



**ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E  
SUSTENTABILIDADE**

POSSÍVEIS RELAÇÕES ENTRE ÁREAS DE PRESERVAÇÃO  
PERMANENTE DA USINA HIDRELÉTRICA DE CACONDE – SP E  
DIVERSIDADE DE FUNGOS: SUBSÍDIOS PARA AGRICULTURA  
CAFEEIRA NO MUNICÍPIO

Por

Irina Annelí Cabrerizo Suaznabar

Nazaré Paulista

Janeiro/2017



## **ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE**

Possíveis relações entre áreas de preservação permanente da  
Usina Hidrelétrica de Caconde – SP e diversidade de fungos:  
Subsídios para a agricultura cafeeira no Município.

Por

Irina Annelí Cabrerizo Suaznabar

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Pedro Miguel Da Costa Pedro

Prof. MSc. Jefferson Ferreyra Lima

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

Janeiro/2017

## Ficha Catalográfica

Suaznabar, Irina Annelí Cabrerizo

Possíveis relações entre áreas de preservação permanente da Usina Hidrelétrica de Caconde – SP e diversidade de fungos: Subsídios para a agricultura cafeeira no Município: 2017. 121pp.

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

1. Micologia;
2. Agricultura;
3. Metagenômica.
  - I. Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade, IPÊ – Nazaré Paulista/SP.

## **BANCA EXAMINADORA**

Nazaré Paulista, 09 de fevereiro de 2017.

---

Prof. Dr. Pedro Miguel Da Costa Pedro

---

Prof. Dr. Laury Cullen Jr.

---

Prof. Dra. Leonor Costa Maia

Ao meu amado pai, que perdi neste trajeto mas que está presente comigo em todos os momentos.

À minha mãe, que é um exemplo trabalho, paixão e força.

Dedico!

"Si asumes que no hay esperanza, garantizas que no habrá esperanza. Si asumes que hay un instinto hacia la libertad, que hay oportunidades para cambiar las cosas, entonces hay una posibilidad de que puedas contribuir a hacer un mundo mejor. Esa es tu alternativa" Noam Chomsky.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradecer a Deus e a mãe Maria pela força para cumprir um sono, por me apresentar a pessoas especiais e por me oferecer a oportunidade de continuar aprendendo.

Ao meu querido orientador e amigo o Prof. Dr. Pedro Pedro pela oportunidade, a confiança, a paciência e a orientação durante todo período do trabalho de desenvolvimento da pesquisa, Pedro, você é uma pessoa incrível.

A AES-Tiete e o projeto P&D ANEEL – 0064-1035/2014 pelo apoio através da bolsa de estudos, sem a qual não seria possível a realização do mestrado. Especialmente a enorme dedicação da gerente do projeto Tatiane Rech pelo apoio incondicional. Manifestamos também nossos agradecimentos ao Sr. Fabio Dotto da Farol Consultoria pela gestão financeira do projeto.

Ao Laboratório Faculdade de Saúde Pública na Universidade de São Paulo, em especial a Dra. Maria Helena Matte pela facilitação do uso da unidade.

Aos proprietários da Fazenda São Luis do município de Caconde – SP, que nos receberam sempre de braços abertos e facilitaram todos os meios para poder realizar a presente pesquisa.

Ao Prof. Jefferson Lima pelo apoio, as sugestões e todas as contribuições.

Aos membros da minha banca, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leonor Costa Maia e o Prof. Dr. Laury Cullen, pela participação, colaboração, ideias, sugestões e principalmente pelo o interesse no presente trabalho.

A toda equipe da ESCAS – IPE, pela qualidade das aulas e seminários, pelo apoio, dedicação e carinho.

A todos os professores da ESCAS e dos seminários pelas aulas maravilhosas e inspiradoras.

Aos meus pais Luis Antonio e Luz Marina, pelo infinito amor e apoio durante todas as etapas da minha vida, são a minha maior inspiração.

A minha irmã Lucia, sua ajuda foi indispensável para eu chegar aqui, alentando-me a ir atrás dos meus sonhos. Tenho muito orgulho de você. Te amo!

Ao Diego, meu companheiro de todas as horas, sempre próximo mesmo à distância, pelo apoio, a paciência e por acreditar sempre em mim. Te amo!

Aos meus colegas de turma, pessoas especiais que me acompanharam, sem dúvida, no momento mais difícil da minha vida. Meus companheiros do

Intensivo, Eduardo, Mariela, Débora e Vanessa pelas conversas, os conselhos, a convivência, as risadas. Aos colegas do modular, em especial o Rafael, a Denise, a Erika, a Isabela e a Solange. Estarei esperando-os na Bolívia.

A Lili pelo tempo compartilhado, o apoio, todas as risadas e os choros, você é mais do que uma amiga, eu sei que ganhei uma irmã.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a realizar o presente trabalho.

Muito Obrigada!

## Resumo

O café é o produto agrícola mais valioso no comércio internacional, sendo que o Brasil se destaca como o principal produtor, exportador e o segundo maior consumidor do grão. A diversidade de fungos associada aos cultivos agrícolas é de grande importância para o desenvolvimento da planta, pois apesar de alguns fungos serem patogênicos, muitos agem como biocontroladores, decompositores e promotores do crescimento, entre outras funções que desempenham. Portanto, é preciso conhecer quais são as principais espécies presentes nas lavouras. No presente estudo foram caracterizadas comunidades fúngicas que habitam nas folhas do café arábica, em uma fazenda convencional no município de Caconde – SP, utilizando técnicas de biologia molecular, através da extração do ADN das amostras, seguido do pirosequenciamento 454 da região espaçadora interna (ITS). Os resultados revelaram uma grande diversidade de fungos, 320 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) que apresentaram uma distribuição típica, com onze táxons dominantes e um grande número de espécies com baixa abundância. As espécies mais abundantes foram: *Cladosporium exasperatum*, *Derxomyces anomalus*, *Phoma glomerata*, e espécies do gênero *Cryptococcus*, entre outras. Além disso, foi avaliado se a distância e a conectividade com a área de preservação tiveram influência nas comunidades fúngicas. Os resultados de diversidade alfa, beta e filogenética não mostraram diferenças significativas, apresentando uma diversidade de fungos homogênea no interior da fazenda. Esse resultado pode ser atribuído aos fatores climáticos e às práticas de manejo, principalmente ao uso de controladores químicos. Através desse estudo, pode-se demonstrar o poder das tecnologias moleculares para a identificação de microrganismos, sendo uma ferramenta precisa, amplamente utilizada e cujos custos tem diminuído nos últimos anos; tornando-se acessível para os agricultores e para melhorar o gerenciamento das fazendas. Por outro lado, a manutenção de APPs (Áreas de Preservação Permanente) nas bordas dos reservatórios de forma integrada com paisagens agrícolas deve ser uma prioridade, pois estudos recentes afirmam que vários grupos taxonômicos, entre eles fungos, têm maior riqueza de espécies perto da floresta, enfatizando a importância da conservação de habitats naturais para sustentabilidade das plantações de café na região. Os serviços ecossistêmicos oferecidos pelas APPs da UHE de Caconde devem ser considerados de enorme importância sócio econômica regional, e utilizados em programas de educação ambiental buscando o envolvimento dos proprietários rurais que vivem as margens do reservatório. Com isso esperamos que e eles assumam o papel de verdadeiros guardiões dessas florestas. Estes resultados podem diminuir resistência de proprietários a permitir a implantação de APPs pela AES-Tietê no entorno da cultura cafeeira regional.

**Palavras-Chave:** *Coffea arabica*, diversidade de fungos, pirosequenciamento 454, paisagens florestais.

## Abstract

Coffee is the most valuable agricultural product in international trade, Brazil stands out as the main producer, exporter and the second largest consumer in the world. The diversity of fungi associated with agricultural crops is very important for the development of the plant, because although some fungi are pathogenic, many act as biocontroladores, decomposers and growth promoters, among other functions that they perform. Therefore, it is necessary to know which species are present in the crops. In this study, fungal communities that inhabit the leaves of Arabic Coffee were studied in a conventional farm in the city of Caconde - SP, using molecular biology techniques, by extracting the DNA from the samples, followed by the pyrosequencing 454 of the internal spacer region (ITS). The results revealed a great diversity of fungi, 320 Operational Taxonomic Units (OTUs) that presented a typical distribution, with eleven dominant taxa and a large number of species with low abundance. The most abundant were: *Cladosporium exasperatum*, *Dexomyces anomalus*, *Phoma glomerata*, and species of the genus *Cryptococcus*, among others. Moreover, we evaluated whether the distance and the connectivity with the preservation area had influence in the fungal communities. The results of alpha, beta and phylogenetic diversity did not show significant differences, presenting a homogeneous diversity of fungi inside the farm. This result can be attributed to climatic factors and management practices, mainly to the use of chemical controllers. Through this study, we demonstrate the reach of molecular technologies for the identification of microorganisms, being an accurate tool, widely used and whose costs have decreased in recent years, being accessible to farmers and improving farm management. In Addition, the maintenance of APPs (Permanent Preservation Areas) at the border of the reservoirs in an integrated way with agricultural landscapes should be a priority, as recent studies have stated that several taxonomic groups, among them fungi, have a greater species richness near the forest, emphasizing the importance of the conservation of natural habitats for the sustainability of coffee plantations in the region. The ecosystem services offered by the APPs of Caconde Hydroelectric Plant must be considered of great regional socioeconomic importance, and used in environmental education programs seeking the involvement of the rural landowners who live along the border of the reservoir. With this we hope that they will assume the role of true guardians of these forests. These results may reduce resistance of owners to allow the implementation of APPs by AES-Tietê in the surroundings of the regional coffee culture.

**Key words:** *Coffea arabica*, fungal diversity, 454 pyrosequencing, forest landscapes.

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO I</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>1.1 O Café</b> .....	13
1.1.1 Origem e aspectos gerais.....	13
1.1.2 Café no Contexto Mundial .....	14
1.1.3 Café no Brasil.....	17
1.1.4 Café no Estado de São Paulo .....	20
<b>1.2 Fungos Associados às Plantações de Café</b> .....	21
1.2.1 Fungos Patógenos do Café .....	22
1.2.2 Biocontroladores e fungos benéficos para o Café .....	29
<b>1.3 Importância da floresta, das Áreas de Preservação Permanente – APPs e distribuição espacial dos fungos</b> .....	35
<b>1.4 Métodos Moleculares para a Identificação de Fungos</b> .....	38
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	41
2.1 Objetivos Gerais.....	41
2.2 Objetivos Específicos .....	41
<b>CAPITULO II</b> .....	42
<b>DIVERSIDADE HOMOGÊNEA ESPACIAL DE COMUNIDADES DE FUNGOS DENTRO DE UMA FAZENDA CONVENCIONAL DE CAFÉ (<i>Coffea arabica</i>)</b> .....	42
<b>RESUMO</b> .....	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
2.1 Área de estudo .....	46
2.2 Desenho Amostral.....	46
2.3 Maceração, Extração e Amplificação de DNA e sequenciamento.....	48
2.4 Análise de Dados .....	49
<b>3. RESULTADOS</b> .....	51
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	70

<b>CAPITULO III</b> .....	72
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	72
<b>2. FUNGOS EM FOLHAS DO CAFÉ</b> .....	74
<b>3. CONTROLE DE DOENÇAS</b> .....	78
<b>4. IMPORTÂNCIA DA FLORESTA E DAS APPS DA UHE DE CACONDE</b> 84	
<b>5. COMO NOVAS TECNOLOGIAS PODEM AJUDAR A SOCIO- ECONOMIA DO ENTORNO DA UHE DE CACONDE?</b> .....	90
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	93
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
<b>ANEXOS</b> .....	115
<b>A. Tabela 'MIDs': MIDs utilizados para o sequenciamento nos 15 loais no interior da plantação de café</b> .....	115
<b>B. Tabela OTUs</b> .....	116

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Principais Países Produtores de Café no Mundo.....	14
Figura 2 Produção Mundial de Café Arábica e Robusta .....	15
Figura 3 Produção Mundial e Brasileira de Café.....	16
Figura 4 Consumo Mundial de Café.....	16
Figura 5 Produção de Café no Brasil pelos Principais Estados Brasileiros.....	18
Figura 6 Evolução do Consumo Interno de Café no Brasil.....	19
Figura 7 Sintomas da ferrugem do cafeeiro na superfície abaxial da folha.....	24
Figura 8 Sintomas da Mancha-de-Phoma nas folhas.....	26
Figura 9 Cercosporiose em folhas do cafeeiro.....	29
Figura 10 Infecção de <i>B. Bassiana</i> em frutos previamente atacados pela Broca do Café.....	32
Figura 11 Colonização de frutos pelo fungo <i>Cladosporium cladosporoides</i> .....	34
Figura 12 Diagrama do Processo de Pirosequenciamento. ....	39
Figura 13 O método de Pirosequenciamento.....	40
Figura 14 Mosaico Florestal na Área de Estudo: APP, Reservatório e Pontos de Coleta no Interior da Fazenda de café. ....	47
Figura 15 Localização dos pontos de amostragem na fazenda São Luis .....	47
Figura 16 Visão espacial da riqueza de espécies dos principais OTUs na Fazenda São Luis. ....	52
Figura 17 Percentagem de ocorrência dos principais OTUs encontrados nos pontos de coleta.....	53
Figura 18 Número de sequências encontradas por local de coleta.....	53
Figura 19 Curvas de rarefação.....	54
Figura 20 Árvores baseadas em comparações de diversidade beta: Bray-Curtis, Struceuclidean tree, Unweighted UNIFRAC, Unweighted UNIFRAC, Jclass, Memeuclidean.....	58
Figura 21 Diversidade Alfa .....	61
Figura 22 Principais Espécies de Fungos Identificadas em cada ponto de coleta na fazenda São Luis.....	75
Figura 23 Visão geral da metagenômica.....	91
Figura 24 Custo por megabase de DNA sequenciado. ....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Maiores Municípios Produtores de Café do Estado de São Paulo. ...	21
Tabela 2 'Mantel test': Significância das permutações de autocorrelação entre matrizes de distância geográfica e de diversidade de fungos. ....	56
Tabela 3 'NMDS1': NMDS para matrizes de diversidade beta versus conectividade com a floresta. ....	56
Tabela 4 'NMDS2': NMDS para as matrizes de diversidade versus a significância com os OTUs (segundo a correção Bonferroni). ....	57
Tabela 5 Diversidade alfa, baseada em filogenia escaled e unscaled. ....	59
Tabela 6 Diversidade alfa baseada nos Índices Chao, Shannon e Simpson ...	60
Tabela 7 Descrição das Principais espécies Identificadas. ....	76

# POSSÍVEIS RELAÇÕES ENTRE ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE DA USINA HIDRELÉTRICA DE CACONDE – SP E DIVERSIDADE DE FUNGOS: SUBSÍDIOS PARA A AGRICULTURA CAFEEIRA NO MUNICÍPIO

## CAPITULO I

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

#### 1.1 O Café

##### 1.1.1 Origem e aspectos gerais

Segundo os historiadores, o café tem sua origem e centro de dispersão na província de Kaffa na Etiópia, onde os primeiros consumidores foram os árabes, os quais cultivaram a espécie no lêmên no século XVI. Durante muitos anos a exportação da planta estava proibida fora das nações muçulmanas. Só a partir de 1690, os holandeses cultivaram a espécie na Indonésia e em 1706 um exemplar foi levado para o Jardim Botânico de Amsterdã. Posteriormente, mudas e sementes foram envidas para o Suriname, onde a cultura começou a espalhar-se no continente Americano (Carvalho, 2007).

A planta do café é uma dicotiledônea, vem de um arbusto perene que pertence à família *Rubiceae* e compreende 103 espécies (Davis et al. 2006), das quais *Coffea arabica* L. (variedade Arábica) e *Coffea canephora* P. (variedade Robusta ou Conilon) são consumidas globalmente. As duas espécies exigem condições ambientais específicas para o cultivo comercial. Temperaturas ideais entre 15°C e 25°C são necessárias para as plantações de café arábica e entre 21°C e 30° para o robusta, devem ser acompanhadas de precipitação anual de 1500 – 3000mm e um período seco para estimular o florescimento. A elevação é também um fator que diferencia a variedade arábica da robusta, sendo que, a primeira geralmente é cultivada em áreas montanhosas e a segunda pode crescer ao nível do mar (EMBRAPA, 2016).

