura sobre o *Penicillium melinii* evidencia a presença do mesmo em solos ácidos e também mostra a presença em superfícies minerais. Em nossa área de estudo o *Penicillium melinii* foi encontrado em 10 pontos, sendo que em quantidades mais significativas no ponto 21, e nesse ponto observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que apresentaram um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas.

Rhodotorula mucilaginosa

O gênero *Rhodotorula* é composto por leveduras pigmentadas, que pertencem a divisão dos Basidiomicetos e a família dos Sporidiobolaceae. Espécies de *Rhodotorula* são encontradas em diversos ambientes, tais como: ar, solo, água do mar, plantas, produtos lácteos, etc.

Menna (1966), retirou amostras de solo da Groelândia e da Antártica e observou a presença da *Rhodotorula mucilaginosa*. As leveduras isoladas de

Rhodotorula a partir de amostras de solo da Antártica eram de espécies que não conseguiam usar o nitrato de nitrogênio como fonte de vitamina, portanto precisam de uma fonte externa. As leveduras no solo da Antártica apresentaram uma dependência das plantas para a sua alimentação.

Connell et al (2008), coletou amostras de solo de dois picos de montanha de South Victoria Land, Antártica. Após a análise do solo observou-se a presença de leveduras, sendo que a maior parte das leveduras analisadas pertencia às espécies dos basidiomicetos, sendo uma dessas espécies a *Rhodotorula mucilaginosa*. A *R. mucilaginosa* já foi isolada em diferentes habitats, tais como: picos de montanhas na Antártica, em águas hidrotermais no Mid-Atlantic, no Mar do Pacífico e geleiras do Ártico.

Em experimento realizado em casa de estufa, foi estudada a relação entre a *Rhodotorula mucilaginosa* e os fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus mosseae*) e (*Gigaspora rósea*), onde se avaliou os resultados envolvidos entre essas interações (Fracchia et al, 2003). Os resultados apontaram o aumento no comprimento das hifas do *G. mosseae* e *G. rósea*. O exsudato produzido pela *R. mucilaginosa* estimulou o crescimento de hifas de *G. mosseae* e *G. rosea*. Portanto, conclui-se que o aumento do comprimento das hifas de *G. mosseae* coincidiu com um aumento da exsudados produzidos pela *R. mucilaginosa*.

O potencial da levedura *R. mucilaginosa* pode ser aplicada em produção comercial em viveiros de mudas, visando melhorar a colonização de alguns fungos inoculados. Outro efeito benéfico, pode ser através da aplicação das exsudações de *R. mucilaginosa* na raiz das plantas e que conseqüentemente produzirá efeito sobre o crescimento da mesma. Isso indica a possibilidade de utilizar a *Rhodotorula mucilaginosa* para aumentar a eficácia dos fungos micorrízicos arbusculares no solo (FRACCHIA ET AL, 2003).

Polyakova et al (2001), coletou amostras de solo em uma área de solo hidromórfico na Sibéria e em solos hidromórficos em florestas de tundra no Alasca. Os resultados das análises revelaram a quantidade de 23 espécies de leveduras, pertencentes a diversos gêneros, dentre eles o *Rhodotorula*. As amostras de solos hidromórficos da Sibéria mostrou ser dominada por espécies de fungos basidiomicéticos, tais como a *Rhodotorula mucilaginosa*. As duas áreas analisadas mostraram que há diferença entre as comunidades de fungos e que os fatores

geográficos podem servir para uma análise mais confiável com relação à diversidade de fungos no solo, quando comparados somente com as análises físico-químicas desses solos.

Os microrganismos tais como fungos e bactérias tem grande aplicabilidade na biorremediação de áreas contaminadas e nas ultimas décadas esses estudos vem sendo aprimorado. Sabe-se que o benzeno é um composto químico amplamente utilizado, que é tóxico para os humanos e provavelmente também para as plantas. Devido a esse potencial de contaminação, Wouter et al (1992), realizou um estudo para demonstrar o papel de leveduras na degradação de compostos de benzeno, sob condições naturais do solo. Foram coletadas amostras de solo com compostos de benzeno e posteriormente foram isoladas as leveduras desse solo. Várias espécies de leveduras foram isoladas, dentre elas a *Rhodotorula mucilaginosa*. Todas as leveduras isoladas apresentaram potencial para a remoção de compostos de benzeno.

Loureiro et al (2005), coletou amostras de solo e de água de duas praias da cidade de Olinda, Pernambuco, com o objetivo de estudar as leveduras encontradas no solo e na água do mar destas duas praias. As amostras foram coletadas em dois períodos distintos: no período da seca e no período da chuva no ano de 2001. Após a coleta, as leveduras foram isoladas e analisadas e os resultados mostraram a presença de 31 espécies, sendo uma delas a *Rhodotorula mucilaginosa*. A *R. mucilaginosa* foi encontrada nas duas praias, tanto no solo quanto na água.

A revisão de literatura sobre a *Rhodotorula mucilaginosa* nos mostra que a mesma indica a possibilidade de ser utilizada para aumentar a eficácia dos fungos micorrízicos arbusculares no solo. Em nossa área de estudo a *Rhodotorula mucilaginosa* foi encontrada em 8 pontos, em quantidades mais significativas nos pontos 59 e 17, e esse pontos estavam na faixa do plantio que não apresentou um bom desenvolvimento das copas.

Wallemia sebi

Jančíč et al (2015), fez uma revisão taxonômica da *Wallemia sebi*, que pertence ao gênero *Wallemia*, sendo que essa é a espécie mais isolada e estudada

do gênero. A *W. sebi* é encontrada em estudos que envolvem a deterioração dos alimentos com baixa atividade de água, associado a doenças pulmonares e alergias pela disseminação dos esporos no ar. Pode também ser encontrada em peixes, geleias e esponjas marinhas. A grande variedade de locais em que podemos encontrar a *W. sebi* nos mostra que ela pode adaptar sua fisiologia para sobreviver em diferentes ambientes (PADAMSEE et al, 2012).

Os fungos basidiomicetos do gênero *Wallemia*, que compreendem as *Wallemia ichthyophaga*, *Wallemia Muriae* e *Wallemia sebi*, são organismos xerofílicos (crescem em condições reduzidas de atividade de água). Essas leveduras apresentam adaptações morfológicas que permitem sobreviver em elevadas concentrações de NaCl (cloreto de sódio) e essas adaptações podem ser observadas no aumento da espessura e no tamanho da parede celular. Kuncic et al (2012), em seu estudo analisou o crescimento dos fungos do gênero *Wallemia* em baixas e altas concentrações de glicose e mel. O resultado da *Wallemia sebi* mostrou bom crescimento em condições de baixa quantidade de água e elevadas concentrações de glicose e mel. Com relação às alterações nas estruturas morfológicas, observou-se tamanhos menores das hifas e mudanças na espessura da parede celular. Porém, ficou evidente que a *W. sebi* desenvolve-se bem em ambientes com grande quantidade de açúcar. Esse estudo fornece informações importantes para as indústrias de alimentos, pois os fungos tolerantes a presença de açúcar frequentemente aparecem em processos de fermentação e deterioração dos alimentos (KUNCIC et al, 2012).

Oleinikova et al (2010), realizou um estudo no qual avaliou a produção de ácido graxo por leveduras. As amostras foram retiradas de ambientes marinhos, sendo a *Wallemia sebi* coletada no Mar do Japão. Todas as cepas estudadas produziram ácido oleico e linoleico, além desses ácidos a *W. sebi* produziu ácido dicarboxilicos. Os resultados mostraram que as cepas estudadas são capazes de produzir ácidos graxos normais e ramificados.

A revisão de literatura sobre a *Wallemia sebi* nos mostra que a mesma foi encontrado em ambientes xerofílicos. Em nossa área de estudo a *Wallemia sebi* foi encontrada em 11 pontos, sendo que em quantidades mais significativas no ponto 17. Nesse ponto observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que não

apresentaram um bom desenvolvimento das copas, com elevado índice de mortalidade de mudas .

Yamadazyma triangularis

Yamadazyma triangularis que pertence família Pichiaceae e ao gênero *Yamadazyma*, foi descrita pela primeira vez com o nome de *Pichia triangularis* (SMITH e VEGTE, 1986), e Kurtzman e Suzuki (2010), redefiniram o nome desse fungo para *Yamadazyma triangularis*. A literatura indica a presença desse fungo em condições de alta concentração de sal, em alimentos processados e água do mar.

Smith e Vegte (1986), estudaram um determinado tipo de cepa que produzia ascósporos em forma de chapéu e a essa espécie foi atribuído o nome de *Pichia triangularis* sp. O nome triangular foi devido a suas cepas não ser parecida com nenhuma espécie de *Pichia* vista antes, pois as células piriformes eram triangulares. Essa nova espécie foi cultivada em meio de cultura utilizando fontes de nitrogênio e posteriormente foram detalhadas suas características fisiológicas. Com relação às características fisiológicas, observou-se a fermentação e o crescimento de vários compostos de carbono.

Stellato et al (2015), relatou a contaminação microbiana em fábrica de processamento de alimentos. Foram coletadas amostras de diferentes tipos de queijo produzidos na fábrica. Os resultados mostraram a presença em grandes quantidades da levedura *Yamadazyma triangularis*. A *Y. triangularis* foi predominante nas amostras de queijo. Ciafardini et al (2013), estudou a presença de microrganismos em azeite em 23 produtores localizados na Itália. As amostras foram coletadas e analisadas e os resultados apontaram a presença de leveduras e dentre as leveduras encontramos a *Y. triangularis*.

Russel, Paterson e Lima (2016), relataram a presença de *Y. triangularis* isoladas de ambientes salinos, incluindo o tamari (um tipo de molho de soja), alimentos em conserva tais como cogumelos chineses e em água do mar.

A revisão de literatura sobre o *Yamadazyma triangularis* nos mostra que o mesmo foi encontrado em ambientes salinos. Em nossa área de estudo o *Yamadazyma triangularis* foi encontrado em 8 pontos, sendo que em quantidades

mais significativas no ponto 43. Nesse ponto observamos que as mudas estavam na faixa do plantio que apresentaram um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas.