Além disso, a cultura apresenta a característica fisiológica da bianualidade, ou seja, alta produção em um ano, alternada com uma baixa produção no ano seguinte.

### 1.1.2 Café no Contexto Mundial

O café têm grande importância no comércio internacional, ele é considerado o produto agrícola mais valioso (Fairtrade Foundation, 2012), e a segunda maior *commodity* no mundo em preço de mercado, unicamente superado pelo petróleo (Lewin et al., 2004).

Responsável pela subsistência de cerca de 125 milhões de pessoas (Fairtrade Foundation, 2012), o café é cultivado ao longo dos trópicos em cerca de 5 milhões de propriedades agrícolas em 85 países (Toledo e Moguel, 2012). No entanto, mais de 70% é produzido por apenas cinco deles: Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia e Etiópia (Figura 1) (ICO, 2015). A América Latina é o maior produtor regional com uma quota de 60%, seguida pela Ásia e Oceania (27%) e África (13%) (Fairtrade Foundation, 2012).

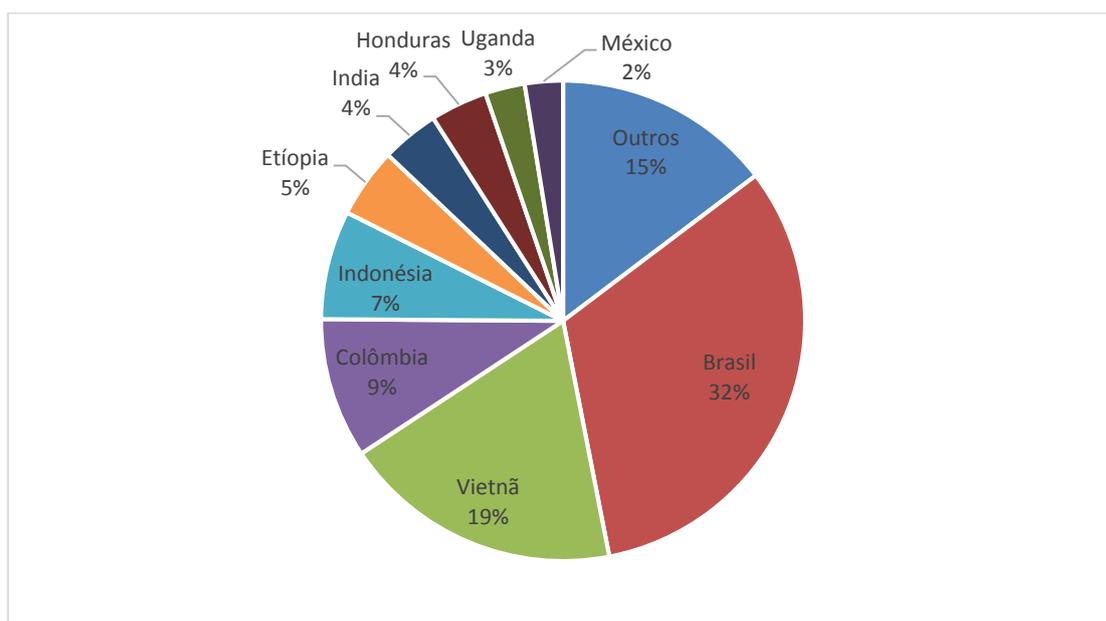


Figura 1 Principais Países Produtores de Café no Mundo. Fonte: Adaptado ICO, 2015.

A nível mundial a produção de café tem aumentado 73% entre 1980 e 2014. Observa-se, na última década, taxas moderadas de crescimento. O café robusta tem experimentado maior aumento do que o arábica, com taxas de 194% e 30% respectivamente. Atualmente, a produção de café arábica corresponde ao 55% do mercado, diferente da década dos anos oitenta em que essa variedade chegou a representar 80% da produção total (Figura 2) (CEDRSSA, 2014).

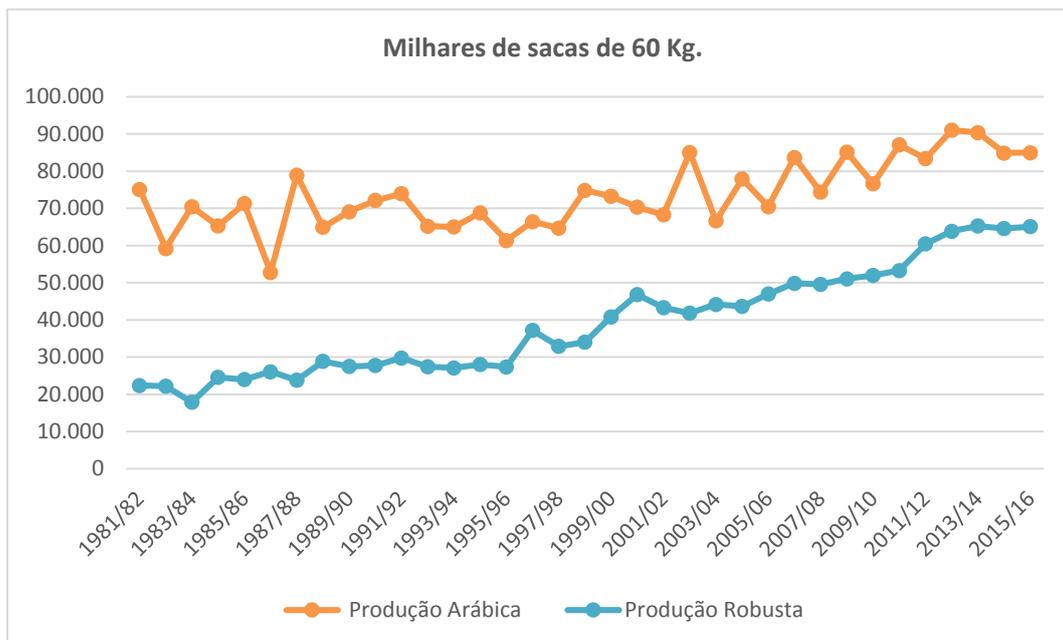


Figura 2 Produção Mundial de Café Arábica e Robusta. Fonte: Adaptado USDA, 2016.

Com base nos dados da Organização Internacional do Café – OIC, nos últimos 10 períodos de colheita, o Brasil tem concentrado em média 33% da produção mundial de café, tanto arábica quanto robusta (Figura 3). Na gestão 2014 – 2015, foram produzidas 141.376 milhares de sacas de 60 kg, quase 8,5 milhões de toneladas, das quais o Brasil produziu cerca de 2,7 milhões de toneladas. No entanto, o país experimentou uma queda de 7% em relação à gestão anterior, como consequência da severa estiagem, aliada as altas temperaturas. Esse acontecimento afetou a produção mundial, diminuindo cerca de 3%, embora a Colômbia e outros países reportaram cifras superiores às gestões anteriores (ICO, 2015).

A produção global de café para 2015/16 prevê um crescimento de 1,4% em relação à gestão anterior, que corresponde a 143.4 milhões de sacas. Sendo que, o déficit experimentado pelo Brasil será compensado com um grande aumento da produção da Indonésia e da Honduras, acompanhado da recuperação do Vietnã (OIC, 2016).

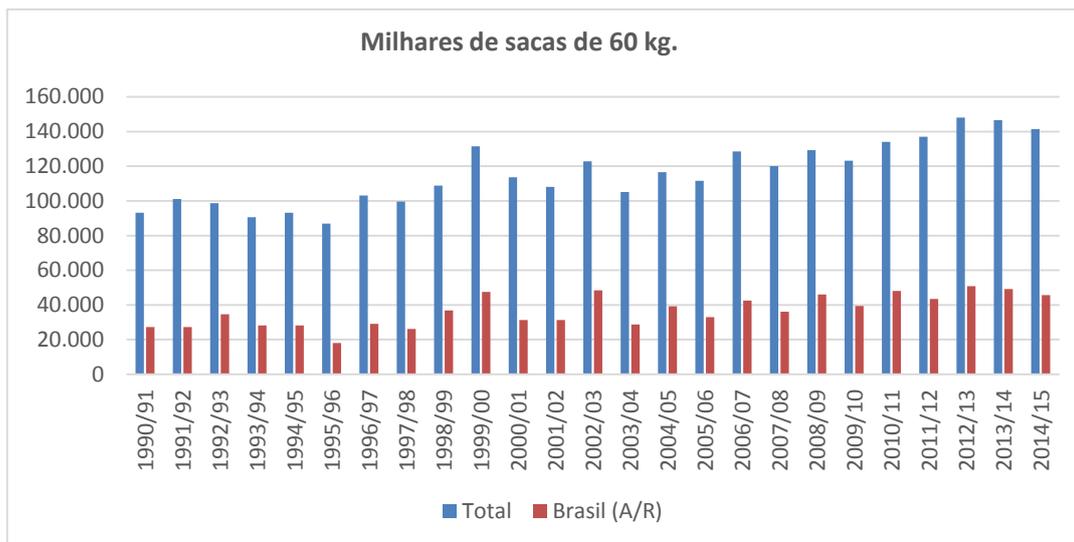


Figura 3 Produção Mundial e Brasileira de Café. Fonte: Adaptado ICO, 2015.

O consumo mundial da bebida quase dobrou nos últimos 40 anos e está prevista para chegar a 9,09 milhões de toneladas em 2019 (Fairtrade Foundation, 2012). A taxa anual de crescimento é de 2,5% em média desde o ano 2011. Nesse sentido, vale a pena destacar os Estados Unidos como principal consumidor e importador, junto com outros mercados tradicionais, como o Japão, o Canadá, a Noruega e a Suíça entre outros. No entanto, observa-se que nos últimos anos o consumo nesses países começou a se estabilizar. Contrariamente, altas taxas de crescimento tem se mostrado nos países exportadores e nos mercados emergentes como Argélia, Austrália, Rússia, Coreia do Sul e outros (Figura 4) (OIC, 2016).

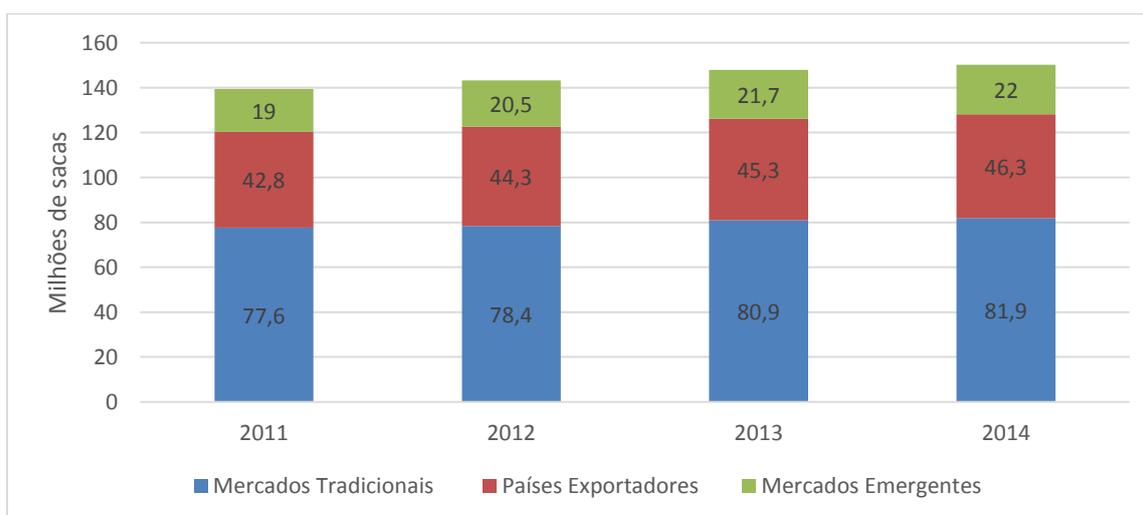


Figura 4 Consumo Mundial de Café. Fonte: Adaptado OIC, 2016.

Para finalizar o contexto global, é difícil falar do preço do café, devido aos diversos fatores econômicos como os custos de produção, preços internacionais e alterações no comportamento do clima que alteram a estrutura mundial do mercado (CEDRSSA, 2014). No entanto, vale a pena mencionar que para muitos países, as exportações de café geram uma proporção significativa do imposto de renda nacional e do produto interno bruto, convertendo-se numa fonte vital para melhorar a saúde, educação, infraestrutura e entre outros (Fairtrade Foundation, 2012).

### 1.1.3 Café no Brasil

Como foi dito anteriormente, o primeiro país em cultivar o cafeeiro na América foi o Suriname e de lá passou para a Guiana Francesa. Em 1727, o Sargento-Mor Francisco Mello Palheta visitou esse país e trouxe o café para o Brasil. As primeiras sementes e mudas foram plantadas no estado do Pará e em seguida no Maranhão. Em 1760, o café chegou no Rio de Janeiro desde o Maranhão, onde começou a propagação pela encosta da Serra do Mar até chegar em 1780 ao Vale do Paraíba (Ormond, 1999).

A cafeicultura no Brasil tem uma transcendência histórica, pois desde a sua chegada, as divisas geradas pelo cultivo aceleraram o desenvolvimento e o crescimento econômico, além de inserir o país no comércio internacional. Por causa do grão, ferrovias foram construídas, grandes contingentes de imigrantes chegaram, a classe média se expandiu e até movimentos culturais se intensificaram (Taunay, 1939).

O café percorreu pelos Estados do Pará, Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Minas Gerais, num espaço relativamente curto de tempo (Alves, 2011). No entanto, o cultivo se estabeleceu principalmente nas regiões sul e sudeste do país, regiões favorecidas pelas condições climáticas e com grande potencial agrícola para se desenvolver (Fontes, 2001). Vale a pena mencionar que a porção Nordeste do estado de São Paulo ganhou importância em virtude de sua fertilidade natural das terras, provocando assim o desmatamento de grandes extensões de florestas mesófilas semidecíduas, matas paludícolas e cerrados para a introdução da cultura do café (Kotchetkoff-Henriques, 2003).

Em toda a sua trajetória, desde o período colonial, a cafeicultura brasileira passou por grandes mudanças, tanto geográficas quanto estruturais. Teve momentos de crise e de pujança, mas sempre mantendo sua importância para o desenvolvimento brasileiro (Rufino, 2010).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor, exportador e responsável por aproximadamente um terço do mercado mundial. Além disso, é o segundo maior consumidor, unicamente atrás dos Estados Unidos; só para ter uma ideia o café está presente em 98,2% dos lares brasileiros, sendo que cada um possui em média 3 a 4 pessoas, das quais 2,8 o consomem (ABIC, 2016).

A cultura do café está instalada em todas as regiões do Brasil. No entanto, destaca-se a região sudeste, onde Minas Gerais é o maior estado produtor, sendo o responsável, em média, pela metade da produção brasileira. O Espírito Santo é o segundo maior produtor e o principal produtor da variedade Robusta que nos últimos anos tem mostrado uma produção crescente. O estado de São Paulo, encontra-se em terceiro lugar, sendo produtor exclusivo do café arábica. Cabe mencionar que São Paulo e Minas Gerais tem um comportamento senoidal devido a bianuidade própria da produção desse tipo de café. Os estados da Bahia, Paraná e Rondônia apresentam uma produção estável ao redor de 2 milhões de sacas anuais. Outros estados, produzem aproximadamente 1% da produção nacional, o que mostra uma produção altamente concentrada (Figura 5) (Conab, 2016).

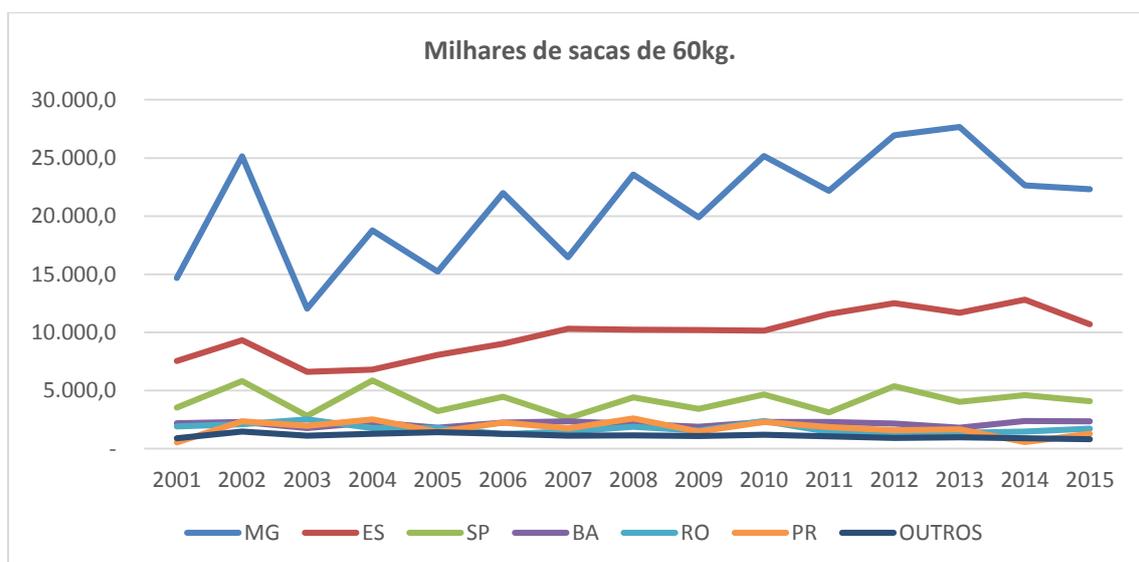


Figura 5 Produção de Café no Brasil pelos Principais Estados Brasileiros. Fonte: Adaptado Conab, 2016.

Nos últimos anos, observou-se uma grande queda na produção dos principais estados brasileiros, devido a fatores climáticos, principalmente, à crise hídrica que atingiu a região sudeste no início do ano 2014, da qual ainda encontra-se recuperando. A produção de café em Minas Gerais caiu nos últimos três anos 19%, visto que 27,7 milhões de sacas foram produzidas em 2013, 22,6 milhões em 2014 e 22,3 em 2015 (Conab, 2015).

Embora nos últimos 11 anos, a área em produção de café tem decrescido em 13%, passando de 2,21 milhões de hectares em 2004, para 1,92 milhões de hectares em 2015, os dados de produção anteriormente apresentados mostram uma tendência crescente. Por tanto, pode se constatar que a produtividade dos cultivos tem aumentado substancialmente nos últimos anos.

Apesar do Brasil ser o segundo maior consumidor mundial de café e que o consumo interno tem evoluído nos últimos 15 anos (Figura 6), unicamente um terço do volume total produzido circula no país, sendo o resto exportado para mercados tradicionais. Entre os principais países importadores de café brasileiro destacam-se a Alemanha, Estados Unidos, Itália, Japão e Bélgica (Rufino, 2010).

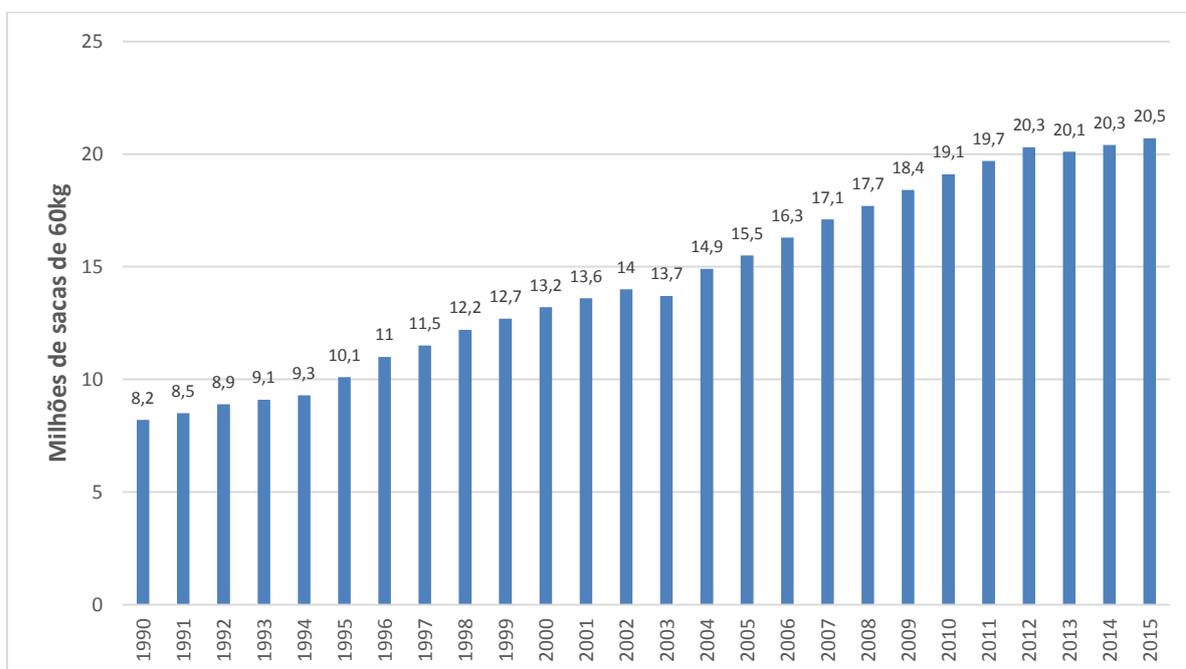


Figura 6 Evolução do Consumo Interno de Café no Brasil. Fonte: ABIC, 2016.

#### 1.1.4 Café no Estado de São Paulo

Atualmente, o café representa 3% do agronegócio paulista (APTA, 2014), gerando em torno de 500 mil empregos e movimentando cerca de 5 bilhões de reais por ano em toda a sua cadeia produtiva (Crivelenti, 2010). As lavouras de café em São Paulo ocupam 201.020,06 hectares, ou seja, mais do 10% da área total cultivada no Brasil (IEA, 2016). Além disso, o Estado produz 9% do total do café em grão a nível nacional (Silva et al., 2015). No entanto, foi constatado que é responsável por 61% do valor de transformação da indústria nacional (CEPEA, 2014). Por outro lado, considerando que o Brasil produz um terço do mercado, pode-se apontar que São Paulo tem um volume de produção que poderia colocá-lo entre os 10 maiores produtores mundiais de café (ICO, 2016).

A cafeicultura do Estado é exclusivamente da espécie arábica, produzindo em 2015 um total de 4,06 milhões de sacas, equivalente a 9,4% da produção do país, convertendo-se no segundo produtor brasileiro dessa variedade e o terceiro maior produtor do país (CONAB, 2016). O dado abaixo do esperado em 2015, deve-se além da bienalidade negativa da cultura às condições climáticas de 2014, que levaram ao menor crescimento dos ramos produtivos e à intensificação das podas. Altas temperaturas e baixo regime pluviométrico ocasionaram estresse hídrico nos períodos críticos da formação da safra de 2015, impactando na produtividade (CONAB, 2015).

O último censo agropecuário realizado no estado foi feito em 2008 pelo Instituto de Economia Agrícola junto à Coordenadoria de Assistência Técnica Integrada – CATI, os dados da cafeicultura paulista apontam que a área plantada de café caiu em 6,41%, de 214.790,00ha para 201.020,06ha em 7 anos. Porém, no mesmo período a produção se mostrou crescente, pela utilização de novas tecnologias, coincidindo com situação geral do país, apresentada anteriormente.

As regiões produtoras estão concentradas principalmente na porção do Nordeste Paulista, isto deve-se as questões edafoclimáticas locais que permitem mais eficiência no cultivo. A tabela 1, mostra os 10 principais municípios produtores do grão, os quais ocupam 41% da área total cultivada e produzem 40% do total estadual.

Segundo o último censo, o Município de Caconde ocupava a maior área plantada de café do Estado 10.032,40 hectares. Atualmente, Caconde é o terceiro município, com um área plantada de 9.280 hectares quase 5% da área total, atrás de Pedregulho e Garça, com 12.500ha e 11.700ha, respectivamente. Por outro lado, Caconde é o quinto maior produtor do Estado, com um total de 185.600 sacas produzidas em 2015, mostrando uma maior produtividade para os municípios de Espírito Santo do Pinhal com 240.00 sacas e Altinópolis com 194.745 sacas, embora eles apresentem menor área em produção (IEA, 2016).

Tabela 1 Maiores Municípios Produtores de Café do Estado de São Paulo.

<b>Município</b>	<b>Área em produção (ha)</b>	<b>Produção (sc.60kg)</b>	<b>Polo Regional</b>
<b>PEDREGULHO</b>	12500	212500	Nordeste Paulista
<b>GARÇA</b>	11700	292500	Centro Oeste
<b>CACONDE</b>	9280	185600	Nordeste Paulista
<b>ALTINÓPOLIS</b>	8287	194745	Nordeste Paulista
<b>ESPÍRITO SANTO DO PINHAL</b>	8000	240000	Leste Paulista
<b>SÃO SEBASTIÃO DA GRAMA</b>	7900	158000	Nordeste Paulista
<b>FRANCA</b>	7110	106650	Nordeste Paulista
<b>CRISTAIS PAULISTA</b>	6850	123300	Nordeste Paulista
<b>RIBEIRÃO CORRENTE</b>	6300	81900	Nordeste Paulista
<b>JERIQUARA</b>	4408	57304	Nordeste Paulista
<b>TOTAL</b>	82335	1652499	

Fonte: Adaptado, Instituto de Economia Agrícola EIA – CATIE, 2016.

## 1.2 Fungos Associados às Plantações de Café

As plantas sustentam um microecossistema complexo, abrigando diversas comunidades de microrganismos, entre eles os fungos (Martins et al., 2013). Segundo James et al. (2016), a biodiversidade de fungos está intimamente ligada à biodiversidade vegetal, pois atuam como organismos decompositores, patógenos e mutualistas (Mueller et al., 2007). Eles podem se encontrar na superfície das plantas (fungos epífitos) ou no interior (fungos endófitos), com o tempo se acumulam produzindo um mosaico heterogêneo de diferentes espécies em cada órgão da planta (Arnold, 2003) e possuem importantes implicações na saúde da planta (Santamaria e Bayman, 2005). Os fungos endófitos penetram os tecidos da planta hospedeira sem causar sintomas de doença, aparentemente (Azevedo, 1998; Stone et al., 2000). No entanto, eles

representam individualmente ou coletivamente, uma variável contínua de associações mudáveis com as plantas, que vão desde o mutualismo até a patogenicidade latente (Schulz, 2005).

### 1.2.1 Fungos Patógenos do Café

Estudos relacionados à biodiversidade de fungos patógenos associados ao café tem sido bastante documentada na literatura (Vega et al., 2009) devido aos danos, principalmente econômicos que eles provocam. Entre os fungos mais devastadores pode-se citar a *Hemileia vastatrix* conhecido como a ferrugem; algumas espécies do gênero *Phoma* que produzem a doença da “Mancha de Phoma” e *Cercospora coffeicola* que causa cercosporiose ou olho pardo, entre outros. Cada um deles será explicado a continuação.

- ***Hemileia vastatrix***

*Hemileia vastatrix* é um fungo basidiomiceto citado por vários autores como a principal doença do café no mundo (Martins et al., 2004; Nunes et al., 2009; Hindorf e Omondi, 2011; Cressey, 2013; Vandermeer et al., 2014; James et al., 2016). Se bem que o fungo não mata diretamente à planta, ele infecta as folhas e reduz a área fotossintética, provocando a queda prematura das folhas, o enfraquecimento das árvores e a morte progressiva nos ramos, conseqüentemente há uma redução na produção (APS, 2011; Nunes et al., 2009) e na qualidade dos grãos (Godoy et al., 1997).

Estudos relatam grandes perdas no rendimento das lavouras de até 60% da produção (Gouveia et al., 2005). No final do Século 19 o fungo devastou plantações de café arábica no Ceilão (atualmente Sri Lanka), áreas que posteriormente foram substituídas por plantações de chá (Hindorf e Omondi, 2011). Na América Latina, na colheita 2013 – 2014, houve uma epidemia da doença que foi desde o México até o Peru, que mereceu especial interesse dado que na região relatórios apontaram que o rendimento ia cair de um 40% a 50% (Cressey, 2013).

No Brasil, o fungo foi encontrado pela primeira vez em 1970, no Sul do Estado de Bahia e atualmente se encontra disseminado em todas as regiões cafeeicultoras, se as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento da

doença as perdas na produção atingem ao redor de 35%, podendo alcançar mais de 50% (Zambolim et al., 2002). Cabe ressaltar que, em todos os informes sobre os prejuízos causados pela enfermidade existe uma correlação negativa entre a intensidade da doença em um determinado ano e o rendimento do café cereja do ano seguinte (Zambolín, 2015).

Os primeiros sintomas aparecem com pequenas lesões cloróticas visíveis na fase inferior do limbo foliar (Avelino, 2015). O tamanho das mesmas varia entre 1 a 3 mm de diâmetro, que em poucos dias podem crescer até alcançar 1 ou 2 cm de diâmetro. Na fase inferior, ocorre o desenvolvimento de massas pulverulentas de cor amarelo – alaranjado formadas por uredósporos do patógeno que, quando coalescem, podem cobrir grande extensão do limbo da folha (Figura 7) (EMBRAPA, 2016).

O ciclo de germinação varia segundo as condições para a produção de esporas, em condições favoráveis o ciclo de germinação até os primeiros sintomas pode ser mais de uma semana e à duas semanas podem ser observados sintomas mais claros. No entanto, quando não existem condições favoráveis o ciclo pode demorar até três meses. A repetição deste ciclo mais rápido causa epidemias mais severas (Avelino, 2015).

O patógeno se desenvolve numa faixa de 20 a 28°C, e pode tolerar longos períodos sem chuva, os esporos são trazidos pelo vento, unicamente atacando as folhas e não precisa de um outro hospedeiro para completar o seu século de vida (Hindorf e Omondi, 2011). De acordo com Zambolim (2015), regiões com temperaturas inferiores a 16°C e superiores a 30° C a doença não provoca prejuízos econômicos à produção. A variável altitude, também tem um papel importante, o café cultivado em altitudes mais baixas é mais predisposto à doença e portanto sofre mais ataques e de maior severidade (Hindorf e Omondi, 2011). Enquanto plantações por cima dos 1200m não requerem controle químico, pois a incidência da doença não atinge um nível maior de 20% no final da colheita (Zambolin, 2015).

O controle da doença é feito por fungicidas de contato, principalmente aqueles com base de cobre e fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis, isoladamente ou em mistura com as estrobilurinas, e o uso de cultivares

resistentes. A aplicação destes produtos pode ser via foliar ou via solo, considerando também a época do ano. Em períodos de chuva, existe mais exigência para a realização relativamente grande de pulverizações. Contudo, pulverizadores inadequados ou mal regulados, condições de chuva intensas, entre outros fatores, conduzem ao produtor a não efetuar as aplicações em número adequado. O Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA registrou 131 produtos comerciais para combater o fungo de maneira preventiva (Zambolim et al., 2002; AGROFIT, 2016).



Figura 7 Sintomas da ferrugem do cafeeiro na superfície abaxial da folha. Fonte: Carvalho et al. (2011).

- ***Phoma* sp.**

O gênero *Phoma* sempre foi considerado um dos maiores gêneros de fungos, com mais de 3.000 taxas infragenéricas descritas (Montel et al., 1991), algumas delas destacando-se como importantes patógenos de plantas, provocando no café a doença Mancha-de-Phoma ou Seca de ponteiros. Foi identificado que o principal agente etiológico da doença é a espécie *Phoma tarda*. No entanto, espécies *P. exígua*, *P. jolyana* e *P. constaricensis* foram registradas em associação com o cafeeiro (Salgado; Pfenning, 2000). Cabe destacar que *Phoma tarda* e *Phoma constaricensis* são as espécies mais citadas na literatura.