Yarrowia lipolytica

A *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, dimórfico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes (Souza et al, 2014). A *Yarrowia lipolytica*, originalmente classificada como *Cândida lipolytica* (Oliveira, 2014), é uma das espécies classificadas como não-convencionais e que atualmente vem sendo uma das mais estudada (Barth e Gaillardin, 1997). Ao contrário das *Candidas*, a *Y. lipolytica* não é considerada patogênica (OLIVEIRA, 2014).

A descrição de algumas espécies classificadas como não convencionais, dentre elas a *Yarrowia* foi feita por Wolf (1996). A aplicação da *Yarrowia* foi descrita nas seguintes áreas: essa levedura é capaz de assimilar hidrocarbonetos, ácidos graxos e lipídeos como fonte de carbono e energia. Apresenta grande potencial nos tratamentos de efluentes ricos em lipídeos e na produção de ácidos orgânicos.

Zinjarde et al (2014), em seu estudo relata que cepas de *Yarrowia lipolytica* isoladas de ambientes distintos, tais como: solos, água do mar, sedimentos e águas residuais, apresentaram habilidades fisiológicas para a degradação de hidrocarbonetos, tais como alcanos e compostos aromáticos, além da sua capacidade em tolerar alguns metais pesados, o que a qualifica como promissora em alguns processos de biorremediação ambiental.

Observou-se também a produção em grande escala industrial do ácido cítrico a partir da *Yarrowia Lipolytica* e devido a isso, o acumulo de dados sobre o seu comportamento como grandes fermentadores (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

A *Y. lipolytica* foi frequentemente observada em leite, carne, peixe e seus produtos derivados. Foi identificada também em uma série de produtos de leite fermentado, porém em frequências mais baixa, tais como: iogurte, quefir, nunu e amasi, além da manteiga, creme e margarina. Observou-se também a presença da *Yarrowia* em diversos tipos de queijos, sendo a presença em maior ou menor quantidade atrelada à quantidade de gordura presente no leite (HARZEVILI, 2014).

Além dos produtos derivados de leite, ainda na indústria alimentícia observou-se a ocorrência da *Yarrowia* em alimentos embutidos, tais como: salame, linguiça, salsicha, bacon, carne seca e até em amostras de peixes (HARZEVILI, 2014)

Medina et al (2004), em seus experimentos descreveu a presença da *Yarrowia* em solo deserto com rejeitos agro-industriais e observou a redução da condutividade elétrica do solo nos tratamentos que continham a levedura *Yarrowia lipolytica*. Porém, a descrição feita anteriormente por diversos autores, apontava ser uma vantagem à adição da *Yarrowia*, pois a adição desses compostos elevava significativamente a condutividade nesses solos.

Diferentes estirpes de *Y. lipolytica* foram isoladas e usadas na biorremediação de solos contaminados com óleo. Devido a sua capacidade de utilizar substratos hidrófobos tais como: alcanos, ácidos graxos e óleo. As estirpes de *Y. lipolytica* estão emergindo como agentes promissores para o tratamento de poluição causado por resíduos de óleo de hidrocarbonetos vegetal e mineral (FERREIRA et al,2012).

Em estudo recente a *Y. lipolytica* foi descrita como um organismo auxiliar no desempenho do fungo micorrízico arbuscular (FMA), resultando no aumento do crescimento vegetal e na absorção de fósforo (Vassilev et al., 2001). Entretanto, as bases desse efeito benéfico para o fungo tampouco foram ainda exploradas (LOBÃO, 2007).

A revisão de literatura sobre *Yarrowia lipolytica* nos mostra que o mesmo foi encontrado em ambientes com gordura e ácidos graxos. Em nossa área de estudo a *Yarrowia lipolytica* foi à espécie mais encontrada na faixa do plantio que apresentou um bom desenvolvimento e com a copa das coberturas das arvore bem desenvolvidas.

Ectomicorrizas

Embora encontradas em pequenas quantidades nas amostras avaliadas, observamos a presença de alguns gêneros de ectomicorrizas, tais como: *Inocybe*, *Peniophora*, *Coprinus*, *Conocybe*, *Lycoperdon*, entre outros.

As ectomicorrizas promovem o aumento na área de absorção radicular, isso faz com que nutrientes como fósforo (P), nitrogênio (N) e potássio (K) e a água,

sejam mais absorvidos. Devido a isso, as ectomicorrizas influenciam no crescimento das plantas, mesmo em locais que apresentam solo pobre e degradado. Outros benefícios provenientes das ectomicorrizas são a maior resistência a aumento de temperatura, a solos ácidos, a estresse hídrico, a patógenos da raiz e a substâncias tóxicas no solo (SOUZA et al, 2004).

O potencial enzimático apresentado pelas espécies de fungos ECM é variado e a capacidade enzimática desses fungos está relacionada ao substrato na qual está ligado e as condições climáticas apresentadas no local.

O sequenciamento é uma técnica que permite gerar muitos dados e sequências sobre os fungos ECM, porém a capacidade de identificar corretamente esses dados e posteriormente interpretar o papel ecológico desses fungos, ainda é muito limitado (TEDERSOO e SMITH, 2013).

A diversidade de fungos ECM nos ecossistemas tropicais e regiões temperadas do Sul ainda é pouco estudada e devido a isso nessas regiões as chances de revelarem informações adicionais sobre ECM são significativas (TEDERSOO e SMITH, 2013). Portanto, a construção de um banco de dados com informações precisas e atualizadas, beneficiaria diversos pesquisadores.

Fungos Micorrizicos Arbusculares

Embora encontrados em pequenas quantidades nas amostras avaliadas, observamos a presença de alguns gêneros de fungos micorrízicos arbusculares, tais como: *Glomus*, *Entrophospora*, *Rhizophagus*, *Funneliformis*, etc.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são considerados grandes aliados nos processos de restauração de áreas degradadas, pois influenciam no crescimento e na adaptação das plantas no solo (Colodete et al, 2014). Os FMAs junto às raízes das plantas formam as micorrizas (Colodete et al, 2014). Esses fungos auxiliam as plantas na absorção de nutrientes do solo, principalmente o fósforo, além disso, favorecem o crescimento das mudas no campo e contribuem para uma taxa maior de sobrevivência das mesmas.

Estudos apontam que em diversas situações de degradação do solo, os FMAs apresentam grande importância na restauração das áreas degradadas (Bi et al. 2005, Zuquette et al. 2013 apud COLODETE et al., 2014).

3. Uso da bioinformática na análise da biodiversidade de fungos

O uso de softwares e programas estatísticos em pesquisas ambientais vem crescendo nos últimos anos, sendo estas ferramentas necessárias para quantificar e qualificar microrganismos presentes no solo e outros locais.

Como descrito no capítulo 2, o presente trabalho fez uso de tais recursos para descrever e quantificar os microrganismos encontrados na área de estudo e correlacionar com a biodiversidade do local.

Calculamos os índices de diversidade alfa e beta. O índice de diversidade beta mede como a variedade (e em alguns casos as abundâncias) de espécies difere entre comunidades ou amostras ao longo de gradientes. Em linhas gerais dizemos que quanto menos espécies as diferentes comunidades compartilham, mais alta é a diversidade beta.

Os coeficientes de similaridade são utilizados para se medir a diversidade beta. Estes coeficientes utilizam parâmetros qualitativos e quantitativos para a comparação entre as comunidades. Para avaliação da similaridade entre as comunidades fungicas, o cálculo foi baseado na abundância de similaridade Jaccard entre as comunidades utilizando um corte de 97% de similaridade. O índice de similaridade Jaccard é estimado pela fórmula $S_j = a/(a + b + c)$ (Barros, 2007). Este índice apresenta uma desvantagem, pois ele não leva em conta as abundâncias das espécies.

Outro índice de diversidade beta utilizado em nosso estudo é o Bray-Curtis, que é representado pela fórmula $B = \sum |x_{ij} - x_{ik}| / \sum (x_{ij} + x_{ik})$, na qual avaliação pode ser de similaridade ou dissimilaridade (distância) na abundância das espécies. Os valores de Bray-Curtis vão de um (valor máximo) a zero (valor mínimo).

Os índices alfa calculados foram Chao, Shannon e Simpson e esses índices avaliam a diversidade para cada área. Os índices de diversidade calculam por meio de formulas matemáticas a diversidade de espécies em uma comunidade, resultando em uma análise mais aprofundada e gerando dados como riqueza e abundancia.

O método Chao é expresso pela fórmula $S_c = S_{obs} + F_1^2 / 2F_2$ e estima a riqueza total utilizando o número de espécies representadas por apenas um

indivíduo nas amostras, e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (BARROS, 2007).

“O índice de Shannon é expresso pela fórmula $H = -\sum_{j=1}^s p_j \ln p_j$ e considera igual peso entre espécies raras e abundantes; quanto maior for o valor de H, maior será a diversidade de fungos de uma amostra” (Zablith, 2014). O valor obtido pelo índice situa-se entre 1,5 a 3,5.

O índice de Simpson é dado pela fórmula $D = \frac{1}{\sum_{j=1}^s p_j^2}$ caracteriza a diversidade de uma comunidade. Quanto maior o valor de D, menor é a diversidade, pois significa que existe uma grande probabilidade de dois indivíduos removidos ao acaso, pertencerem à mesma espécie (Zablith, 2014). Nesse índice, 0 representa o máximo de diversidade e 1 nenhuma diversidade.

Para auxiliar na análise de dados utilizamos o NMDS (escalonamento multidimensional não métrico) que reduz os dados das matrizes de diversidade beta para 3 eixos. O NMDS tem o objetivo de avaliar a dissimilaridade da composição de espécies, com base na distância entre matrizes, ou seja, verificar se há distinção entre comunidades analisadas ou não.

Outra forma de analisar as matrizes de diversidade beta, foi através do teste Mantel, que é usado para verificar a correlação significativa entre duas matrizes de distancia. Dentro do teste Mantel temos o correlograma que é usado para investigar a estrutura subjacente dessa relação correlativa.

As análises descritas acima foram feitas no Mothur, que é um software desenvolvido para analisar sequencias de dados de uma comunidade. Em nosso estudo, nós usamos Mothur para calcular distâncias, atribuir sequências a unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e descrever a diversidade alfa e beta das 18 amostras de solo previamente caracterizadas por sequenciamento de fragmentos do gene ITS (SCHLOSS et al., 2009).