A espécie *Phoma constaricensis* descrita por Echandi (1957) foi a primeira espécie do gênero em ser relatada, registrada na Costa Rica em 1953. No entanto a espécie foi expandindo-se rapidamente ao longo de vários países

latino-americanos produtores de café, entre eles Colômbia, as Guianas, Panamá, Nicarágua e Brasil. Neste último, a doença foi identificada primeiramente em 1973 no Estado do Espírito Santo (Salgado; Pfenning, 2000).

Por outro lado, segundo Salgado et al. (2007), *Phoma tarda* é o principal agente etiológico da Mancha de Phoma, no Brasil. Os mesmos autores, também descreveram a ocorrência *Didymella* sp., fase assexuada de *P. tarda* em cafeeiros do sul de Minas Gerais e do sudoeste da Bahia, constituindo-se importante informação para o estudo da variabilidade genética do patógeno. Segundo Lima et al. (2010), o estado nutricional da planta tem um efeito direto na infecção de *P. tarda*, sendo que o desequilíbrio de nitrogênio facilita o ingresso do patógeno.

O fungo *Phoma* sp, no café reduz a área foliar de fotossíntese enquanto coloniza outras partes da planta provocando lesões em ramos, folhas, botões florais, flores e chumbinhos (Salgado et al, 2009). O fungo produz manchas necróticas de um ou vários centímetros de comprimento, a cor que o patógeno apresenta é marrom escuro quase preto nas folhas, ramos e frutos jovens do cafeeiro (Figura 8). Em folhas maduras, as manchas são menos frequentes e quando aparecem são de cor marrom claro e de menor tamanho. O fungo começa o seu desenvolvimento em lesões nas folhas produzidas por insetos, pelo vento ou atritos com folhas vizinhas (Echandi, 1957). Esta espécie pode provocar grandes perdas em lavouras de café arábica. Estudos realizados no sul de Minas Gerais quantificaram perdas de 15% a 43% em regiões com climas favoráveis à doença (Almeida e Matiello, 1989).

A distribuição da doença está fortemente influenciada por fatores ambientais, tais como: altitude principalmente acima de 900m, temperatura ao redor de 20°C, alta umidade relativa do ar e fortes ventos, entre outros (Chalfoun e Carvalho, 2008; Salgado et al., 2009). Some-se a isto, a instabilidade climática incomum nos últimos anos dificulta a gestão da doença (Pozza e Alves, 2008).

O controle é principalmente realizado por fungicidas sintéticos. Segundo o MAPA, as aplicações dos produtos devem ser efetuadas no início da infecção, correspondente ao mês de setembro, podendo estender-se para outubro e novembro. Some-se a isto, ocasionalmente, com a finalidade de evitar a

desfolha, é necessário realizar o controle químico após o mês de março. As plantas devem ser submetidas a tratamento, pelo menos duas vezes, durante o período de formação dos frutos, na fase de chumbinho. Existem 32 produtos com 10 ativos químicos para o controle da Mancha-de-Phoma registrados, sendo o principal o tebuconazol (AGROFIT, 2016).

Como exemplo de alternativas ao uso de fungicidas sintéticos pode-se citar a Barguil et al. (2005), onde foi verificada a redução de 35% da severidade da mancha de Phoma em mudas de cafeeiro que foram pulverizadas com extratos de folha de café ou produtos com base de biomassa cítrica (Ecolife e Agromil).

Além disso, recomenda-se a implementação quebra-ventos em cafezais com incidência de constante vento, localizados a altitudes a cima dos 1000m, condições que favorecem o desenvolvimento da doença. O plantio de árvores forma uma barreira que protege a lavoura de ventos fortes e frios. Some-se a isto, os viveiros devem apresentar boa drenagem e estar protegidos dos ventos frios (EPAMIG, 2016; AGROFIT, 2016).



Figura 8 Sintomas da Mancha-de-Phoma nas folhas (esquerda) e em brotações novas (direita) do cafeeiro. Fonte: Carvalho, 2015.

- ***Cercospora coffeicola***

Cercosporiose ou “mancha-de-olho-pardo” é outra doença importante no cafeeiro. Atualmente encontra-se amplamente disseminada em países tropicais e subtropicais produtores do grão. Causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*, foi descoberta na Jamaica em 1881 (Cooke, 1881), sendo considerada uma das doenças mais antigas descritas na América. Poucos anos depois, em 1887 a

espécie foi relatada pela primeira vez no Brasil (Godoy et al., 1997). No entanto, se tornou um problema para a cafeicultura brasileira em 1971 quando o patógeno foi reportado causando grandes danos nos cafezais do estado de Espírito Santo, experimentando uma perda de produção de 30% (Carvalho; Chalfoun, 1998) (Zambolin et al., 1999).

Nos últimos anos, a preocupação pela cercosporiose tem aumentado consideravelmente no Brasil, devido a intensidade e à severidade que a doença vem apresentando (Martins et al., 2008). Entre os principais motivos pode-se citar o uso de novas cultivares de café, o aumento de plantações em regiões do Cerrado, as condições climáticas e o uso de novas práticas de plantio (Juliatti et al., 2000).

Souza et al. (2011), estudou o processo de infecção de *C. coffeicola* apontando que o fungo coloniza os tecidos das folhas tanto inter quanto intracelularmente e a esporulação ocorre através ou entorno dos estômatos. Os conídios germinados mostraram tropismo positivo aos estômatos onde ocorrem tentativas de penetração.

O fungo ataca folhas e frutos em todas as etapas do seu desenvolvimento tanto na fase de viveiro quanto em plantas adultas (Pozza et al., 2004; Rengifo et al, 2006; Sirinunta, 2015). No primeiro caso, apresenta-se desfolha, atraso no crescimento e raquitismo, tornando as mudas impróprias ao plantio (Fernandez-Borrero et al., 1982). Em lavouras estabelecidas, pode provocar intensa desfolha com redução da produtividade e na qualidade da sua bebida (Buitrago-Jaramillo; Fernández-Borrero, 1982; Godoy et al., 1997).

Nas folhas, o fungo ocorre principalmente na face adaxial. Os sintomas clássicos são manchas cloróticas pequenas mais o menos circulares que cujo diâmetro possui entre 0,5 – 1,5 cm, a coloração pardo-clara tem um centro branco-acinzentado rodeado por um halo amarelo, as margens possuem uma cor marrom escuro ou avermelhado (Figura 9) (Nelson, 2008). No centro das lesões aparecem, geralmente, pequenos pontos pretos que constituem estruturas de frutificação do fungo. As lesões se aglutinam tornando-se escuras produzindo manchas necróticas (Castaño, 1956), que reduzem a área foliar fotossintética. Cabe ressaltar que, as folhas afetadas caem prematuramente

devido à grande produção de etileno no processo de necrose (Lombardi, 2002). Entre outros danos que o fungo provoca pode-se citar a perda de vigor da planta (Nelson, 2008).

Nos frutos, as lesões começam a aparecer quando são pequenos, sendo que o ataque aumenta após a granação e permanecem até o amadurecimento (Lombardi, 2002). Em frutos verdes, as lesões apresentam uma coloração inicialmente café com um centro cinzento e as vezes rodeadas por um halo roxo. Em frutos maduros, pode-se observar áreas enegrecidas com aspecto ressecado que podem estar cobertas com um brilho prateado de esporos fúngicos. As Infeções que penetram a semente podem causar aderência do pergaminho à polpa e provocando a queda dos frutos antes da colheita (Nelson, 2008). Castaño (1956), afirma que o fungo provoca uma maturação acelerada que leva à queda prematura do fruto e à redução da sua qualidade. Por outro lado, cerejas doentes estão sujeitas ao ataque de bactérias e fungos oportunistas como *Colletotrichum gloeosporioides* (Nelson, 2008).

Some-se a isto, as condições climáticas e o estado nutricional da planta tem um papel importante no desenvolvimento da doença (López-Duque e Fernández-Borrero, 1969). Temperaturas relativamente baixas, entre 20 e 28°C associadas a alta umidade depois da inoculação tem um papel fundamental no desenvolvimento da cercosporiose (Nelson, 2008). O vento assume a função de transportar os conídios, também poder ser disseminados pela água (Zambolin et al., 1999). Por outro lado, Agrios (2004), afirma que existe um incremento da doença durante a época de chuva. Outro fator, tal vez de menor importância com relação aqueles já mencionados é o efeito da luz no desenvolvimento da doença, sendo que a incidência é a maior em plantios instalados em pleno sol (Agrios, 1988; Instituto Brasileiro do Café, 1985). Echandi (1957), afirmou que lavouras mantidas na sombra não exibiram sintomas da doença. Acrescenta-se também, as condições do solo, solos arenosos e com baixa fertilidade favorecem o desenvolvimento do fungo (Lombardi, 2002).

Por outro lado, Nelson (2008), enumerou alguns fatores que predispõe a infecção de planta, citados a continuação: deficiências nutricionais (baixos níveis de nitrogênio e potássio), estresse geral da planta (estresse hídrico, má gestão

de fertilizantes, excessiva competição com outras plantas), danos por glifosato e doenças nas raízes, entre outros.

O controle químico é realizado por pulverizações feitas com fungicidas protetores e sistêmicos. Existem 78 produtos registrados pelo MAPA para controlar a doença, os quais podem ser aplicados tanto na fase de viveiro quanto nas lavouras, onde as aplicações deverão ser feitas desde granação, com a finalidade de garantir a proteção dos grãos sensíveis de serem infectados a qualquer etapa do seu desenvolvimento (AGROFIT, 2016).



Figura 9 *Cercosporiose* em folhas do cafeeiro. Fonte: De Sousa (2016).

### 1.2.2 Biocontroladores e fungos benéficos para o Café

As informações sobre fungos não patógenos ou simbiotes que agem como endófitos ainda é escassa (Vega et al., 2010). A maior parte das doenças em plantações comerciais são tratadas com fungicidas sintéticos, no Brasil estão registradas um total de 1.400 pesticidas, unicamente 16, ou seja 1,14%, são orgânicas (Chalfoun, 2010). No entanto, o intenso uso de controladores químicos em lavouras provoca grandes danos ao meio ambiente e à saúde (Carvalho; Chalfoun, 1998). Da mesma forma, o uso intensivo desses produtos tem causado grandes problemas devido à aparição progressiva de variedades microbianas resistentes (Andremont, 2001). Portanto, pesquisas com espécies biocontroladoras de pragas e doenças devem continuar sendo desenvolvidas.

A maior parte das espécies de fungos ocorrem em associação endófitas com as plantas, colonizando os hospedeiros sem causar sintomas de doenças externas (Carrol, 1998). Estudos confirmam que muitos deles protegem às

plantas contra patógenos (Arnold; Lewis, 2005), atuam como organismos biocontroladores (Azevedo et al., 2002), promovem o crescimento das plantas, produzem metabólitos secundários e induzem a resistência a patógenos (Harman et al., 2004).

Alguns gêneros de fungos podem inibir o crescimento de outros fungos por diferentes mecanismos de ação, que podem ser resumidos em: hiperparasitismo, indução à resistência, produção de metabólitos secundários ou competição por recursos. Por tanto, a presença de algum fungo pode se correlacionar negativamente com a presença de outros (Santamaría e Bayman, 2005). Um exemplo é o fungo *Verticillium* sp. que inibe o crescimento de *Hemileia vastatrix* por hiperparasitismo (Canjura-Saravia et al., 2002) e pela produção de substâncias antimicrobianas, antibióticos (Saksirirat et al., 1991).

Os fungos do solo desempenham um papel importante em processos ecológicos e biogeoquímicos em florestas (Buee, 2009). Os fungos do gênero *Trichoderma* são altamente interativos na raiz e solo, bem como no interior da planta (Pomella et al., 2009) e destacam-se pela eficiência em controlar patógenos dos gêneros *Fusarium* e *Rhizotocnia*, demonstrada por Ahmad e Baker (1987).

Finalmente, os fungos também estão relacionados com a qualidade dos alimentos, queijos, vinhos e salames possuem propriedades organolépticas que são conferidas pela ação de fungos específicos (Pereira et al., 2005). Nesse sentido, o gênero *Cladosporium* encontra-se intimamente relacionado à qualidade do café.

A continuação apresenta-se uma descrição de duas espécies, amplamente estudadas, relacionadas de forma positiva com as plantações de café, *Bauveria bassiana* e *Cladosporium cladosporoides*.

- ***Bauveria bassiana***

Um dos fungos entomopatógenos mais estudados é *Bauveria bassiana*, controlador biológico de um grande número de espécies de insetos que atacam cultivos agrícolas (Ferron et al., 1991). Entre eles, a broca do café *Hypothenemus hampei* (Bustillo et al., 1998; Neves, 2005), a praga mais

importante da cafeicultura (Le Pelley, 1968; Bustillo, 2005). De acordo com Tanada e Kaya (1993), o processo de infecção de um fungo a um inseto pode ser resumido em três etapas. Primeiramente a adesão da esporas do fungo à cutícula do inseto e germinação. Posteriormente, a penetração da cutícula do inseto. Por último, o desenvolvimento do fungo no interior do inseto, que geralmente acaba na morte do mesmo.

O fungo *H. hampei*, endêmico da África Central, foi introduzido ao continente Americano no início do século passado e chegou sem seus inimigos nativos que regulam suas populações. No Brasil, a espécie foi introduzida provavelmente em 1913 junto com as sementes importadas da África e de Java (Laurentino; Costa, 2004). Atualmente o coleóptero encontra-se espalhado em todas as regiões produtoras do café de América Central e do Sul (Bustillo et al., 1999).

Entre os principais problemas, podemos mencionar que a broca do café provoca uma menor produção devido à queda dos frutos infestados, a diminuição do peso e perda na qualidade do grão (Benavides et al., 2004). Regularmente, as perdas econômicas variam de 5% a 25%, e se for o caso, uma infestação grave pode causar uma perda de 50% da cultura. O que pode ser traduzido em um custo anual estimado de 500 milhões de dólares devido aos danos e métodos de controle (Pava-Ripoll et al., 2008).

A broca do café tem um ciclo vida interessante, o inseto passa o seu ciclo de vida inteiro nos frutos do café. As fêmeas adultas emergem de cerejas infestadas e perfuram novos grãos, onde se acasalam com os machos ápteros da sua mesma progênie, e dessa forma deixam os frutos férteis (Bergamin, 1943). Os frutos maduros de café infectados que se deixam cair no chão no final dos períodos de colheita e que não são coletados são a principal fonte de reinfecção das plantações do café pelo inseto (Aristizábal et al., 2012).

Como a maior parte do seu ciclo de vida a broca está no interior do fruto, é particularmente difícil de controlar. As fêmeas adultas são vulneráveis a predadores e agentes de controle somente enquanto fora da baga (Pava-Ripoll et al., 2008). O principal agente de controle da praga é o endossulfan, um inseticida com elevado nível de toxicidade que causa problemas de

contaminação ambiental, dos alimentos, do produtor e eliminação de inimigos naturais do patógeno e outras pragas (Neves, 2005). Além disso, os insetos estão desenvolvendo resistência ao químico (Brun et al., 1989). Portanto é preciso utilizar agentes biológicos de controle de pragas e entre eles encontram-se os fungos entomopatógenos.

Entre os inimigos mais importantes da broca se encontra o fungo *B. bassiana*, que ocorre naturalmente controlando as populações da praga. O fungo tem um estágio de desenvolvimento de conídios para a disseminação e início da infecção. Primeiramente o fungo penetra o inseto por contato, se for viável germina sobre o inseto. Posteriormente, por ação química e física atravessa a cutícula e penetra na cavidade geral do corpo. Finalmente com o objetivo de se reproduzir o fungo atravessa o corpo do inseto e produz conídios em grande quantidade que vão ser responsáveis pela disseminação e infecção completando o ciclo (Figura 10) (Neves, 2005).

A eficiência de *B. bassiana* em condições de campo tem sido amplamente pesquisada e os resultados mostram-se bastante variáveis, o nível de controle pode variar entre 20% e 75%, segundo as condições climáticas e do cultivo (Bustillo, 2005). No entanto, os avanços nas investigações em relação a *B. bassiana* são notáveis. As pesquisas realizadas vão desde a inoculação do fungo e a obtenção de isolados até a produção massiva e avaliação da eficiência em diferentes condições ecológicas. Além de métodos artesanais que permitem colocar ao fungo a disponibilidade do agricultor, quem pode produzi-lo na própria fazenda (Bustillo, 2005; Carneiro et al., 2006; Posada et al., 2007). Na Colômbia o fungo faz parte de um programa integral de controle de pragas cuja finalidade é a preservação do meio ambiente e o uso racional de inseticidas químicos.



Figura 10 Infecção de *B. Bassiana* em frutos previamente atacados pela Broca do Café.

- ***Cladosporium sp.***

O primeiro relato do fungo *Cladosporium sp.* em frutos do café foi realizado por Bitancourt em 1957, quem observou o fungo em condições de campo, verificando a ocorrência em frutos secos do cafeeiro (Pereira, 2002).

Atualmente, existe uma ampla variedade de pesquisas apontam que *Cladosporium* é um importante agente biológico para a cafeicultura e está associado a bebidas de boa qualidade, não unicamente relacionando-o com características organolépticas, senão também com o aspecto da segurança do fruto (Carvalho; Chalfoun, 1985; Alves, 1996; Chalfoun et al., 2007; Chalfoun, 2010; Pereira, 2005). Chalfoun et al. (2007), isolou e identificou *Cladosporium cladosporoides* como espécie que possui essas características bioprotetoras.

No café, são encontrados fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, esses três grupos são frequentemente associados com micotoxinas que tornam o grão impróprio para o consumo, além de provocar alterações sensoriais na bebida (Silva et al., 2008). *Cladosporium cladosporoides* produz metabolitos que inibem o crescimento desses três gêneros (Chalfoun, 2010).

Cabe ressaltar que o fungo ocorre externamente em todas as fases do desenvolvimento do fruto funcionando como barreira à entrada de outras espécies prejudiciais (Figura 11) (Martins et al., 2001). Entre outubro e março, a colonização é menos intensa, alcançando, no máximo até o 25% do fruto. A partir de março, *C. cladosporoides* começa a se manifestar internamente, quando a maturação começa, já em abril o fungo é facilmente encontrado em toda a parte externa do fruto. O fungo atua sem afetar o grão depois da secagem e desaparece sem que aconteça qualquer problema relacionado a segurança do produto final (Chalfoun, 2010).

Vale a pena mencionar que o agente de controle biológico pode ser visto tanto no fruto quanto na superfície das folhas da planta, que usualmente apresentam ambientes similares (Chalfoun et al., 2007).

Por outro lado, é importante destacar que as condições climáticas e a microbiota predominantes são considerados, entre outros fatores, responsáveis pela melhor ou pior qualidade do café (Chalfoun, 1996). Regiões de clima quente

e úmido, no período de colheita, a duração da maturação é menor, portanto os frutos passam rapidamente do estágio cereja para passa, o que pode ser prejudicial para o sabor da bebida. A proximidade de represas às lavouras também influencia, dado que os corpos de água aportam maior umidade facilitando o desenvolvimento de microrganismos que ocasionam, geralmente, depreciação da qualidade da bebida (Cortez, 1994).

Além disso, não tem-se registrado a espécie como produtora de micotoxinas daninhas para os seres humanos. Pelo contrário, foi evidenciado que *C. cladosporioides* é capaz de degradar Ochratoxina A (Abrunhosa et al., 2002). A Ochratoxina A é uma perigosa micotoxina nefrotóxica e nefrocancerígena que tem sido detectada em uma ampla variedade de produtos alimentares, entre eles, grãos verdes de café (Pittet et al., 1996). Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir a micotoxina, sendo uma das más estudadas *Aspergillus ochraceus* (Taniwaki et al., 2003). Joosten et al. (2001), isolaram a espécie *A. carbonarius* de frutos de café na Tailândia constatando que o fungo é capaz de produzir quantidades substanciais de Ochratoxina. A presença da espécie foi confirmada em cafeeiros no Brasil (Taniwaki et al., 2003).

Chalfoun et al. (2007), conclui que devido a importância do fungo como agente bioprotetor da qualidade do café e em razão da sua ocorrência coincide juntamente com a aplicação de fungicidas é de muita importância a utilização de fungicidas seletivos, com o objetivo da preservação desse microrganismo.



Figura 11 Colonização de frutos pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* (A) e por fungos prejudiciais à qualidade do café (B). Fonte: Chalfoun, 2010.

### **1.3 Importância da floresta, das Áreas de Preservação Permanente – APPs e distribuição espacial dos fungos**

A área de preservação permanente (APP) é estabelecida no art. 1º § 2º, inciso II da Lei 4.771, de 1965 (Código florestal), sendo definida como:

*“Área protegida, coberta ou não por vegetação nativa, com a função ambiental de preservar os recursos hídricos, a paisagem, a estabilidade geológica, a biodiversidade, o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar das populações humanas”.*

As áreas de proteção permanente – APPs estão completamente ligadas ao fortalecimento de serviços ecossistêmicos, garantem a saúde da propriedade rural e representam uma opção para a manutenção da biodiversidade e das fontes de água doce, trazendo maior equilíbrio ecológico em áreas de cultivo (Scardua, 2008). As APPs limítrofes a cursos de água formam corredores ecológicos ao longo da paisagem. Portanto, essas áreas podem contribuir para a conectividade entre fragmentos de vegetação e para o aumento da biodiversidade da paisagem (Braga, 2011).

De acordo com Banks (2014), o manejo da vegetação natural e habitat florestal no interior de áreas agrícolas é muito importante para o fortalecimento dos serviços ecossistêmicos. Paisagens agrícolas tropicais compostas por um mosaico de cultivos e vegetação natural representam uma oportunidade para avaliar tanto os rendimentos quanto os esquemas de conservação (Banks, 2014).

Ademais, sistemas agroflorestais proporcionam uma plataforma ideal para o estudo de ecologia espacial (Perfecto e Vandermeer, 2008). Clough et al. (2011), coletaram informações considerando riqueza de espécies de nove grupos taxonômicos, incluindo fungos endófitos em plantações agroflorestais de pequenos produtores de cacau na Indonésia, avaliando também se a distância à floresta natural muda a relação biodiversidade-cultivo. Os resultados sugerem que agroflorestas tropicais podem ser desenhadas para beneficiar a diversidade e obter benefícios na produção sem ter a necessidade de converter habitats naturais a terras agrícolas. Além disso, mostraram que existe maior riqueza de espécies perto da floresta natural, portanto deve-se enfatizar a importância da

conservação dos habitats naturais. Somando a isto, os autores encontraram que a distância à floresta tem um efeito positivo marginalmente significativo no rendimento.

O café, como o cacau, é amplamente cultivado nos trópicos, que por sua vez, são regiões que albergam alta biodiversidade. Existem cinco tipos de agrossistemas de café, o tradicional ou rústico caracterizado pelo uso de numerosas espécies de árvores silvestres para fornecer sombra aos arbustos de café (Bandeira et al., 2005); a policultura diversa, a policultura simples, a monocultura com sombra e a monocultura do café. Como pode ser observado, quatro dos cinco sistemas envolvem o sombreamento e vários estudos realizados nas últimas décadas apontam à importância do café sombreado para manutenção e proteção da biodiversidade (Perfecto et al., 2005; Gordon et al., 2007; Toledo e Moguel, 2012). Desde o ponto de vista da paisagem, as lavouras de café sombreadas preservam processos ecológicos regionais e fornecem serviços ecossistêmicos (Perfecto e Vandermeer, 2008). Pelo contrário, monoculturas e sistemas de café altamente intensificados expostos ao sol têm pouco valor para a conservação da biodiversidade (Donald, 2004).

Saucedo-Garcia et al. (2014), estudaram as comunidades de fungos endófitos em folhas de diferentes sistemas agroflorestais no México, considerando sistemas rústicos e policultura de café. Os resultados não mostraram um padrão consistente de similaridade entre os sistemas. No entanto, os autores sugerem que a abundância, riqueza e diversidade de fungos endófitos dependem principalmente da região produtora e em menor medida do tipo de sistema agroflorestal, sendo que sistemas rústicos apresentaram maior diversidade de espécies, ressaltando assim a influência da floresta nativa.

Santamaría e Bayman (2005), estudaram comunidades de fungos endófitos e epífitos em folhas de cafeeiros em seis diferentes regiões de Porto Rico, sendo cinco delas são plantações de café abandonadas e consideradas atualmente florestas secundárias. Os resultados mostraram diferenças significativas entre as comunidades de fungos encontradas, por tanto existem padrões de heterogeneidade espacial entre todos os locais de estudo, isso pode se correlacionar com as diferenças nas condições ambientais entre eles,

coincidindo com o estudo mencionado no parágrafo anterior, ou seja a diversidade de fungos dependeria principalmente da região produtora.

Uma pesquisa mais ampla foi realizado por Vega et al. (2010), que estudaram a diversidade de fungos endófitos de folhas, frutos, ramos e caules do café em cinco países da América, Colômbia, Havaí, México e Porto Rico, sendo uma das análises mais exaustivas de fungos endófitos associado a uma única espécie hospedeira. Os resultados mostraram que o café aloja uma ampla variedade de fungos nos seus tecidos e revelaram também uma diversidade espacial heterogênea significativa entre os países amostrados, atribuindo também às condições microclimáticas locais. No entanto três gêneros estavam presentes em todos os países, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, os autores apontam que é possível que eles estejam onipresentes entre regiões cafeeicultoras por causa de fatores intrínsecos (distribuição global dos próprios fungos) ou por causa da circulação de plantas e sementes de café, e seus endófitos concomitantes, entre as regiões de cultivo de café.

A propósito, pode-se observar que a distribuição biogeográfica de macrorganismos tem sido amplamente estudada, enquanto existem poucas destas informações a respeito dos microrganismos (Fitter, 2005).

Portanto, com o desejo de conhecer mais sobre a distribuição e origem, Ludlow et al. (2016), estudaram leveduras associadas ao café e ao cacau com a intenção de saber se as populações são geneticamente similares, se são populações específicas do cultivo ou se são geneticamente diversas, populações geográficas específicas. Os resultados mostraram que as populações de leveduras associadas ao café e ao cacau são muito diversas e específicas para regiões geográficas. As cepas de café da América do Sul e do Caribe se diferenciam daquelas provenientes da África, formando populações particulares e ao mesmo tempo agrupamentos por países. Por outro lado, com relação ao origem, elas parecem ser o resultado de misturas que geram combinações de alelos da Europa, Ásia e América do Norte. Some-se a isto, atividades humanas, como a migração, podem ter fomentado a criação de grupos híbridos.

## 1.4 Métodos Moleculares para a Identificação de Fungos

Os métodos convencionais para a taxonomia de microrganismos eram tradicionalmente baseados em técnicas de cultivo tais como, isolamento da espécie, caracterização nutricional e enumeração celular (Mcsweeney e Mackie, 2012). Lombardi (2002), afirma que a identificação das espécies baseadas no cultivo era fundamentada na morfologia dos fungos gera bastante controvérsia na taxonomia dos grupos.

Nos últimos anos, essas técnicas vêm sendo substituídas por técnicas de biologia molecular, que possuem um alto grau de precisão e demandam menor tempo de análise. Some-se a isto, permitem estudar, além dos microrganismos capazes de crescer no cultivo, uma grande porção de espécies não cultiváveis que poderiam estar desenvolvendo importantes funções na comunidade. Da mesma forma, permitem caracterizar conjuntos de espécies específicas e estudar a importância das mesmas, sem as limitações impostas pelas condições requeridas para o seu crescimento (Forney et al., 2004). Dessa forma, novas tecnologias podem ser empregadas para examinar a ecologia e a diversidade de fungos e bactérias com a finalidade de determinar “quem está presente” e “o que está fazendo” (Mcsweeney; Mackie, 2012).

Os métodos de sequenciamento molecular para a determinação do DNA das espécies começaram na década de 1970, com Sanger e Maxam-Gilbert. Ambas passariam a revolucionar a biologia no sentido mais amplo, fornecendo ferramentas cuja finalidade é decifrar genes completos e posteriormente genomas completos. Sendo, sem dúvida, o método Sanger por muito tempo o mais utilizado. Atualmente, existem várias tecnologias de sequenciamento, muitas delas vão evoluindo e se aprimorando enquanto outras vão desaparecendo.

Nos últimos anos, foram desenvolvidas tecnologias de nova geração ou “*Next Generation Sequencing*”, as quais são um conjunto de ferramentas que permite sequenciar ácidos nucleicos em grande escala, de forma simultânea, em curtos períodos tempo (Marcos, 2012) e com um preço muito inferior ao sequenciamento do tipo Sanger (Mardis, 2008). A comercialização das mesmas começou no ano 2005 e evoluíram rapidamente.

Entre as novas plataformas de sequenciamento, encontra-se o pirosequenciamento 454, desenvolvida pela Roche, que é amplamente utilizada no mundo inteiro (Carvalho; Silva, 2010). O método utiliza a técnica do pirosequenciamento, que por sua vez baseia-se na detecção de um pirofosfato durante a síntese do DNA e utiliza quatro enzimas durante o processo. Depois da incorporação bem sucedida de um nucleotídeo pela ação da Polimerase usando uma cadeia simples de um fragmento como molde, o pirofosfato liberado PPI é convertido em luz por uma conjunto de enzimas: Sulfuriase converte o PPI em ATP. A Luciferasa utiliza esse ATP para converter luciferina em oxiluciferina e gerar uma luz visível, que é detectada por sensores e pode ser vista como um pico na saída dos dados, sendo que a altura de cada pico é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. Por último, a enzima Apyrase degrada continuamente nucleotídeos e ATP (Figura 12) (Hochstein, 2010).

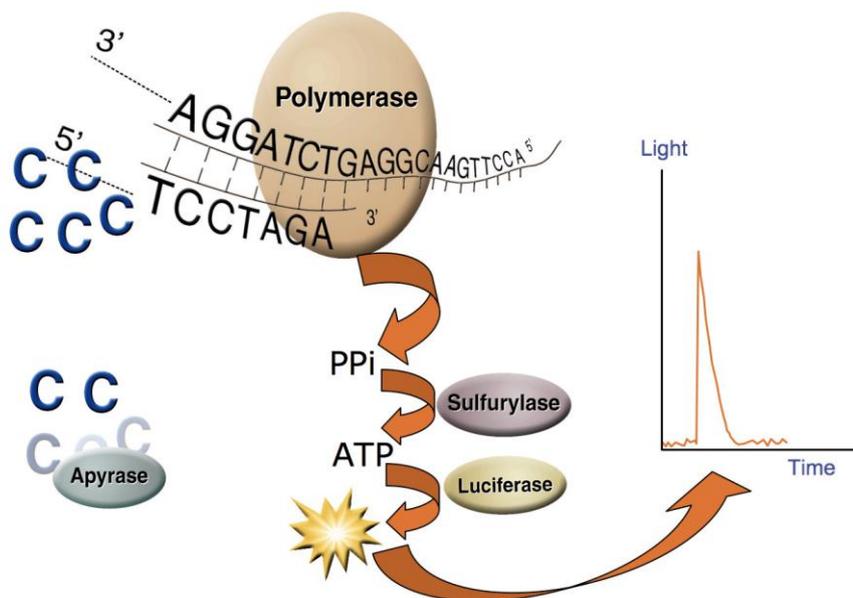


Figura 12 Diagrama do Processo de Pirosequenciamento. Fonte: Hochstein, 2010.