A beta diversidade representado pelas análises de Bray-Curtis, Jaccard, Distância Euclidiana e UNIFRAC faz a comparação entre as espécies de diferentes comunidades. Esses índices poderão ser usados para identificar o potencial de novas áreas para plantio, visando obter maior sucesso nos processos de restauração.

4. Conclusão

A revisão de literatura dos 17 OTUs que representavam mais de 1% das amostras estudadas nos revelou informações a respeito dos locais onde essas espécies já foram registradas. A maior parte dos registros encontram-se situados fora do Brasil, sendo importante o aumento de estudos de fungos no solo em nosso país.

Diversos fungos que foram encontrados na área de estudo tiveram registros de uso em áreas de biorremediação, decomposição de alimentos e até mesmo na área farmacêutica. Porém, com relação à presença dos mesmos atrelados a projetos de restauração, ainda temos pouca literatura sobre isso.

A maior parte da literatura de fungos presentes no solo concentra-se em sua grande maioria nos Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA). Outros tipos de fungos que habitam o solo e que podem ter alguma relação no desenvolvimento e estabelecimento de mudas ainda é muito escasso, sendo portanto necessário o aumento de pesquisas nessa temática, justo que a demanda por áreas de restauração florestal está crescendo nos últimos anos.

5. Considerações Finais

A diversidade de fungos em diferentes ecossistemas tem sido frequentemente estudada, aumentando as informações a respeito da distribuição dos fungos no solo e quais fatores que interferem na distribuição dos mesmos. O conhecimento sobre os fungos, sua vasta diversidade e as aplicações em diversas áreas é de grande importância e pode auxiliar nos programas de restauração em áreas degradadas.

O monitoramento dos fungos no processo de restauração é importante, pois os fungos desempenham papéis essenciais em processos ecossistêmicos. Para informações mais precisas a respeito desse grupo, contamos com o uso de tecnologias avançadas em genômica de fungos e ferramentas de bioinformática, a fim de gerar conhecimento sobre os mecanismos de crescimento e sobrevivência das mudas plantadas em áreas de reflorestamento.

Por fim, faz-se necessário desenvolver estudos mais aprofundados dos fungos presentes no solo e sua relação com as plantas, de forma a compreender quais são os fungos mais favoráveis para as espécies e quais as melhores condições para o seu desenvolvimento, podendo estes resultados serem utilizados em programas de desenvolvimento e melhoramento das espécies, ou em programas de reflorestamento.

6. Implicações para a prática

O presente trabalho procura, além de estudar as relações entre fungos e plantas, explorar a possibilidade de usar essas informações em projetos futuros de restauração florestal. O conhecimento a respeito da biodiversidade de fungos no solo contribui com informações importantes e essas informações poderão ser utilizadas a fim de reduzir os custos nas áreas a serem restauradas.

Os custos médios de plantio em áreas a ser restauradas variam de região para região, pois além dos insumos como mudas e adubos, há um custo alto com a mão de obra e posteriormente com a manutenção da área. O que vemos nas áreas restauradas é que geralmente há necessidade de repor as mudas que morrem e isso gera um custo ainda maior para a empresa.

O primeiro plantio em média há uma perda de 20% das espécies e em alguns casos essa perda pode atingir até 50% e isso acarreta grandes prejuízos financeiros para quem está custeando a restauração, pois é necessário fazer a reposição das mudas que não sobreviveram.

Segundo a legislação as concessionárias de usinas hidrelétricas devem reflorestar milhares de hectares de Área de Preservação Permanente (APP) por ano, porém existem poucos critérios para a escolha dessas áreas e isso acarreta no insucesso nos plantios, pois geralmente temos índices significativos de mortalidade de mudas.

Dentro dessa linha de restauração, em 2008 foi lançado o projeto de geração e comercialização de crédito de carbono a partir da restauração das APPs situadas no entorno dos reservatórios das dez usinas hidrelétricas da AES Tietê.

No total será restaurada uma área de 12 mil hectares de APPs, com 24 milhões de mudas de espécies nativas das regiões da Mata Atlântica e do cerrado

do Estado de São Paulo. Com a recuperação da mata ciliar das bordas das usinas, espera-se ao longo de 20 anos, a remoção de cerca de 5 milhões de toneladas de CO₂ da atmosfera.

Devido a essa demanda apresentada pela AES-Tietê informações e técnicas aprimoradas a cerca de restauração e reflorestamento se faz necessário, para que possam otimizar os próximos plantios, visando a garantia de sucesso das áreas restauradas.

Os dados coletados a cerca da biodiversidade de fungos presente no solo da área em restauração , poderão servir de orientação para as próximas áreas a serem restauradas. Pois, na área de estudo descrita neste trabalho, observamos que houve uma faixa significativa na qual as mudas não se desenvolveram e em outras faixas observamos que as mudas estavam desenvolvidas. O sucesso da área em restauração deve ser analisado junto a biodiversidade de fungos presente naquela área.

As informações geradas por este estudo afirmam que os fungos não estão distribuídos aleatoriamente e isso significa que se coletarmos amostras de 2 pontos em um pasto, estas apresentarão similaridade quanto a sua composição. Isso é importante, pois ao fazer a análise de uma área (por ex: plantio de 0,5 hectare) os fungos ali serão semelhantes. Então, pode ser que uma área que deu certo o reflorestamento, tenha as mesmas características de uma área distante.

O presente trabalho propõe a construção de um mapa da biodiversidade de fungos com o uso de imagens georreferenciada e isso fornecerá dados aos que estão interessados em executar projetos de restauração. Os executores poderão visualizar uma área que está plantada e comparar os pontos dessa área que estão bem desenvolvidos ou não e finalmente poder visualizar (e baixar) as listas das espécies (OTUs), amostrados em cada ponto.

7. Referências Bibliográficas

Ahmad, I.; Zafar, S.; Ahmad, F. **Heavy Metal Biosorption potential of Aspergillus and Rhizopus sp. isolated from Wastewater treated soil.**

Ahmed, E.; Holmström, S.J.M. **Microbe-mineral interactions: the impact of surface attachment on mineral weathering and element selectivity by microorganisms.** Chemical Geology. p.46, 2015.

Al-Musallam, A.S.A. **Diversity and dominance of fungi inhabiting the sabkha área in Kuwait.** *Botanica Marina* 54. p.83–94, 2011.

Aly, A. H.; et al. **Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*.** *J. Nat. Prod.* v.71: p. 972–980, 2008.

Ancasi E.G.; Maraz F. A. **Biodiversidad y estudio biotecnológico de levaduras en quesos de cabra procedentes de valles y de la Quebrada de Humahuaca - Jujuy - Argentina.** *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* v. 12: p.24-34, 2014.

Andrade, M. T. **Diversidade de isolados de *Alternaria* spp. associados ao gênero *Allium* no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)— Universidade de Brasília, Brasília, p.72, 2011.

Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. ***Candida galli* strain PGO6: a novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid.** *Curr Microbiol.* v.62: p. 990–998, 2011.

Arenz, B.E. et al. **Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica.** *Soil Biology & Biochemistry* 38. p.3057–3064, 2006.

Auer, C.G. et al. **Doenças em Pinus: Identificação e controle.** – Colombo: Embrapa Florestas, p. 28, 2001.

Azcón, R. et al. **Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a Multicontaminated Soil Alleviate Metal Toxicity in Plants.** *Microb Ecol.* v.59: p.668–677, 2010.

Balabanova, L.A.; et al. **An Extracellular S1-Type Nuclease of Marine Fungus *Penicillium melinii*.** *Mar Biotechnol.* v .14: p.87–95, 2012.

Banik, S.; Dey, B. K. **Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms.** *Plant and Soil, The Hague,* v. 69, n. 3, p. 353-364, 1982.

Banik, S.; Dey, B.K. **Alluvial Soil microorganisms Capable of Utilizing Insoluble Aluminium Phosphate as a Sole Source of Phosphorus.** *Zbl. Mikrobiol.;* v. 138, p. 437-442, 1983.

Barklund, P. **Occurrence and Pathogenicity of *Lophodermium Piceae* appearing as an endophyte in needles of *Picea Abies*.** *Trans. Br. mycol. Soc.;* v. 89 (3): p. 307-313, 1987.

Barros, R.S.M. **MEDIDAS DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia/UFJF. p. 13, 2007.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. **Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*.** *FEMS Microbiology Reviews* v.19: p. 219-237, 1997.

Bellis, T.; et al. **Plant community influences on soil microfungal assemblages in boreal mixed-wood forests.** Mycologia. v.99: p.356–367, 2007.

Bensch, K. et al. **The genus Cladosporium.** Studies in Mycology, v.72: p.1–401, 2012.

Borges, L.R.; Lazzari, S.M.N.; Pimentel, I.C.; Vila Nova, M.X. **Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, Ilex paraguariensis St. Hil.** Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais, v.9, n.2, p.185-194, 2011.

Brewer, D.; Taylor, A. **The production of toxic metabolites by Chaetomium spp. Isolated from soils of permanent pasture.** CAN. J. MICROBIOL.; v. 24: p. 1082-1086, 1978.

Candeias, E. L. et al. **Fungos endofíticos de raízes de sisal anátagonista ao Aspergillus niger.** Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil. Agrotropica; v. 28(1): p. 29 – 36, 2016

Carvalho, L. I. C. **Aspergillus e aspergilose – Desafios no combate da doença.** Universidade Fernando Pessoa, Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Porto, 2013.

Cavalcanti, M. A. Q.; et al. **Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil.** Acta bot. Bras.; v. 20(4): p. 831-837, 2006.

Cendejas-Bueno E, et al. **Reclassification of the Candida haemulonii complex as Candida haemulonii (C. haemulonii group I), C. duobushaemulonii sp. nov. (C. haemulonii group II), and C. haemulonii var. vulnera var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts.** J Clin Microbiol. v. 50: p. 3641–3651, 2012.

Chang, C.F.; Lee C.F.; Liu, S.M. **Candida neustonensis sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the sea surface microlayer in Taiwan.** Antonie Leeuw.; v. 97: p. 35–40, 2010.

Ciafardini, G. **Yamadazyma terventina sp. nov., a yeast species of the Yamadazyma clade from Italian olive oils.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 63: p. 372–376, 2013.

Cihangir, N.; Sarikaya, E. **Investigation of lipase production by a new isolate of Aspergillus sp.** World J. Microbiol. Biotechnol., v. 20, p. 193–197, 2004.

COLODETE, C. M.; DOBBSS, L. B.; RAMOS, A. C. **Aplicação das Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas.** Natureza on line, v. 12, n. 1, p. 31-37, 2014.

Conceição, D. M.; Angelis, D. A.; Bidoia, E. D.; Angelis, D. F. **Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP, e refinarias de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos.** Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

Connell, L. **Diversity of Soil Yeasts Isolated from South Victoria Land, Antarctica.** Microb Ecol. v. 56: p.448–459, 2008.

Costa, M. S. F. **Diversidade de leveduras do solo semi-árido da Bahia, Brasil / Misael Silva Ferreira Costa.** Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos. Recife: O Autor, 2006.

Cruz, R. et al. **Diversity of Penicillium in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach.** Nova Hedwigia. V. 97: p. 543–556, 2013.

Dujon, B. et al. **Genome evolution in yeasts.** Nature, v. 430, p. 35-44, 2004.

Ernest, M.; et al. **Endophytic Fungal Mutualists: Seed-Borne Stagonospora Spp. Enhance Reed Biomass Production in Axenic Microcosms.** Molecular Plant-Microbe Interactions. v. 16, n. 7, p. 581-587, 2003

Feng, J. et al. **An Unstructured Kinetic Model to Study NaCl Effect on Volatile Ester Fermentation by Candida etchellsii for Soy Sauce Production.** Biotechnology and Bioprocess Engineering; v. 17: p. 242-249, 2012.

Feng, J. et al. **A two-step inoculation of Candida etchellsii to enhance soy sauce flavour and quality.** International Journal of Food Science and Technology; v. 47: p. 2072–2078, 2012

Feng, J. et al. **Identification and analysis of the metabolic functions of a high-salt-tolerant halophilic aromatic yeast Candida etchellsii for soy sauce production.** World J Microbiol Biotechnol. v. 28: p. 1451–1458, 2012.

Ferreira, N. et al. **Yeast Microflora Isolated From Brazilian Cassava Roots: Taxonomical Classification Based on Molecular Identification.** Curr Microbiol. v.60: p. 287–293, 2010.

Ferreira, T.F. **Factors Influencing Crude Oil Biodegradation by Yarrowia lipolytica.** Brazilian Archives of Biology and Technology. v.55: p. 785-791, 2012.

Fisher, P.J.; Punithalingam, E. **Stagonospora pteridiicola sp. nov., a new endophytic coelomycete in Pteridium aquilinum.** Mycological Research v.97: p. 661-663, 1993.

Fracchia, S.; et al. **Interaction between the soil yeast Rhodotorula mucilaginosa and the arbuscular mycorrhizal fungi Glomus mosseae and Gigaspora rosea.** Soil Biology & Biochemistry. v.35: p.701–707, 2003.

Franckin, T. **Produção de biofilme, perfil de sensibilidade e aspectos epidemiológicos de espécies fungicas e algas do gênero Prototheca isoladas de casos de mastite bovina.** Dissertação- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu, 2016.

Galvão, I. R. G. A. S. ; et al. **Espécies de Penicillium isoladas em solos do Município de Tupanatinga, Pernambuco-Brasil.** 2013.

Guarro, J.; Arx, J. A. V. **Monascella, a new genus of Ascomycota.** Mycologia. v. 78: p. 869-871, 1986.

Grandi, R. A. P. **Duas espécies de Chaetomium (Ascomycotina- Chaetomiceae) associadas à decomposição de raízes.** Bolm Botânica, Universidade São Paulo, v. 13: p. 87-92, 1992.

Harris, J. **Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers?** Science, v.325: p. 573- 574 (2009)

HARZEVILI, F. D. **Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica:** Springer Briefs in Microbiology, 2014.

Heinrichs, G. et al. **Analysis of Black Fungal Biofilms Occurring at Domestic Water Taps (II): Potential Routes of Entry.** [Mycopathologia](#). v. 175: p.399-412, 2013.

Istifadah, N.; et al. **Isolates of endophytic Chaetomium spp. Inhibit the fungal pathogen Pyrenophora tritici-repentis in vitro.** Can. J. Bot. v. 84: p. 1148-1155, 2006.

Jančič, S.; et al. **A Taxonomic Revision of the Wallemia sebi Species Complex.** PLoS ONE. v.10: p. 1-25, 2015.

Johnston P.R. **Monograph of the monocotyledon-inhabiting species of Lophodermium.** Mycol.; v. 176: p.1–239, 2001.

Kara, O.; Asan, A. **Microfungal community structure from forest soils in Northern Thrace Region, Turkey.** Annals of Microbiology. v. 57: p.149-155, 2007.

Koide, K.; et al. **Fungal succession and decomposition of Camellia japonica leaf litter.** Ecol Res.; v. 20: p. 599–609, 2005.

Kuncic, M. K.; et al. **Morphological responses to high sugar concentrations differ from adaptation to high salt concentrations in the xerophilic fungi Wallemia spp.** Fungal Biology. v.117: p. 466- 478, 2012.

Lima, T.M. et al. **Estimativa da população de fungos em solo cultivado com amendoim.** Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ. v. 11, n. 2, p. 67-68, 2001.

Limtong S, Youngmanitchai W, Kawasaki H, Seki T. **Candida phangngensis sp. nov., an anamorphic yeast species in the Yarrowia clade, isolated from water in mangrove forests in Phang-Nga Province, Thailand.** Int J Syst Evol Microbiol. v. 58: p.515–519, 2008.

Lobao, F.A.; Facanha, A.R.; Okorokov L.A.; Dutra, K.R.; Okorokova-Facanha, A.L. **Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ transport mediated by the plasma membrane ATPase of Yarrowia lipolytica.** FEMS Microbiol Lett. v.274: p.17–23, 2007.

Loureiro. S.T.A. et al. **Yeasts isolated from Sand and Sea Water in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology. v.36: p. 333-337, 2005.

Lupicka, T. K.; et al. **The ability of soil fungi to degrade organophosphonate carbon-to phosphorus bond.** Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 48: p. 549–552, 1997.

Medina, A. et al. **Increase plant growth ‘nutrient uptake’ and soil enzymatic activities in a desertified Mediterranean soil amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast .** Soil Science. v.169: p. 260-270, (2004a)

Medina, A. et al. **Improvement of soil characteristics and growth of Dorycnium pentaphyllum by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast Yarrowia lipolytica.** Chemosphere. v. 56: p. 449-456, (2004b).

Menna, M.E. **Yeasts in Antarctic soils.** Antonie van Leeuwenhoek. v. 32: p. 29-38, 1966.

Monteiro, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em solos preservados do cerrado.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 76, 2012.

Muhl, F.R. **Efeito da mancha de Stagonospora nodorum em componentes de rendimento de cultivares de trigo.** In: Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2006.

Muneer, B. et al. **Chromium Resistant Yeast with Multi-Metal Resistance Isolated from Industrial Effluents and their Possible Use in Microbial Consortium for Bioremediation of Wastewater.** Pakistan J. Zool. v. 39: p. 289-297, 2007.

Muneer, B. et al. **Evaluation of Consortia of Microorganisms for Efficient Removal of Hexavalent Chromium from Industrial Wastewater.** Bull Environ Contam Toxicol. v.82: p. 597–600, 2009.

NAGY, E.S. **Differentiation of food spoilage yeast strains of the Yarrowia group by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting.** Journal of Universal Science. p. 6-11, 2014.

Oleinikova, G.K.; et al. **Free Fatty Acids From the Marine Fungi *Cladosporium cladosporioides*, *Talaromyces wortmanii* and *Wallemia sebi***. *Chemistry of Natural Compounds*. v.46: p. 446-447, 2010.

Oliveira, V.C. **População Microbiana de solos sob diferentes agroecossistemas e vegetação nativa no semi-árido**. *Rev. Bras. Agroecologia*, v.2, n.1, p. 898 – 901, 2007.

Oliveira, P.H.S. **Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono**. São Paulo, p. 123, 2014.

Oliveira, R.J.V. et al. ***Cladosporium* species from hypersaline environments as endophytes in leaves of *Cocos nucifera* and *Vitis labrusca***. *Mycotaxon*. v.129: p.25–31, 2014.

Ortiz-García, S.; et al. **Phylogenetics of *Lophodermium* from pine**. *Mycologia*.; v. 95: p. 846–859, 2003.

Osorio, M.; Stephan, B.R. **Life cycle of *Lophodermium piceae* in Norway spruce needles**. *Eur. J. For. Path*; v. 21: p.152-163, 1991.

Ozturk, I. **Presence, changes and technological properties of yeast species during processing of pastirma, a Turkish dry-cured meat product**. *Food Control*. v.50: p. 76-84, 2015.

*Pacheco, D.R. Avaliação da atividade antifúngica de *Curcuma longa* sobre *Candida parapsilosis**. *Rev Patol Trop* . v.44: p. 258-270, 2015.

Padamsee, M.; et al. **The genome of the xerotolerant mold *Wallemia sebi* reveals adaptations to osmotic stress and suggests cryptic sexual reproduction**. *Fungal Genetics and Biology*. v.49: p.217–226, 2012.

Pasqualetti, M.; et al. **Effects of Long-Term Heavy Metal Contamination on Soil Fungi in the Mediterranean Area**. *Cryptogamie, Mycologie*. v. 33: p.43-57, 2012.

Passos, C. T.; Burket, J. F. M.; Kalil, S. J.; Burket, C. A. V. **Biodegradação de fenol por uma linhagem de *Aspergillus niger* SP. Isolada de um solo contaminado do sul do Brasil**, *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.

Pereira, V. J. et al. Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. *Water Research*, v.43. p.3813 – 3819, 2009.

Pessoa Filho, M.A.C.P. **Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solo do cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.29, 2010.

Péter, G; Dlačny, D; Vasdinyei, R; Tornai-Lehoczki, J; Deák, T. **Candida galli sp. nov., a new yeast from poultry.** Antonie Van Leeuwenhoek. v. 86:p. 105–110, 2004.

Petrini, O.; Fisher, P. J. **Fungal endophytes in Salicornia perennis.** Transactions of the British Mycological Society, v. 87, p. 647–651, 1986.

Pfirter, H.A.; Défago, G. **The potential of Stagonospora sp. as a mycoherbicide for field bindweed.** Biocontrol Science and Technology v. 8: p. 93–101, 1998.