A continuação, serão descritas todas as etapas do Pirosequenciamento 454. Primeiramente, o DNA genômico que deseja-se sequenciar é isolado e fragmentado, esses fragmentos são ligados a adaptadores (Adaptador A e Adaptador B) e separados em cadeias simples (Figura 13A) (Rothberg e Lemon, 2008). Em seguida, procede-se à amplificação do DNA através de um PCR em emulsão ou “*Emulsion PCR*”, onde o agregado de óleo à solução de DNA e a posterior agitação permite a formação de uma emulsão, na qual as gotas de água

constituem micro-reatores “*droplets*” que contém de forma isolada as esferas “*beads*” com o DNA e os reativos necessários para uma amplificação de PCR. No interior dos micro-reatores é produzida uma PCR em emulsão, onde cada um dos fragmentos de DNA é amplificada na superfície da esfera (Figura 13B) (Marcos, 2012). Posteriormente, depois da amplificação a emulsão é destruída e as esferas que contém múltiplas cópias de um mesmo DNA em uma cadeia simples são transferidas a uma lâmina de fibra óptica com milhares de células “*wells*”, de modo que cada uma conterá uma única esfera onde inicia-se o processo de pirosequenciamento (Figura 13C) (Siqueira et al., 2012). Finalmente, cada uma das células são fornecidas com nucleotídeos, os quais agregam-se em forma sequencial e cíclica e o sequenciador 454 começa a analisar um grande número de amostras paralelamente (Figura 13D) (Marcos, 2012).

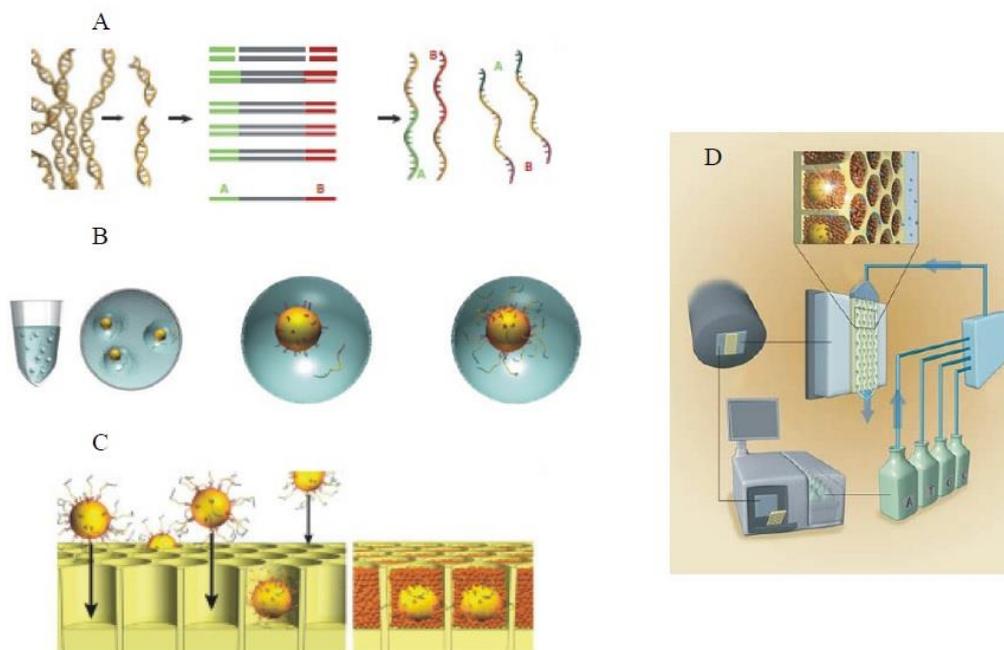


Figura 13 O método de Pirosequenciamento. A: Preparação do ADN. B: PCR em emulsão. C: Placas com células onde inicia o sequenciamento. D: Adição de nucleotídeos em forma sequencial à placa de sequenciamento. Fonte: Marcos, 2012.

A maior limitação da tecnologia 454 refere-se à inserção de homopolímeros, ou seja, quando numa mesma região do DNA incorpora-se a mesma base nitrogenada, assim a quantidade de luz emitida deixa de ser proporcional ao número de nucleotídeos incorporados.

Concluindo, devido à importância econômica do café no contexto brasileiro e a relevância das funções que desempenham os microrganismos nas plantas, no presente estudo, busca-se conhecer a diversidade de fungos presente nas folhas do cafeeiro utilizando técnicas de biologia molecular para uma identificação mais precisa dos gêneros e espécies predominantes, avaliando também as diferenças espaciais na biodiversidade de comunidades fúngicas entre os pontos de coleta e segundo a proximidade da Área de Preservação Permanente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Realizar uma caracterização da biodiversidade, riqueza e abundância, de fungos existentes nas folhas de café mediante técnicas de pirosequenciamento 454 na fazenda São Luis do município de Caconde – SP.

Evidenciar a importância dos serviços ecossistêmicos oferecidos pelas APPs da UHE na sócio econômica regional podendo ser utilizados em programas de educação ambiental no envolvimento dos proprietários rurais que vivem as margens desse reservatório.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificar os gêneros (e espécies, quando possível) presentes nas folhas de café.
- Determinar quais dos gêneros ou espécies identificadas atuam como organismos patógenas e quais como organismos simbiotes.
- Identificar a distribuição espacial de fungo-flora dentro da fazenda.
- Avaliar se existe alguma relação entre a biodiversidade de fungos e a distância da APP.
- Assegurar aos proprietários que APPs em suas propriedades não vão ocasionar aumentos de fungos patogênicos, oferecendo um controle biológico e, potencialmente contribuindo para a conservação desses remanescentes florestais.

## CAPITULO II

### DIVERSIDADE HOMOGÊNEA ESPACIAL DE COMUNIDADES DE FUNGOS DENTRO DE UMA FAZENDA CONVENCIONAL DE CAFÉ (*Coffea arabica*)

#### RESUMO

O café atualmente é o produto agrícola mais valioso no comércio internacional, produzido nos trópicos e consumido no mundo inteiro. A diversidade de fungos associada aos cultivos agrícolas é de grande importância para o desenvolvimento da planta. Portanto, é preciso conhecer quais são as principais espécies nas lavouras. No presente estudo foram caracterizadas comunidades fúngicas que habitam nas folhas do café arábica, em uma fazenda convencional no município de Caconde – SP, utilizando técnicas de biologia molecular, através da extração do ADN das amostras, seguido do pirosequenciamento 454 da região espaçadora interna (ITS). Os resultados mostraram uma grande diversidade de fungos, com total de 320 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), distribuídos em 143 os gêneros, onde as espécies mais abundantes e identificadas em todos os pontos de coleta foram: *Cladosporium exasperatum*, *Dexomyces anomalus*, *Phoma glomerata*, *Cryptococcus aff taibaiensis*, *Acrodontium crateriforme*, *Cryptococcus laurentii*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cryptococcus sp*, *Passalora sp.*, *Hannaella sinensis* e *Fusarium beomiforme*. No entanto, pouco se conhece sobre a ecologia dos fungos e sua relação com a agricultura. Além disso, foi avaliado também se a distância e a conectividade com a Área de Preservação Permanente – APP tiveram influência nas comunidades fúngicas. Os resultados tanto de diversidade alfa, beta e filogenética não mostraram diferenças significativas, apresentando uma diversidade de fungos homogênea no interior da fazenda. Esse resultado pode ser atribuído aos fatores climáticos e as práticas de manejo, principalmente ao uso de controladores químicos.

**Palavras Chave:** *Coffea arabica*, diversidade de fungos, pirosequenciamento 454, paisagens florestais.

## 1. INTRODUÇÃO

O café é considerado o produto agrícola mais valioso, cuja importância econômica, social e no comércio internacional é indiscutível. As plantações do grão encontram-se ao longo dos trópicos em cerca de 5 milhões de propriedades agrícolas em 85 países (Toledo; Moguel, 2012). No entanto, mais de 70% é produzido por apenas cinco deles: Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia e Etiópia (ICO, 2016). De acordo com os dados da Organização Internacional do Café – OIC, a produção global na gestão 2015-2016 foi de 147.994 milhares de sacas de 60kg quase 64% das mesmas correspondentes a café arábica.

Embora a produção brasileira tenha diminuído nos últimos anos devido a fatores climáticos, o país continua sendo maior produtor, exportador e responsável por mais de um terço do mercado mundial, reportando na presente gestão um total de 48.423 milhares de sacas (ICO, 2016). Segundo os dados do Ministério de Agricultura do Brasil, em 2015 o café gerou uma receita de 6,16 milhões de dólares, representando 7% do total das exportações do agronegócio brasileiro e destacando-se como o principal gerador de postos de trabalho na agropecuária nacional com mais de oito milhões de empregos.

Entre os fatores limitantes da produção de café e da agricultura em geral enquadram-se as doenças, provocadas principalmente por fungos e bactérias, e pragas, causadas por insetos. No entanto, grande parte dos microrganismos nas plantas agem de forma endófito, colonizando os tecidos saudáveis cuja associação pode ser obrigatória ou facultativa sem causar aparentes sintomas de doença (Nair; Padmavathy, 2014). Pesquisas confirmam que muitas espécies de fungos protegem às plantas contra patógenos (Arnold; Lewis, 2005), atuam como organismos biocontroladores (Azevedo et al., 2002), promovem o crescimento das plantas, produzem metabólitos secundários e induzem a resistência a patógenos (Harman et al., 2004). Por outro lado, de acordo com Schulz (2005), os fungos representam individualmente ou coletivamente, uma variável contínua de associações mudáveis com as plantas, que vão desde o mutualismo até a patogenicidade latente.

A maior parte dos fungos em ecossistemas tropicais não estão bem caracterizados em relação ao papel ecológico que cumprem no ecossistema

(James et al., 2016) ou na saúde das plantas hospedeiras, e são necessárias pesquisas que melhorem a compreensão dos mesmos para o uso na agricultura (Vega et al., 2009). A grande parte das pesquisas relacionadas ao cafeeiro apontam principalmente a espécies patogênicas da planta, entre as mais destacadas podem ser citadas *Hemileia vastatrix*, *Cercospora coffeicola*, *Phoma* sp., e em menor quantidade ao isolamento de espécies biocontroladoras de pragas ou bioprotetoras, como *Bauveria bassiana*, *Metarhizium* sp., *Lecanicillium* sp. e *Cladosporium cladosporoides*, entre outras.

Novas pesquisas apontam ao estudo de consórcios microbianos coexistentes nos tecidos das plantas e não unicamente a espécies isoladas, pois proporcionam níveis mais elevados de resistência contra doenças ou pragas. Pesquisas desenvolvidas em plantações de bananas demonstram que consórcios de fungos agem positivamente na supressão de nematódeos tendo em efeito favorável na saúde da planta (Backman; Sikora, 2008). Da mesma forma, uma pesquisa de dez anos numa fazenda agroflorestal orgânica que abarcou pelo menos treze componentes, entre insetos e fungos, seis processos ecológicos e o papel da dinâmica espacial, sugeriu um controle autônomo através de uma complexa rede ecológica que favorece a produção de café evitando surtos extremos de doenças e pragas (Vandermeer et al., 2010).

Nesse sentido, pesquisas realizadas nas últimas décadas apontam à importância de sistemas agroflorestais, dos corredores ecológicos e do café sombreado para manutenção, proteção da biodiversidade e provisão de serviços ecossistêmicos (Perfecto et al., 2005; Gordon et al., 2007; Perfecto; Vandermeer, 2008; Toledo; Moguel, 2012; Jha et al., 2014). De acordo com Banks (2014), paisagens agrícolas tropicais compostas por um mosaico de cultivos e vegetação natural representam uma importante oportunidade para avaliar tanto os rendimentos quanto os esquemas de conservação. Segundo Clough et al. (2011), a diversidade de fungos endófitos e outros grupos taxonômicos em plantações agroflorestais, não diminui com o rendimento. Portanto, agroflorestas podem ser desenhadas para beneficiar à diversidade e obter benefícios na produção sem ter a necessidade de converter vegetação natural em terras agrícolas. Além disso, mostraram que existe maior riqueza de espécies perto da

floresta, enfatizando na importância da conservação de florestas primárias e APPs perto de paisagens agrícolas.

Estudos relacionados a fungos em folhas de café mostraram uma grande diversidade do grupo em ecossistemas tropicais (James et al., 2016; Vega et al., 2009; Arnold, 2007) e heterogeneidade nas comunidades entre as diferentes regiões agrícolas, apontando a variáveis geográficas e climáticas como a principal determinante das comunidades fúngicas (James et al., 2016; Saucedo–Garcia et al., 2014; Vega et al., 2010; Santamaria; Bayman, 2005).

Nos últimos anos, os métodos convencionais para a identificação e taxonomia de microrganismos baseadas em técnicas de cultivo vêm sendo substituídas por técnicas de biologia molecular (Mcsweeney; Mackie, 2012), que além de serem mais precisas, permitem estudar espécies não cultiváveis que poderiam ter importantes funções na comunidade. Assim, foram desenvolvidas tecnologias de nova geração “*Next Generation Sequencing*”, cuja comercialização começou no ano 2005 e foram evoluindo rapidamente (Carvalho; Silva, 2010). Elas representam um conjunto de ferramentas que permite sequenciar ácidos nucleicos em grande escala de forma simultânea em curtos períodos tempo e com um preço muito inferior ao sequenciamento do tipo Sanger (Mardis, 2008; Marcos, 2012). Esses métodos estão dirigidos à caracterização e identificação de regiões específicas de ácidos nucleicos, o gene 16S rDNA e 18S rDNA em bactérias e em fungos, respectivamente (Zilli, 2003).

Devido à importância sócio econômica do café, no contexto brasileiro e mundial e à relevância das funções que desempenham os microrganismos nas plantas, a presente pesquisa busca conhecer a diversidade de fungos presente nas folhas de uma fazenda convencional de café arábica, utilizando técnicas de biologia molecular avançadas para a identificação das espécies. Além disso, deseja-se conhecer a influência da APPs (Áreas de Preservação Permanente) circundantes na riqueza e abundância das comunidades fúngicas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Área de estudo**

O presente trabalho concentra-se na fazenda de café arábica São Luis, localizada em uma das principais regiões cafeeiras do Estado, o município de Caconde, situado na porção nordeste do estado de São Paulo, sudeste do Brasil a uma latitude de 21°31'46" sul e a uma longitude de 46°38'38" oeste e a uma altitude média de 860 metros acima do nível do mar. O clima local é temperado úmido com verão quente, tipo Cfa na escala Köppen e Geiger (1931) com uma temperatura média anual de 21.1°C e uma média anual de precipitação de 1479 mm (CLIMATE-DATA.ORG, 2015).

A Fazenda São Luis, tem uma área aproximada de 25 hectares e ocupa uma península dentro de um reservatório hidrelétrico e tem um sistema de produção convencional com colheita mecanizada.

### **2.2 Desenho Amostral**

A amostragem de folhas foi realizado no dia 7 de outubro de 2014. A lavoura está constituída por uma área núcleo plantada cercada por um cinturão de aproximadamente 120 metros de floresta (categorizada como Mata Atlântica estacional semidecidual (<http://mapas.sosma.org.br>)). Dezesete estações de coleta foram divididas em dois gradientes perpendiculares, definidos com base na distância da floresta circundante (Figura 14 e Figura 15). A coleta ocorreu no final da temporada seca, sendo que as árvores de café tinham sido tratadas com controladores químicos de fungos durante maio de 2014.

Em cada ponto de amostragem, foram removidas quatro folhas à altura do peito, visualmente saudáveis, de quatro diferentes árvores (duas de cada lado do ponto) de café (*Coffea arabica*). Apenas aquelas maduras foram selecionadas com a finalidade de maximizar o intervalo de tempo de colonização fúngica. As folhas amostradas foram posteriormente depositadas em tubos Falcon de 50 mL conservadas em etanol absoluto, encaminhadas para o laboratório em caixas de isopor e conservadas à temperatura de -20°C, até serem processadas.