Pinotii, T. **Diversidade de leveduras endofíticas em plantas de agricultura orgânica (Seropédica- RJ) e sua produção de micocinas e proteases.** Tese (Doutorado em Ciências Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Rio de Janeiro, 2010

Polyakova, A.V. **Yeast Diversity in Hydromorphic Soils with Reference to a Grass–Sphagnum Wetland in Western Siberia and a Hummocky Tundra Region at Cape Barrow (Alaska).** Microbiology, v. 70: p. 617–622, 2001.

Poyou-Rojas, E.; Siqueira, J.O. **Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.35, n.1, p.103-114, 2000.

Pradhan, N.; Shukla, L.B. **Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil.** African Journal of Biotechnology, v. 5, p. 850–854, 2005.

Russell, R.; Paterson, M.; Lima, N. **Mutagens affect food and water biodeteriorating fungi.** Current Opinion in Food Science, v. 5:p. 8–13, 2015.

Sales Jr, R.; et al. **Controle biológico de Monosporascus cannonballus com Chaetomium.** Fitopatol. Bras. v. 32(1): p.70-74, 2007.

Sánchez, F. G; Agudo, L.G; Martos, P.G; Iglesias, M.R. **Candida galli as a Cause of Tinea Unguium—Molecular Characterization of a Rare Clinical Fungal Entity.** Mycopathologia. v.178: p.303–306, 2014.

Sanchez, H.; Bush, R.K. **A review of Alternaria alternata sensitivity.** [Rev Iberoam Micol.](#) v.18: p. 56-59, 2001.

Santos, M.F.; Ribeiro, R.C.W.; Faiad, M.G.R., Sano, S.M. **Fungos associados às sementes de baru (Dipteryx alata Vog.).** Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.19, n.1, p.135-139. 1997.

Santos, F. E. M.; Sobrosa, R. C.; Costa, I. F. D.; Corder, M. P. M. **Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (Acacia mearnsii De Wild).** Ciência Florestal, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2001.

Schloss, P.D.; et al. **Introducing mothur: Open Source, Platform-independent, Community-supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities**. Applied and Environmental Microbiology, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

Silva, C.M.M.S.; Melo, I.S. **Requisitos nutricionais para o fungo Alternaria alternata**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.34, n.3, p. 499-503, 1999.

Silva, J. F. V.; et al. **Fungos associados a ovos de Heterodera glycines no Brasil**. Nematologia Brasileira, v. 18: p. 73-78, 1994.

Sivasubramanian, S.; Namasivayam, S.K.R. **Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from**. Journal of Environmental Chemical Engineering environmental sources 3. p. 243–252, 2015.

Smith, M.T.; Vegte, W.H.B.V.D. **Pichia triangularis sp. nov., the teleomorph of Candida polymorpha Ohara et Nonomura, nom. nud.** Antonie van Leeuwenhoek. v.52: p.437-443, 1986.

Smolyanyuk, E. V.; Bilanenko, E.N. **Communities of Halotolerant Micromycetes from the Areas of Natural Salinity**. Microbiology, v.80: p. 877–883, 2011.

Souza L. A. B.; Filho G.N.S.; Oliveira, V. L. **Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 39: p. 349-355, 2004.

Souza, U.S.; Nunes, P.M.B.; Amaral, P.F.F.; Rocha-Leão, M.H.M. **Estudo da produção de inulinase por Yarrowia Lipolytica**. 2014

Stellato,G. **Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy-processing environment**. Appl. Environ. Microbiol. p.38, 2015.

Tedersoo, L., Smith, M. E. **Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground**. Fungal Biol. Rev. 27: p.83–99, 2013.

Thormann, M.N.; Rice, A. V. **Fungi from peatlands**. Fungal Diversity. v.24: p.241-299, 2007.

Töfoli, J.G.; Domingues, R. J. **Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado**. Disponível em:<www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=11>. Acesso em: fevereiro de 2016.

Vassilev, N.; Vassileva, M.; Azcon, R.; Medina, A. **Application of free and Calcium alginate-entrapped Glomus deserticola and Yarrowia lipolytica in a soil-plant system**. Journal of Biotechnology v. 91: p.237–242, 2001.

Viragh, P.A. et al. **Cloning and sequencing of two Candida pavapsilosis genes encoding acid proteases**. Journal of General Microbiology. v.139: p.335-342, 1993.

Vital, M.J.S. et al. **Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima- Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology. v.33: p. 230-235, 2002.

Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M. **Alternaria redefined.** Studies in Mycology. v. 75: p.171–212, 2013.

WOLF, K. **Non-conventional Yeasts in Biotechnology-** A Handbook Springer-Verlag BerlinHeidelberg New York, 1996.

Wouter, J.; et al. **Degradation of benzene compounds by yeasts in acidic soils.** Plant and Soil.v. 145: p. 37-43, 1992.

Zablith, M. **Levantamento Florístico em Áreas de Sucessão Natural – Espécies Regenerantes de Nazaré Paulista.** Dissertação (Mestrado) - IPÊ – Instituto de Pesquisas ecológicas, Nazaré Paulista, p.88, 2013.

Zafar M.N.; et al. **Biosorption of nickel from protonated rice bran.** J Hazard Mater v. 143: p. 478-485, 2007.

ZINJARDE, S.; APTE, M.; MOHITE, P.; KUMAR, A. R. **Yarrowia lipolytica and pollutants: Interactions and applications.** Biotechnology Advances, v.32, p.920-933, 2014.

ANEXOS

A. MIDs utilizados para o sequenciamento.

Sample_01	454A-MID-adF_01	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACAAG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_05	454A-MID-adF_17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACCTA</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_17	454A-MID-adF_25	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACGTG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_19	454A-MID-adF_33	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AAGAAG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_21	454A-MID-adF_41	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AAGGAG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_23	454A-MID-adF_02	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACACA</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_37	454A-MID-adF_18	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACCTC</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_39	454A-MID-adF_26	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACTAC</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_41	454A-MID-adF_34	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AAGACA</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_43	454A-MID-adF_42	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AAGTAA</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_45	454A-MID-adF_03	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACACC</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_57	454A-MID-adF_11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACCAA</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_59	454A-MID-adF_19	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACCTG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_61	454A-MID-adF_27	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACTAG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_63	454A-MID-adF_35	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AAGACC</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_74	454A-MID-adF_43	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AAGTAC</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_76	454A-MID-adF_04	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACACG</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Sample_78	454A-MID-adF_12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AACCAC</u> GGCCACGCGTCGACTAGTAC

B: OTUS acima do 1% e o número de acesso GenBank

OTU	Total de sequências	Porcentagem	UNITE hit	Acesso GenBank	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	Porcentagem identificada
OTU_2	8719	24,20%	Cladosporium halotolerans	DQ780364	Ascomycota	_Dothideomycetes	Capnodiales	_Davidiellaceae	_Cladosporium	_Cladosporium_halotolerans	100
OTU_11	1884	5,23	Penicillium melinii	AY373923	Ascomycota	_Eurotiomycetes	Eurotiales	_Trichocomaceae	_Penicillium	_Penicillium_melinii	98,9
OTU_15	1845	5,12	Aspergillus sp DY115 21 8 M4	KF411579	Ascomycota	_Eurotiomycetes	Eurotiales	_Trichocomaceae	_Aspergillus	_Aspergillus_DY115_21_8_M4	98,2
OTU_10	703	1,95	Monascella botryosa	AJ133433	Ascomycota	_Eurotiomycetes	Onygenales	_Onygenaceae	_Monascella	_Monascella_botryosa	98,8
OTU_14	470	1,3	Stagonospora sp AX113	KC507202	Ascomycota	_Dothideomycetes	Pleosporales	_Phaeosphaeriaceae	_Stagonospora	_Stagonospora_sp_AX113	98,9
OTU_6	1689	4,68	Alternaria sp	EU479803	Ascomycota	_Dothideomycetes	Pleosporales	_Pleosporaceae	_Alternaria	_Alternaria_sp	99,1
OTU_5	2605	7,23	Lophodermium sp	AY546074	Ascomycota	_Leotiomycetes	Rhytismatales	_Rhytismataceae	_Lophodermium	_Lophodermium_sp	96,3
OTU_1	7597	21,08	Yarrowia lipolytica	DQ668345	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Incertae_sedis	_Yarrowia	_Yarrowia_lipolytica	100
OTU_12	692	1,92	Yamadazyma triangularis	EU343869	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Pichiaceae	_Yamadazyma	_Yamadazyma_triangularis	99,1
OTU_13	732	2,03	Candida neustonensis	EF621563	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Incertae_sedis	_Candida	_Candida_neustonensis	100
OTU_16	695	1,92	Candida haemulonis	AY500375	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Incertae_sedis	_Candida	_Candida_haemulonis	100
OTU_3	2936	8,15	Candida etchellsii	AB196222	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Incertae_sedis	_Candida	_Candida_etchellsii	99,2
OTU_4	2048	5,68	Candida parapsilosis	AY939798	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Incertae_sedis	_Candida	_Candida_parapsilosis	99,7
OTU_7	1181	3,27	Candida galli	EU343806	Ascomycota	_Saccharomycetes	Saccharomycetales	_Incertae_sedis	_Candida	_Candida_galli	99
OTU_17	500	1,38	Chaetomium sp	JX292136	Ascomycota	_Sordariomycetes	Sordariales	_Chaetomiaceae	_Chaetomium	_Chaetomium_sp	97,4
OTU_8	684	1,89	Rhodotorula mucilaginosa	AF444541	Basidiomycota	_Microbotryomycetes	Sporidiobolales	_Incertae_sedis	_Rhodotorula	_Rhodotorula_mucilaginosa	100
OTU_9	1042	2,89	Wallemia sebi	KJ409884	Basidiomycota	_Wallemiomycetes	Wallemiales	_Wallemiaceae	_Wallemia	_Wallemia_sebi	97,5

C: Tabela OTUs

OTU ID	Nome do taxon	Porcentagem identificada
OTU_1;	Yarrowia_lipolytica	100
OTU_10;	Monascella_botryosa	98,8
OTU_100;	Rhinocladiella_sp_MA_465	94,5
OTU_101;	Paraphaeosphaeria_michotii	93,9
OTU_101;	Paraphaeosphaeria_pilleata	93,9
OTU_101;	Paraphaeosphaeria_sp_TMS_2011	93,9
OTU_102;	Trimmatostroma_cordae	93,3
OTU_103;	Penicillium_citrinum	96,4
OTU_104;	Aspergillus_janus	91,3
OTU_105;	Candida_sp	99,3
OTU_106;	Lophodermium_sp	95,5
OTU_106;	Rutstroemia_elatina	95,5
OTU_107;	Cladosporium_dominicanum	97,2
OTU_108	Metarhizium_pinghaense	98,4
OTU_109	Hannaella_luteola	96,8
OTU_11	Penicillium_melinii	98,9
OTU_110	Cladosporium_exasperatum	93,3
OTU_111	Tumularia_sp	96,1
OTU_112	Aspergillus_amstelodami	92,8
OTU_112	Aspergillus_cibarius	92,8
OTU_112	Aspergillus_ruber	92,8
OTU_113	Rutstroemia_elatina	96,2
OTU_113	Lophodermium_sp	96,2
OTU_114	Capronia_sp	94,3
OTU_114	Cladophialophora_sp	94,9
OTU_114	Moristroma_quercinum	94
OTU_115	Monascella_botryosa	90,3
OTU_116	Preussia_sp	91,6
OTU_117	Phoma_medicaginis	96,9
OTU_118	Wallemia_sebi	98,1
OTU_119	Chaetomium_sp_3258	93,5
OTU_12	Yamadazyma_triangularis	99,1
OTU_120	Chaetomium_jatrophae	90,7
OTU_120	Chaetomium_nigricolor	90,7
OTU_121	Lophodermium_sp	94,7
OTU_122	Penicillium_citrinum	97,4
OTU_123	Rousoella_chiangraina	94,1
OTU_124	Westerdykella_dispersa	94,2
OTU_125	Arnium_sp	95,8

OTU_126	Helicoma_sp	97,4
OTU_127	Eutypella_citricola	96,1
OTU_127	Eutypella_citricola	96,1
OTU_127	Eutypella_sp_W57_7	96,1
OTU_127	Anthostoma_decipiens	96,1
OTU_127	Diatrype_stigma	96,1
OTU_127	Eutypella_cerviculata	96,1
OTU_127	Eutypella_vitis	96,1
OTU_127	Eutypella_vitis	96,1
OTU_128	Trechispora_sp	98,9
OTU_129	Cladosporium_flabelliforme	95,5
OTU_129	Cladosporium_exasperatum	95,5
OTU_13	Candida_neustonensis	100
OTU_130	Lophodermium_sp	95,6
OTU_131	Aspergillus_caesiellus	95,1
OTU_132	Diaporthe_pseudomangiferae	91,7
OTU_132	Diaporthe_pascoei	91,7
OTU_132	Diaporthe_pterocarpicola	91,7
OTU_132	Diaporthe_pseudophoenicicola	91,7
OTU_132	Diaporthe_musigena	91,7
OTU_132	Diaporthe_fraxini-angustifoliae	91,7
OTU_132	Diaporthe_arengae	91,7
OTU_132	Diaporthe_litchicola	91,7
OTU_132	Diaporthe_hongkongensis	91,7
OTU_132	Phomopsis_cf_phyllanthicola_MY_2011	91,7
OTU_132	Phomopsis_sp_8_JVN_2004	91,7
OTU_132	Phomopsis_phyllanthicola	91,7
OTU_132	Phomopsis_columnaris	91,7
OTU_132	Phomopsis_sp_H4303	91,7
OTU_132	Diaporthe_sp_ZH78	91,7
OTU_132	Diaporthe_sp_MFLUCC_10_0601	91,7
OTU_132	Phomopsis_sp_SS_1849	91,7
OTU_132	Diaporthe_sp	91,7
OTU_132	Diaporthe_arecae	91,7
OTU_133	Capronia_sp_94003b	94,9
OTU_134	Mycosphaerella_areola	96,3
OTU_135	Staphylotrichum_sp	96,8
OTU_136	Oidiodendron_sp	90,8

OTU_136	Oidiodendron_sp	90,8
OTU_136	Diaporthe_sp_1_19	90,8
OTU_136	Phyllosticta_hamamelidis	90,8
OTU_136	Phyllosticta_sp_1_ICMP_18855	90,8
OTU_136	Diaporthe_sp_1_27	90,8
OTU_136	Oidiodendron_tenuissimum	90,8
OTU_136	Phyllosticta_ardisiicola	90,8
OTU_136	Phyllosticta_beumarisii	90,8
OTU_136	Oidiodendron_cereale	90,8
OTU_136	Oidiodendron_chlamyosporicum	90,8
OTU_136	Oidiodendron_echinulatum	90,8
OTU_136	Neofusicoccum_pennatisporum	90,8
OTU_136	Huntiella_tyalla	90,8
OTU_136	Neofusicoccum_cordaticola	90,8
OTU_136	Guignardia_sp_MUCC0524	90,8
OTU_136	Oidiodendron_griseum	90,8
OTU_136	Oidiodendron_sp_12216	90,8
OTU_136	Oidiodendron_sp_CY253	90,8
OTU_136	Oidiodendron_sp	90,8
OTU_136	Geosmithia_sp_NRRL_35616	90,8
OTU_136	Oidiodendron_griseum	90,8
OTU_136	Oidiodendron_myxotrichoides	90,8
OTU_136	Oidiodendron_rhodogenum	90,8
OTU_136	Volutella_sp	90,8
OTU_136	Scolecobasidium_sp	90,8
OTU_136	Stegonsporium_acerinum	90,8
OTU_136	Stegonsporium_acerophilum	90,8
OTU_136	Volutella_sp	90,8
OTU_136	Amorphotheca_resinae	90,8
OTU_136	Stegonsporium_opalus	90,8
OTU_136	Stegonsporium_protopyriforme	90,8
OTU_137	Lectera_longa	96,7
OTU_138	Penicillium_parvum	92,7
OTU_139	cf_Stagonospora_sp_CBS_51674	94,3
OTU_14	Stagonospora_sp_AX113	98,9
OTU_140	Aspergillus_sp_DY115_21_8_M4	95,7
OTU_141	Rhinochrysiella_sp_EXP0525F	96,5
OTU_142	Letrouitia_subvulpina	89,7
OTU_142	Letrouitia_flavidula	94,2
OTU_143	Oidiodendron_sp	91,6
OTU_144	Isaria_cateniannulata	98,2
OTU_145	Corynespora_smithii	88,3
OTU_145	Berkleasium_sp	93,7
OTU_145	Preussia_sp	93,7

OTU_146	<i>Chaetosphaeria_fusifformis</i>	96,2
OTU_146	<i>Acremonium_hennebertii</i>	96,2
OTU_146	<i>Chaetosphaeria_callimorpha</i>	96,2
OTU_147	<i>Cirrenalia_macrocephala</i>	92,8
OTU_148	<i>Paraconiothyrium_variabile</i>	95,7
OTU_149	<i>Fusarium_keratoplasticum</i>	94,5
OTU_149	<i>Fusarium_oxysporum_f_sp_lycopersici</i>	95,8
OTU_15	<i>Aspergillus_sp_DY115_21_8_M4</i>	98,2
OTU_150	<i>Podospora_sp</i>	96,4
OTU_151	<i>Rutstroemia_elatina</i>	94,7
OTU_151	<i>Sympodiella_acicola</i>	94,7
OTU_152	<i>Thielavia_tortuosa</i>	91,9
OTU_153	<i>Rutstroemia_elatina</i>	95,5
OTU_154	<i>Wettsteinina_lacustris</i>	87,8
OTU_155	<i>Acremonium_sp_TR080</i>	94,3
OTU_156	<i>Cylindrocarpon_decumbens</i>	97,5
OTU_157	<i>Conlarium_sp</i>	92
OTU_158	<i>Aspergillus_austroafricanus</i>	96,5
OTU_159	<i>Lophodermium_sp</i>	94
OTU_159	<i>Rutstroemia_elatina</i>	94
OTU_16	<i>Candida_haemulonis</i>	100
OTU_160	<i>Mariannaea_sp</i>	98,3
OTU_161	<i>Candida_duobushaemulonis</i>	98
OTU_162	<i>Alpakesa_nolinae</i>	91
OTU_163	<i>Aspergillus_sp</i>	89,7
OTU_164	<i>Rhodotorula_oligophaga</i>	100
OTU_165	<i>Lophodermium_sp</i>	95,5
OTU_166	<i>Coprinus_annuloporus</i>	94,2
OTU_167	<i>Cladophialophora_sp</i>	97,2
OTU_168	<i>Penicillium_klebahnii</i>	97,2
OTU_169	<i>Trichoderma_spirale</i>	99,1
OTU_169	<i>Trichoderma_longipilis</i>	99,1
OTU_17	<i>Chaetomium_sp</i>	97,4
OTU_170	<i>Montagnula_aloës</i>	93
OTU_171	<i>Dictyosporium_stellatum</i>	97,5
OTU_172	<i>Pseudorobillarda_sp</i>	88
OTU_173	<i>Geastrum_campestre</i>	97,2
OTU_174	<i>Bionectria_ochroleuca</i>	91,8
OTU_175	<i>Aspergillus_fumigatus</i>	92,5
OTU_175	<i>Penicillium_daleae</i>	91,7
OTU_176	<i>Lophodermium_sp</i>	96,2
OTU_176	<i>Rutstroemia_elatina</i>	96,2
OTU_177	<i>Auxarthron_californiense</i>	96,9
OTU_178	<i>Camarographium_koreanum</i>	92,2