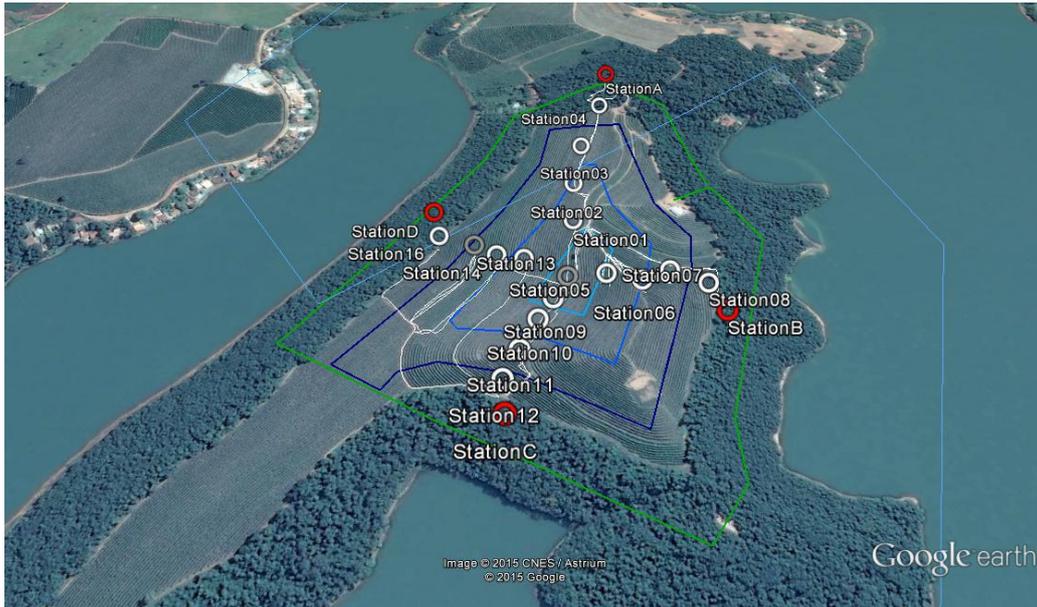


Figura 14 Mosaico Florestal na Área de Estudo: APP, Reservatório e Pontos de Coleta no Interior da Fazenda de café.

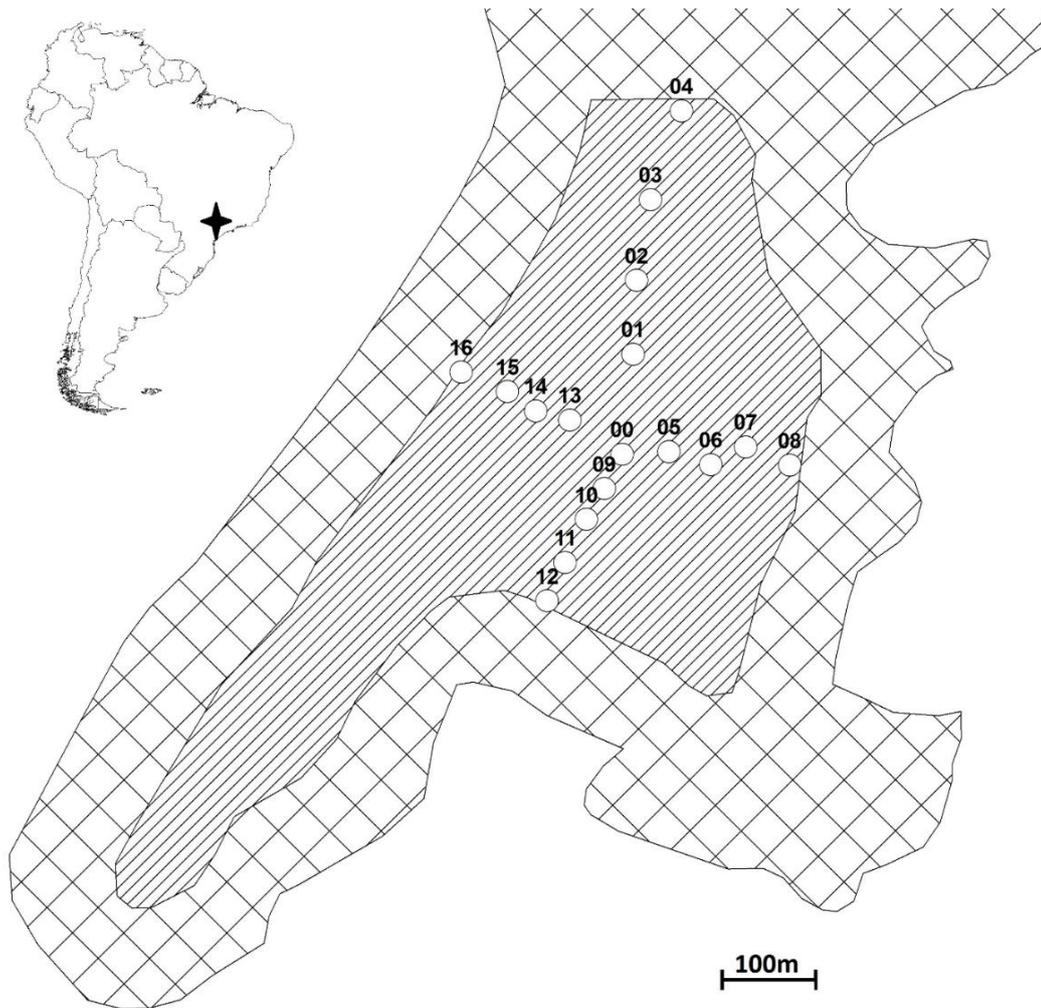


Figura 15 Localização dos pontos de amostragem na fazenda São Luis. A Área quadriculada indica fronteira florestal. A Área listrada indica área plantada com café.

### 2.3 Maceração, Extração e Amplificação de DNA e sequenciamento.

Os tubos Falcon de 50 mL com as folhas amostradas foram encaminhadas para o laboratório e armazenadas a -20°C por um período não maior a uma semana antes da extração do ADN. Inicialmente, adicionou-se aproximadamente 1 mL de esferas de cerâmica de 0,1 mm de diâmetro em cada tubo e foi agitado num Vortex Genie II por 20 min. A velocidade ideal no Vortex para minimizar a ruptura das células foi determinada previamente. A mistura resultante (etanol e microrganismos epífitos) foi filtrada com papel filtro de 1.1 µm. O papel e o conteúdo filtrado foi macerado com o agitador de lises Savant FastPrep na máxima velocidade por 20 segundos. O produto final foi submetido à extração de DNA com o kit Macherey-Nagel NucleoSpin conforme as instruções do fabricante.

Para realizar as Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) foram empregados um conjunto de iniciadores específicos para fungos, como indica Toju et al. (2012). De forma mas sintética: A primeira PCR foi realizada 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 submetido a uma segunda PCR visou-se especificamente o *operon* ITS2 com os iniciadores ITS3\_KYO2 e ITS4 modificados para o sequenciamento 454 FLX.

As seqüências dos iniciadores modificados para a segunda reação, foram as seguintes: 5'-CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GNN NNN NNN NNG ATG AAG AAC GYA GYR AA-3' (ITS3\_KYO2) e 5'-CTA TGC GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTC CTC CGC TTA TTG ATA TGC-3' (ITS4). A fusão 454 de iniciadores A e B são sublinhadas nos iniciadores diretos e inversos. Os nucleotídeos codificados MIDs (Multiple Identifier) são indicados por Ns.

Ambas reações de PCR, a primeira e a segunda, foram realizadas em triplicado e reunidas para minimizar a variabilidade de PCR. Também foi incluído um controle negativo sem modelo adicionado. Para cada uma, uma reação de 25-µl de PCR foi realizada utilizando o sistema de PCR da Promega GoTaq (<https://www.promega.com.br/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-dna-polymerase-m300-protocol/>). As reações incluíram -1µl de modelo de ADN, 0,2mM de iniciadores diretos e inversos, 1x de PCR tampão,

1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 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 PCR foi realizado com os mesmos perfis de temperatura, exceto que a desnaturação inicial foi executado por apenas 2 min.

A eficácia das reações e a ausência de contaminação nos controles negativos foi verificada por eletroforeses do produto PCR num gel de agarose a 1%, coloração com brometo de etídio.

Concentrações *Amplicon* foram medidas utilizando um fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) e concentrações equimolares de cada amostra foram reunidas, purificadas utilizando o kit de purificação PCR QIAquick (Qiagen, Alemanha). Os produtos limpos foram sequenciados (*forward direction*) em 1/8 da placa do equipo 454 Life Sciences Genome Sequencer FXL (Roche), utilizando as instalações da Macrogen (Coreia do Sul).

## 2.4 Análise de Dados

**Filtrado de Qualidade:** Primeiramente, foram removidas sequencias mais curtas do que 250 pb (incluindo o MID e o iniciador) para as análises posteriores. Em seguida, foram “*de-multiplexed*” todos os MIDs perfeitos e os iniciadores reversos correspondentes do conjunto de dados. Posteriormente, todas as sequencias foram alinhadas usando o servidor Mafft (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). No alinhamento resultante, as colunas que contém os iniciadores e os iniciadores reversos foram removidas e a sequencias resultantes foram encaminhadas para o *OUT clustering*.

***OUT clustering e atribuição:*** O programa USEARCH v 1861/08/01 foi usado para identificar as quimeras e a qualidade dos clusters das leituras filtradas segundo o que autor sugere ([http://drive5.com/usearch/manual/upp\\_454.html](http://drive5.com/usearch/manual/upp_454.html)). Um corte de 97% da similaridade do OUT foi adotado para agrupar as leituras iniciais e os OTUs resultantes foram atribuídos para os fungos Hits usando o banco de dados

UNITED FASTA do 01/08/2015. As sequencias OUT serão contribuídas para o GenBank.

**Análise estatístico:** estimativas de conectividade entre os pontos de coleta e a floresta circundante foram derivados do CIRCUITSCAPE (Shah; McRae, 2008).

O conjunto de comandos no MOTHUR v.1.36.1 (Schloss et al., 2009) foi utilizado para obter estimativas tanto dos membros (*community membership*) quanto da estrutura da comunidade (*community structure*). Finalmente, foram utilizados três índices comparando cada uma das 15 coleções: Bray – Curtis e Distâncias Euclidianas para comparações com base em filogenia e para avaliações baseadas na distribuição de OTUs foi utilizado o programa UNIFRAC (Lozupone; Knight, 2005) 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. Esta matriz foi então utilizada para criar árvore filogenética *neighbor-joining* para as estimativas da biodiversidade filogenética inter-local.

*Community membership* foi calculada usando comandos que geram os índices Jaccard (comando *jclass*) e Euclidean (*memeuclidean*), que resulta em o Índice Jaccard e Distâncias Euclidianas entre duas comunidades, respectivamente. Por outro lado, *Community structure* foi calculada usando comandos para gerar o Índice Bray Curtis e distâncias Euclidianas (*strueteuclidean*) entre as comunidades. A análise de autocorrelação entre a distância da diversidade beta e as distâncias geográficas entre pontos de colheita foi calculada usando *Mantel test*, também dentro do conjunto de programas de MOTHUR.

*Non-metric multidimensional scaling function* (NMDS) foi usado para explorar as interações significativas entre as várias matrizes de distância de diversidade beta e OTUs individuais, bem como os valores de atrito derivados de circuitscape para cada ponto de coleta.

Estimativas de diversidade alfa foram calculadas utilizando medidas de diversidade filogenética, Chao, Shannon e Simpson.

Em todas as estimativas MOTHUR de alfa e beta diversidade, reamostragem foi utilizada para minimizar o impacto dos tamanhos de amostras. A média deste reamostragem foi usada nos cálculos posteriores. Em todas as classes onde a estatística foi derivada de comparações múltiplas, a correção Bonferroni foi aplicada para a significância dos valores.

A Análise de similaridades (ANOSIM) foi realizado, também no MOTHUR, com a finalidade de testar estatisticamente se existe diferença significativa entre os grupos das unidades de amostragem.

### 3. RESULTADOS

Foram obtidos do um total de 320 OTUs (ANEXO B), distribuídos em 143 gêneros, como resultado do pirosequenciamento das folhas de café amostradas em 15 pontos de coleta na fazenda São Luis, dois pontos (Coffee07 e Coffee10) foram perdidos durante o processo de isolamento de DNA. Os 320 OTUs mostraram uma distribuição de abundância tipicamente dominada por uma pequena quantidade de táxons dominantes encontrados e um grande número de gêneros encontrados em baixa abundância.

As espécies mais abundantes, acima do 1% do total dos dados, e frequentes em todos os locais amostrados são: OTU 1 *Cladosporium exasperatum*, OTU 2 *Dexomyces anomalus*, OTU 3 *Phoma glomerata*, OTU 4 *Cryptococcus aff taibaiensis*, OTU 5 *Acrodontium crateriforme*, OTU 6 *Cryptococcus laurentii*, OTU 12 *Cladosporium sphaerospermum*, OTU 10 *Cryptococcus sp*, OTU 7 *Passalora sp.*, OTU 8 *Hannaella sinensis* e OTU 9 *Fusarium beomiforme* (Figuras 16 e 17). As três espécies mais abundantes em praticamente todos os pontos de coleta, de acordo com as sequências obtidas e a comparação com banco de dados UNITED FASTA e GenBank - NCB, foram *Cladosporium exasperatum*, *Dexomyces anomalus* e *Phoma glomerata*, correspondentes ao 42%, 17% e 15% respectivamente.

Na Figura 18 mostra-se o número de espécies encontradas em cada ponto de coleta. Sendo o ponto *Coffee08* o local com menor quantidade espécies

sequenciadas e o ponto *Coffee02* o com a maior quantidade de espécies. Foram realizadas também curvas de rarefação (Figura 19) com a finalidade de mostrar a riqueza em cada amostra, com um 95% de confiabilidade dos dados. Por causa da amostra *Coffee08* (Figura 18), que apresentou o menor número de sequencias (952 sequencias), foi gerada uma subamostra de 952 a partir de cada ponto de coleta, com a finalidade de normalizar os dados para análises adicionais.

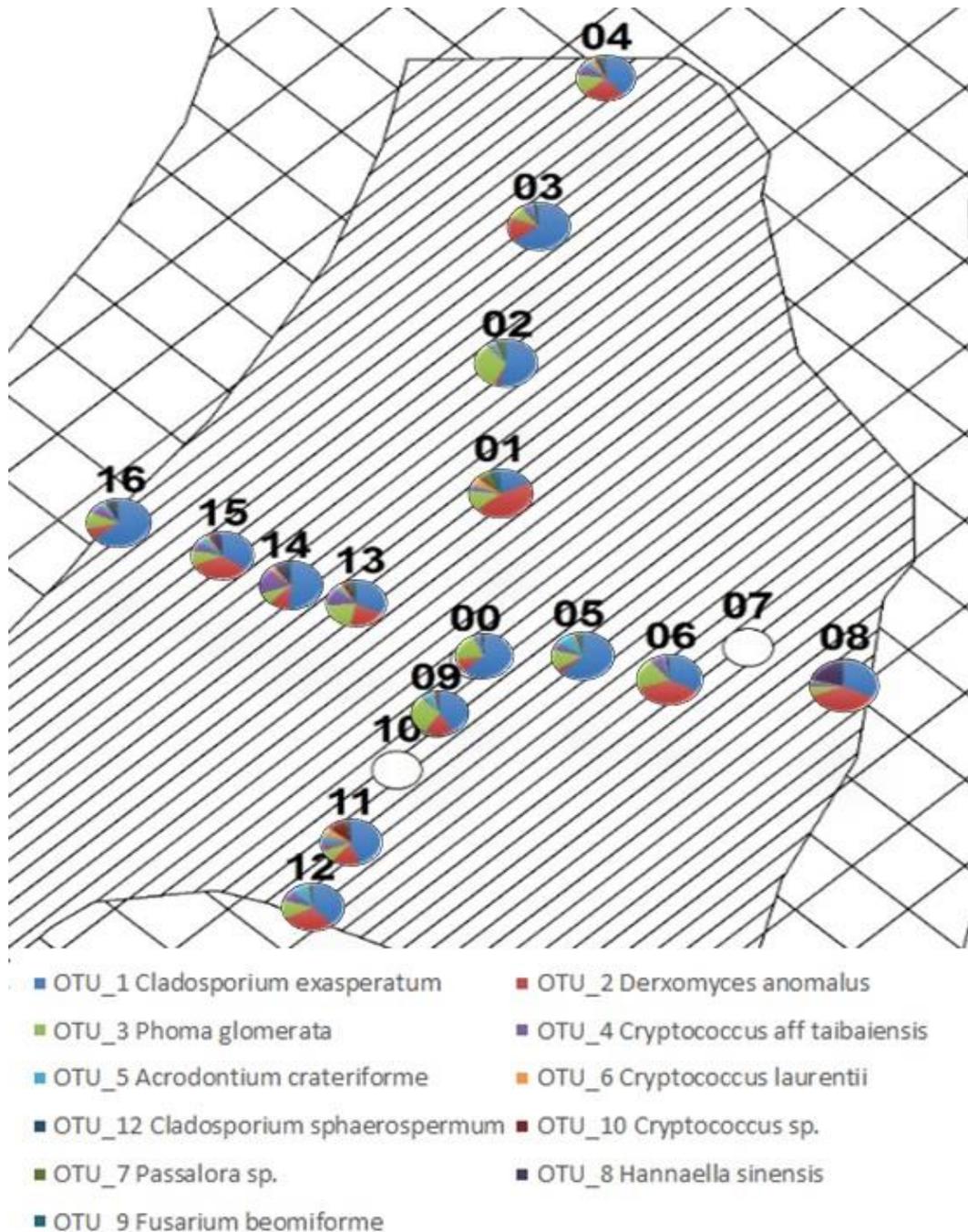


Figura 16 Visão espacial da riqueza de espécies dos principais OTUs na Fazenda São Luis.