OTU_179	Podospora_sp	92,6
OTU_18	Rutstroemia_elatina	96,2
OTU_18	Lophodermium_sp	96,2
OTU_180	Inocybe_leucoloma	99,4
OTU_180	Inocybe_malenconii_var_megalospora	99,4
OTU_180	Inocybe_leucoblema	99,4
OTU_180	Inocybe_leucoloma	99,4
OTU_180	Inocybe_sp	95
OTU_180	Inocybe_sp	95,2
OTU_180	Inocybe_malenconii	99,4
OTU_180	Inocybe_myriadophylla	99,4
OTU_180	Inocybe_cf_squarrosoannulata_CLC1566	99,4
OTU_180	Inocybe_dulcamara	99,4
OTU_180	Scleroderma_sinnamariense	99,2
OTU_180	Scleroderma_yunnanense	98,2
OTU_180	Inocybe_gymnocarpa	99,7
OTU_180	Inocybe_leucoblema	99,4
OTU_180	Inocybe_dulcamara	99,4
OTU_180	Inocybe_fuscomarginata	99,7
OTU_180	Inocybe_squarrosoannulata	99,4
OTU_180	Tomentella_sp	99,1
OTU_180	Gyroporus_longicystidiatus	99,7
OTU_180	Inocybe_terrigena	99,4
OTU_180	Tomentella_tedersooi	99,7
OTU_180	Hysterangium_sp_3_RG_2012	98
OTU_180	Mallocybe_agardhii_var_areneria	99,4
OTU_180	Inocybe_substraminipes	99,4
OTU_180	Inocybe_squarrosoannulata	99
OTU_180	Inocybe_substraminipes	96,1
OTU_180	Inocybe_substraminipes	99,4
OTU_180	Tomentella_sp KF296779	99,4
OTU_181	Bandoniozyma_complexa	98,8
OTU_182	Candida_parapsilosis	94,5
OTU_183	Corynespora_citricola	93,5
OTU_184	Tumularia_sp	95,1
OTU_185	Diaporthe_pterocarpicola	94,7
OTU_185	Diaporthe_pseudophoenicicola	94,7
OTU_185	Diaporthe_pseudomangiferae	94,7
OTU_185	Diaporthe_sp_MFLUCC_10_0601	94,7
OTU_185	Phomopsis_cf_phyllanthicola_MY_2011	94,7
OTU_185	Diaporthe_sp	94,7
OTU_185	Diaporthe_sp_ZH78	94,7
OTU_185	Diaporthe_fraxini-angustifoliae	94,7
OTU_185	Diaporthe_arengae	94,7

OTU_185	Diaporthe_arecae	94,7
OTU_185	Diaporthe_hongkongensis	94,7
OTU_185	Diaporthe_pascoei	94,7
OTU_185	Diaporthe_musigena	94,7
OTU_185	Diaporthe_litchicola	94,7
OTU_185	Phomopsis_columnaris	94,7
OTU_185	Phomopsis_sp_SS_1849	94,7
OTU_185	Phomopsis_phyllanthicola	94,7
OTU_185	Phomopsis_sp_H4303	94,7
OTU_185	Phomopsis_sp_8_JVN_2004	94,7
OTU_186	Collophora_sp_TP_Snow_Y69	89,1
OTU_186	Claussenomyces_sp	89,1
OTU_187	Sympodiella_acicola	94,6
OTU_188	Pseudorobillarda_sp	94,2
OTU_189	Westerdykella_dispersa	97,5
OTU_19	Botrytis_caroliniana	100
OTU_19	Botryotinia_fuckeliana	100
OTU_19	Botryotinia_fuckeliana	100
OTU_190	Pyrenochaeta_sp_5_12c	91
OTU_190	Leptosphaeria_sp	90,4
OTU_190	Mycoblastus_fucatus	91
OTU_190	Pyrenochaetopsis_leptospora	90,4
OTU_191	Podospora_immersa	99,4
OTU_192	Pseudophialophora_panicorum	97,3
OTU_193	Rutstroemia_elatina	95,5
OTU_193	Lophodermium_sp	95,5
OTU_194	Podospora_austroamericana	95,5
OTU_195	Coniochaeta_sp	91
OTU_196	Tremella_sp	96,1
OTU_197	Lophodermium_sp	93,2
OTU_197	Leohumicola_sp	93,2
OTU_198	Wallemia_sebi	98,2
OTU_199	Mycena_sp	99,2
OTU_2	Cladosporium_halotolerans	100
OTU_20	Westerdykella_dispersa	95,8
OTU_200	Pleurophragmium_sp_J530	91,1
OTU_201	Bionectria_grammicospora	94,4
OTU_201	Bionectria_levigata	94,4
OTU_202	Acremonium_chrysogenum	98,5
OTU_203	Aspergillus_sp_F55	95,8
OTU_204	Cladosporium_sphaerospermum	98,7
OTU_205	Amyloflagellula_inflata	96,1
OTU_206	Myrothecium_tongaense	97,4
OTU_207	Recurvomyces_mirabilis	90,3

OTU_208	Microdiplodia_sp	94,1
OTU_208	Paraconiothyrium_sp	93,9
OTU_208	Paraconiothyrium_sp	94,1
OTU_209	Pyricularia_sp_MAFF_306672	98,2
OTU_21	Aspergillus_ruber	100
OTU_21	Aspergillus_cibarius	100
OTU_210	Lophodermium_sp	96,3
OTU_211	Talaromyces_bacillisporus	96,7
OTU_211	Talaromyces_bacillisporus	97,2
OTU_212	Pichia_sp_CBS_209	99,6
OTU_213	Pseudeurotium_sp_MF_5	97
OTU_214	Preussia_terricola	93,3
OTU_215	Aspergillus_sp_DY115_21_8_M4	90,7
OTU_216	Geoglossum_difforme	98,1
OTU_217	Bisporella_citrina	96,1
OTU_218	Sporopachydermia_lactativora	99,7
OTU_219	Rutstroemia_elatina	94,7
OTU_219	Lophodermium_sp	94,7
OTU_22	Monascella_botryosa	93,1
OTU_220	Penicillium_sp	92,4
OTU_221	Nectria_rubropeziza	90,2
OTU_222	Lecythophora_sp	97,4
OTU_223	Stylonectria_sp	96,3
OTU_224	Thanatephorus_cucumeris	99,2
OTU_224	Ceratobasidium_sp_CSLBin010	98,5
OTU_225	Acremonium_persicinum	97,9
OTU_226	Paraphaeosphaeria_michotii	98
OTU_227	Preussia_sp HM161973	89,7
OTU_228	Cladosporium_adianticola	90,2
OTU_229	Glomus_sp_10_SUN_2011	85,6
OTU_23	Lophiostoma_sp_DMW2181	99,7
OTU_230	Gaeumannomyces_incrustans	98,3
OTU_231	Aspergillus_sp	92,3
OTU_232	Arnium_sp	93,2
OTU_233	Plantae_sp	90,4
OTU_234	Pseudorobillarda_sp	95,7
OTU_235	Metacordyceps_chlamydosporia	94,7
OTU_236	Ceratomyrium_podocarpi	95,1
OTU_237	Archaeorhizomyces_sp	90,6
OTU_238	Aspergillus_sp_DY115_21_8_M4	92,4
OTU_239	Absidia_sp_RSPG_214	93,7
OTU_24	Cryptococcus_sp_	91,8
OTU_240	Zopfiella_sp	98,8
OTU_241	Lepiota_tomentella	93,3

OTU_242	Trechispora_sp	95,2
OTU_243	Amauroascus_oblatus	92
OTU_244	Spizellomyces_kniepii	95,9
OTU_244	Spizellomyces_sp	95,9
OTU_244	Spizellomyces_acuminatus	95,9
OTU_245	Curvularia_verruculosa	97,3
OTU_246	Exophiala_pisciphila	96,5
OTU_247	Lophiostoma_corticola	88,1
OTU_248	Penicillium_parvum	97,2
OTU_249	Spizellomyces_sp	99,1
OTU_249	Spizellomyces_kniepii	99,1
OTU_249	Spizellomyces_acuminatus	99,1
OTU_25	Sterigmatomyces_halophilus	100
OTU_250	Preussia_sp_BSH29	92,6
OTU_251	Cryptococcus_laurentii	98,5
OTU_252	Placidium_lacinulatum_var_erythrostratum	92,2
OTU_253	Trichoderma_koningiopsis	100
OTU_253	Trichoderma_gamsii	100
OTU_253	Trichoderma_koningiopsis	100
OTU_254	Nectria_sp	93
OTU_255	Chaetomium_sp	92,1
OTU_256	Rutstroemia_elatina	93,9
OTU_256	Leohumicola_sp	93,9
OTU_256	Lophodermium_sp	93,9
OTU_257	Exobasidium_sp	99,7
OTU_258	Cladophialophora_sp	87,8
OTU_259	Ilyonectria_estremocensis	93
OTU_26	Tomentella_sp	92
OTU_260	Conocybe_mandshurica	91,6
OTU_261	Entrophospora_sp	88,9
OTU_262	Spizellomyces_palustris	97,4
OTU_263	Penicillium_striatisporum	95,5
OTU_264	Alternaria_alternata	100
OTU_264	Alternaria_eichhorniae	100
OTU_264	Alternaria_porri	100
OTU_264	Alternaria_alternata	100
OTU_265	Cladoriella_paleospora	89
OTU_266	Antrodia_oleracea	92,4
OTU_267	Aspicilia_rivulicola	90
OTU_267	Aspicilia_mashiginensis	90
OTU_267	Lobothallia_alphoplaca	90
OTU_267	Aspicilia_dendroplaca	90
OTU_268	Prosopidicola_mexicana	89,9
OTU_269	Cladosporium_halotolerans	96,8

OTU_27	<i>Cylindrosyndodium_lauri</i>	95,5
OTU_27	<i>Lanzia_echinophila</i>	95,5
OTU_27	<i>Rutstroemia_sydowiana</i>	95,5
OTU_270	<i>Yarrowia_lipolytica</i>	100
OTU_271	<i>Madurella_fahalii</i>	91,7
OTU_272	<i>Schizothecium_dakotense</i>	97,1
OTU_273	<i>Archaeorhizomyces_sp</i>	92,9
OTU_274	<i>Lophodermium_sp</i>	95,5
OTU_274	<i>Rutstroemia_elatina</i>	95,5
OTU_275	<i>Trichoderma_aeroaquaticum</i>	88,5
OTU_275	<i>Hypocrea_neorufa</i>	88,5
OTU_276	<i>Archaeorhizomyces_sp</i>	84,5
OTU_277	<i>Lecanora_swartzii</i>	95,5
OTU_277	<i>Talaromyces_cf_funiculosus_Fun11</i>	95,5
OTU_278	<i>Jahnula_sp</i>	89,8
OTU_279	<i>Pulvinula_sp</i>	89,1
OTU_28	<i>Fusarium_oxysporum_f_sp_lycopersici</i>	100
OTU_280	<i>Moristroma_quercinum</i>	95,2
OTU_281	<i>Scedosporium_fusoideum</i>	99,7
OTU_282	<i>Toxicocladosporium_leucadendri</i>	93,9
OTU_283	<i>Penicillium_sp_13_M_2</i>	95
OTU_284	<i>Jahnula_sp</i>	93,8
OTU_285	<i>Scytalidium_sphaerosporum</i>	96,3
OTU_286	<i>Helvella_leucomelaena</i>	99,4
OTU_287	<i>Coniosporium_sp_SL1131</i>	96
OTU_288	<i>Wallemia_muriae</i>	89,9
OTU_289	<i>Leohumicola_sp</i>	93,9
OTU_289	<i>Lophodermium_sp</i>	93,9
OTU_29	<i>Cladosporium_exasperatum</i>	97,2
OTU_290	<i>Rhizophagus_intraradices</i>	95,7
OTU_290	<i>Rhizophagus_intraradices</i>	95,7
OTU_290	<i>Rhizophagus_intraradices</i>	95,7
OTU_291	<i>Lycoperdon_pratense</i>	97,6
OTU_292	<i>Exophiala_sideris</i>	92
OTU_293	<i>Cladosporium_halotolerans</i>	95
OTU_294	<i>Lectera_longa</i>	96
OTU_295	<i>Podospora_sp</i>	97
OTU_296	<i>Rasamsonia_sp</i>	97,1
OTU_297	<i>Verpa_sp_NSW_6410</i>	95,6
OTU_297	<i>Morchella_steppicola</i>	95,6
OTU_297	<i>Morchella_rufobrunnea</i>	95,6
OTU_298	<i>Aspergillus_sp_F55</i>	95,4
OTU_299	<i>Pustularia_sp</i>	93,6
OTU_3	<i>Candida_etchellsii</i>	99,2

OTU_30	Rutstroemia_elatina	95,5
OTU_300	Talaromyces_minioluteus	88
OTU_301	Gongronella_butleri	99,4
OTU_302	Paramicrosporidium_saccamoebae	86
OTU_303	Fusarium_sp_MS294	88,2
OTU_304	Bionectria_levigata	88
OTU_305	Rousoella_thailandica	94,5
OTU_306	Sclerotinia_bulborum	94,7
OTU_307	Chaetosphaeria_sp	98,4
OTU_308	Cryptococcus_sp_APSS_870	94,9
OTU_309	Rutstroemia_sydowiana	94,7
OTU_309	Cylindrosyndonium_lauri	94,7
OTU_309	Lanzia_echinophila	94,7
OTU_31	Pseudophialophora_schizachyrii	99
OTU_310	Chaetomium_sp	93,9
OTU_311	Candida_parapsilosis	99,4
OTU_312	Chamaeleomyces_granulomatis	96,4
OTU_313	Conlarium_sp	98,8
OTU_314	Gymnoascus_sp_IFM_58267	95,3
OTU_314	Gymnascella_aurantiaca	95,3
OTU_315	Acremonium_sp_GS5_1_11	95,7
OTU_316	Guignardia_sp_MUCC0524	93,1
OTU_316	Phyllosticta_ardisiicola	93,1
OTU_316	Phyllosticta_hamamelidis	93,1
OTU_317	Malassezia_sp	99,5
OTU_318	Cladosporium_halotolerans	94,1
OTU_319	Preussia_sp	92,8
OTU_32	Capnobotryella_sp_MA_4624	93,8
OTU_320	Archaeorhizomyces_sp	90,2
OTU_321	Hanseniaspora_opuntiae	99,2
OTU_322	Preussia_sp	89,9
OTU_323	Candida_etchellsii	94,8
OTU_324	Sporormiella_dakotensis	92,7
OTU_325	Colletotrichum_sp	93,3
OTU_326	Spiromastix_warcupii	96,2
OTU_327	Mycoleptodiscus_sp_WZS7277	94,5
OTU_328	Cladoriella_paleospora	89
OTU_329	Cladoriella_paleospora	88,4
OTU_33	Nigrospora_sp_Fun25W2	99,4
OTU_33	Nigrospora_sp	99,4
OTU_330	Spiromastix_warcupii	91,2
OTU_334	Malassezia_restricta	99,5
OTU_34	Archaeorhizomyces_sp	91,6
OTU_35	Lectera_longa	99,3

OTU_353	<i>Cryptosphaeria_sp_NSW05PO</i>	97,1
OTU_353	<i>Cryptosphaeria_pullmanensis</i>	97,1
OTU_353	<i>Diatrype_whitmanensis</i>	97,1
OTU_353	<i>Eutypa_consobrina</i>	97,1
OTU_358	<i>Bionectria_ochroleuca</i>	90,4
OTU_36	<i>Odontia_sp</i>	100
OTU_36	<i>Inocybe_sp</i>	100
OTU_360	<i>Fusarium_oxysporum_f_sp_lycopersici</i>	94,1
OTU_37	<i>Fusarium_proliferatum</i>	99,4
OTU_38	<i>Cladosporium_dominicanum</i>	99,1
OTU_38	<i>Cladosporium_sphaerospermum</i>	99,1
OTU_39	<i>Pseudorobillarda_sp</i>	90,9
OTU_390	<i>Spizellomyces_sp</i>	97,4
OTU_390	<i>Spizellomyces_dolichospermus</i>	95,8
OTU_396	<i>Candida_parapsilosis</i>	97,4
OTU_4	<i>Candida_parapsilosis</i>	99,7
OTU_40	<i>Trichoderma_cerinum</i>	99
OTU_41	<i>Uwebraunia_australiensis</i>	99
OTU_42	<i>Archaeorhizomyces_sp</i>	89,5
OTU_422	<i>Malassezia_yamatoensis</i>	98,1
OTU_422	<i>Malassezia_japonica</i>	98,1
OTU_422	<i>Malassezia_furfur</i>	98,1
OTU_43	<i>Homortomyces_sp_NW_2013</i>	91,2
OTU_44	<i>Cryptococcus_aff_amylolyticus_AS_22501</i>	95,4
OTU_45	<i>Dermatocarpon_polyphyllizum</i>	91,2
OTU_45	<i>Dermatocarpon_arenosaxi</i>	91,2
OTU_45	<i>Hydropunctaria_maura</i>	91,2
OTU_45	<i>Dermatocarpon_dolomiticum</i>	91,2
OTU_45	<i>Placidium_lacinulatum_var_erythrostratum</i>	91,2
OTU_45	<i>Psoroglaena_sp</i>	91,2
OTU_45	<i>Verrucaria_nigrescens</i>	91,2
OTU_45	<i>Placidium_squamulosum</i>	91,2
OTU_452	<i>Thozetella_sp_ASR_257</i>	99,6
OTU_454	<i>Hypotrachyna_polydactyla</i>	96,2
OTU_454	<i>Myelochroa_galbina</i>	96,2
OTU_454	<i>Hypotrachyna_leiophylla</i>	96,2
OTU_454	<i>Hypotrachyna_immaculata</i>	96,2
OTU_46	<i>Phialophora_hyalina</i>	95,5
OTU_47	<i>Malassezia_japonica</i>	100
OTU_48	<i>Pyrenochaetopsis_pratorum</i>	99,3
OTU_49	<i>Stephanonectria_sp</i>	100
OTU_5	<i>Lophodermium_sp</i>	96,3
OTU_50	<i>Beauveria_sp</i>	99,1
OTU_51	<i>Recurvomyces_mirabilis</i>	91,2

OTU_68	<i>Paraconiothyrium_hawaiiense</i>	91,1
OTU_68	<i>Paraconiothyrium_sp_JP_2013a</i>	91,5
OTU_68	<i>Microdiplodia_sp_GSL2_4_1</i>	91,1
OTU_69	<i>Malassezia_pachydermatis</i>	88,5
OTU_7	<i>Candida_galli</i>	
OTU_70	<i>Phialemoniopsis_cornearis</i>	99,1
OTU_70	<i>Phialemonium_curvatum</i>	99,1
OTU_71	<i>Metarhizium_anisopliae</i>	96,9
OTU_72	<i>Thermomyces_lanuginosus</i>	92,7
OTU_72	<i>Penicillium_lignorum</i>	93,3
OTU_73	<i>Bionectria_sp</i>	95,5
OTU_74	<i>Cyphellophora_suttonii</i>	97,2
OTU_74	<i>Cyphellophora_vermispورا</i>	97,2
OTU_74	<i>Cyphellophora_sp_TMS_2011</i>	98
OTU_75	<i>Hansfordia_pulvinata</i>	99,6
OTU_76	<i>Cylindrosyndodium_lauri</i>	93,3
OTU_77	<i>Stagonospora_sp_AX113</i>	96,6
OTU_78	<i>Leptodontidium_sp</i>	96,9
OTU_79	<i>Coniothyrium_sp_HKA14</i>	93,7
OTU_8	<i>Rhodotorula_mucilaginosa</i>	100
OTU_80	<i>Entrophospora_sp</i>	97,2
OTU_81	<i>Sympodiella_acicola</i>	90,2
OTU_82	<i>Entrophospora_sp</i>	96,5
OTU_83	<i>Aspergillus_caesiellus</i>	94,6
OTU_84	<i>Candida_intermedia</i>	99,6
OTU_84	<i>Candida_intermedia</i>	99,6
OTU_85	<i>Candida_neustonensis</i>	95,3
OTU_86	<i>Tumularia_sp</i>	94,8
OTU_87	<i>Pseudocercospora_norchiensis</i>	100
OTU_88	<i>Podospora_longicaudata</i>	93,2
OTU_89	<i>Rutstroemia_elatina</i>	95,5
OTU_9	<i>Wallemia_sebi</i>	97,5
OTU_90	<i>Tricholoma_orirubens</i>	97
OTU_91	<i>Setophoma_sacchari</i>	91,9
OTU_92	<i>Chaetomium_sp</i>	94,7
OTU_93	<i>Pseudorobillarda_sp</i>	88,6
OTU_94	<i>Penicillium_citreonigrum</i>	93,1
OTU_95	<i>Phaeoacremonium_sp</i>	97,2
OTU_96	<i>Archaeorhizomyces_sp</i>	97
OTU_96	<i>Archaeorhizomyces_sp</i>	97
OTU_96	<i>Archaeorhizomyces_sp</i>	97
OTU_97	<i>Pseudophialophora_schizachyrii</i>	94,6
OTU_98	<i>Fusarium_oxysporum</i>	99,6
OTU_99	<i>Fomitiporia_polymorpha</i>	94,9