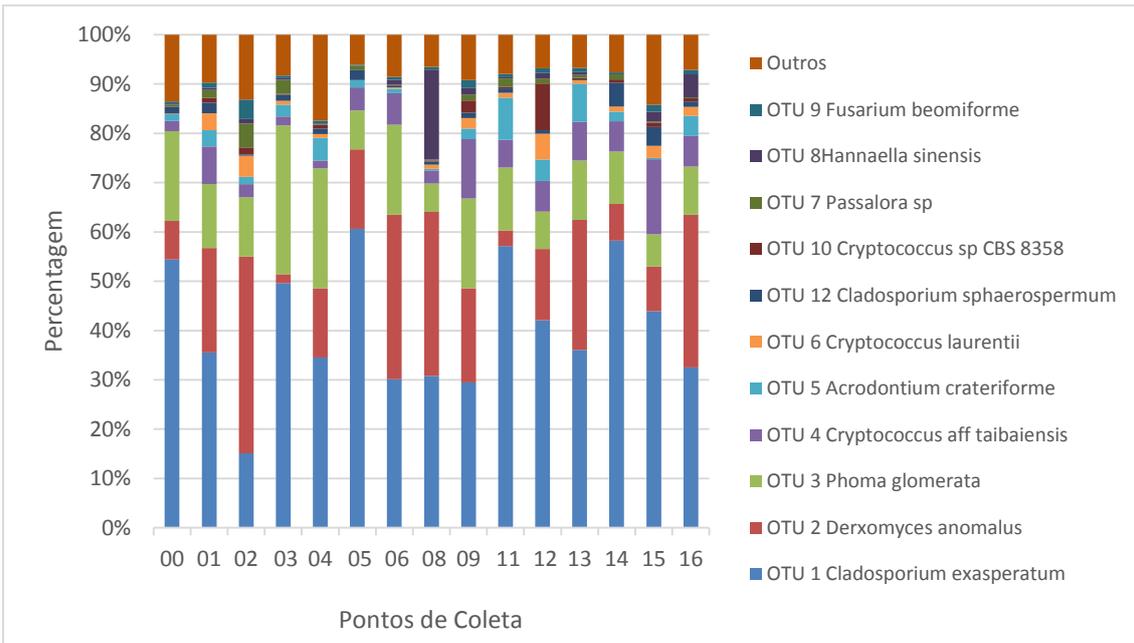


Figura 17 Percentagem de ocorrência dos principais OTUs encontrados nos pontos de coleta.

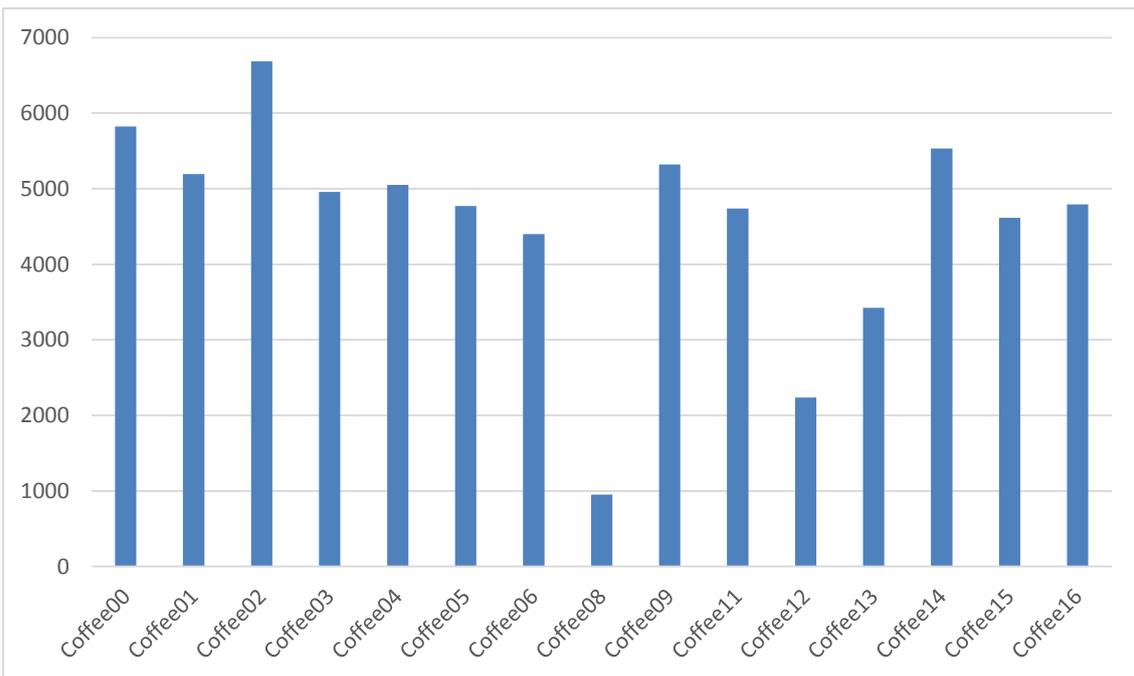


Figura 18 Número de sequências encontradas por local de coleta.

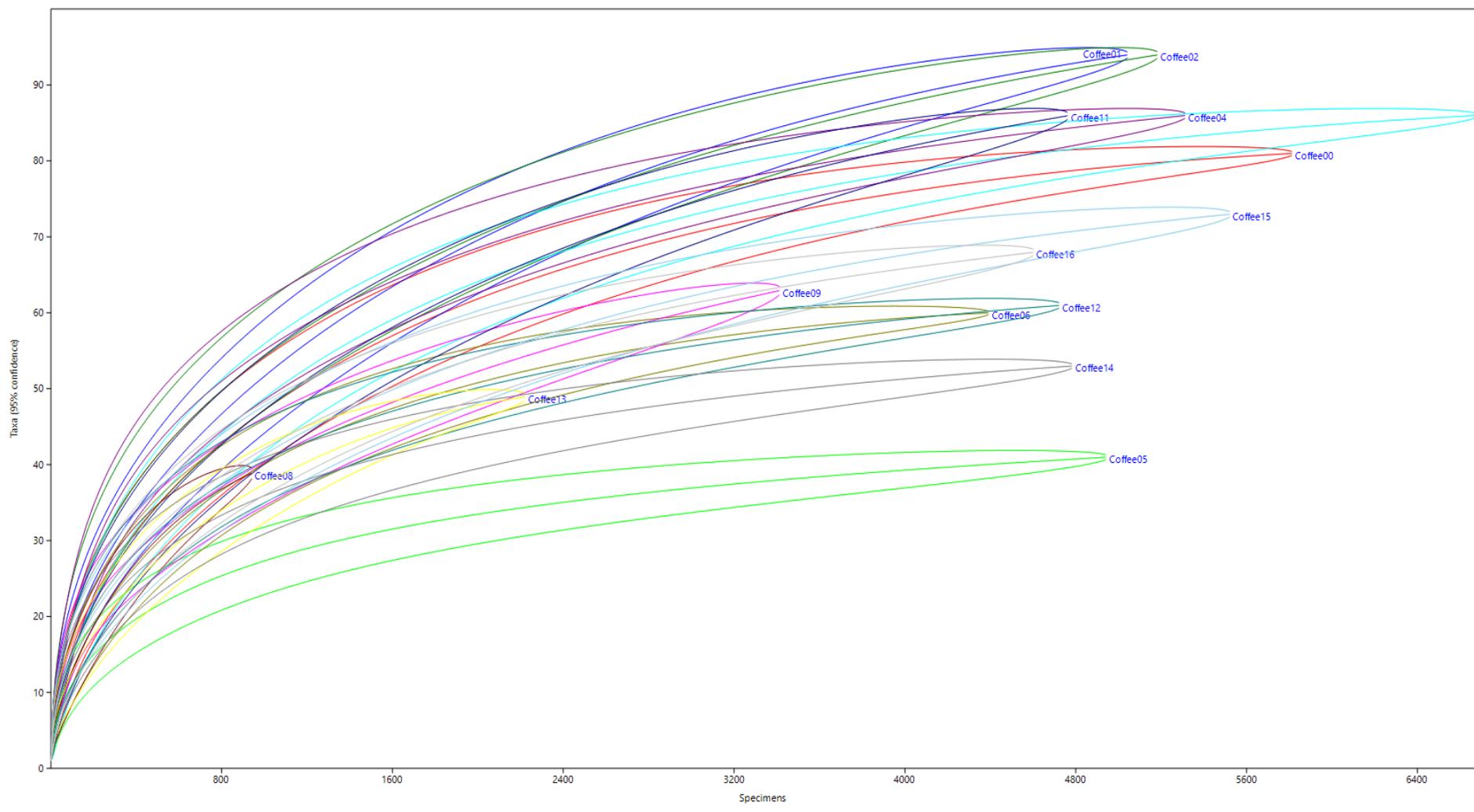


Figura 19 Curvas de rarefação

- **Diversidade Beta**

De acordo com Whittaker (1972), a diversidade beta pode ser medida a partir de presença/ausência de espécies ou a partir dos dados quantitativos de abundância. Nesse sentido, a presente pesquisa realizou a medição dos membros da comunidade “*Community Membership*”, utilizando os índices jclass, memecleudean e UNIFRAC unweighted, que consideram presença/ausência; e os testes Bray-Curtis, structeuclidean e UNIFRAC weighted para o cálculo da estrutura da comunidade “*Community structure*”, considerando também a abundância dos microrganismos.

Foi realizado o teste Mantel com a finalidade de determinar a relação entre a matriz de diversidade de fungos e a matriz de distâncias geográficas. O teste Mantel é um dos poucos testes apropriados quando a hipótese em estudo só pode ser formulada em termos de distâncias. Em particular, ele tem sido amplamente utilizado para testar a relação espacial entre os dados genéticos e a disposição espacial dos locais de amostragem (Legendre; Fortin, 2010). Os resultados mostram que no cálculo dos membros da comunidade *community membership* os três testes revelaram um valor de  $p \leq 0,05$  rejeitando  $H_0$ , assim a matriz de distância geográfica não está aleatoriamente distribuída em relação a matriz de biodiversidade, existe uma correlação entre a proximidade dos pontos de coleta e a presença/ausência de fungos nos locais amostrados. Contrariamente os testes relacionados à estrutura da comunidade *community structure* mostraram valores de  $p > 0,05$  aceitando  $H_0$  (Tabela 2).

Cabe ressaltar que, de acordo com Calderoli (2016), os valores de distância Bray Curtis perto de zero indicam que os sítios comparados tem uma composição similar de espécies, enquanto se o valor é próximo de 1 sugere que a composição varia entre os sítios, o resultado calculado na presente pesquisa mostra um valor Bray Curtis de 0,16 (perto de 0) comprovando que existe uma composição similar de espécies entre os pontos de coleta.

Tabela 2 'Mantel test': Significância das permutações de autocorrelação entre matrizes de distância geográfica e de diversidade de fungos.

<b>Community Membership</b>		
	<b>Mantel</b>	<b>Valor de p</b>
<b>jclass:</b>	0.195806	0.014650
<b>memeuclidean:</b>	0.442879	0.000000
<b>Unweighted UNIFRAC:</b>	0.150448	0.048660
<b>Community structure</b>		
	<b>Mantel</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Bray-Curtis:</b>	0.162785	0.181330
<b>structeuclidean:</b>	0.079841	0.395170
<b>weighted UNIFRAC:</b>	0.150474	0.198640

Foi realizado também a análise NMDS em três dimensões (3 eixos), para entender as dissimilaridades ou similaridades entre os pontos de coleta de uma forma mais simplificada, considerando também os índices já mencionados. Os resultados mostram-se na Tabela 3, evidenciando-se que unicamente no índice Memeuclidean no eixo 2 foi significativo, pois o valor de  $p = 0,012$  ( $p < 0,05$ ), comprovando que um tanto da variância da análise NMDS, utilizando matrizes de distancias euclidianas, pode ser correlacionada com a conectividade da floresta. Todas as outras análises mostraram valores  $p > 0,05$ ; aceitando a hipótese nula, ou seja, não se mostraram interações significativas entre as matrizes de distância de diversidade beta e conectividade com a APP.

Tabela 3 'NMDS1': NMDS para matrizes de diversidade beta versus conectividade com a floresta.

	<b>eixo1</b>	<b>p-value</b>	<b>eixo2</b>	<b>p-value</b>	<b>eixo3</b>	<b>p-value</b>
<b>Community membership</b>						
<b>Jclass</b>	0.378	0.136	-0.253	0.331	-0.456	0.065
<b>Memeuclidean</b>	0.157	0.554	0.583	<b>0.012</b>	0.300	0.246
<b>unweighted UNIFRAC</b>	-0.323	0.209	0.204	0.438	0.474	0.053
<b>Community structure</b>						
<b>Bray-Curtis</b>	0.101	0.704	0.287	0.267	0.030	0.908
<b>Structeuclidean</b>	0.273	0.293	0.288	0.265	-0.152	0.565
<b>weighted UNIFRAC</b>	0.152	0.567	0.222	0.398	-0.369	0.147

Por outro lado, foi feita também uma outra matriz NMDS (NMDS2), relacionando também as matrizes de diversidade beta e a significância com os OTUs individuais. 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 4, onde pode se afirmar que tanto para *community membership* quanto para *community structure*, quatro OTUs estão correlacionadas com as matrizes de diversidade beta, OTU\_1 *Cladosporium exasperatum*, OTU\_2 *Derxomyces anomalus*, OTU\_3 *Phoma glomerata* e OTU 6 *Cryptococcus laurentii*. Portanto, são significativamente responsáveis para explicar a variância dos dados nos 15 locais de coleta.

Finalmente, para cada teste foram construídos árvores baseados na diversidade beta com o objetivo de ter uma visão espacial dos resultado (Figura 20).

Tabela 4 'NMDS2': NMDS para as matrizes de diversidade versus a significância com os OTUs (segundo a correção Bonferroni).

	OTU	axis1	p-value	axis2	p-value	axis3	p-value
<b>Community membership</b>							
<b>Jclass</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Memeuclidean</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>weighted UNIFRAC</b>	OTU_1	-0.517	<b><u>0.032</u></b>	-0.917	<b><u>&lt;0.001</u></b>	0.501	<b><u>0.039</u></b>
	OTU_2	0.129	0.624	0.926	<b><u>&lt;0.001</u></b>	-0.709	<b><u>&lt;0.001</u></b>
	OTU_3	0.011	0.966	0.008	0.973	0.825	<b><u>&lt;0.001</u></b>
	OTU_6	0.843	<b><u>&lt;0.001</u></b>	0.213	0.416	-0.385	0.128
<b>Community structure</b>							
<b>Bray-Curtis</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Structeuclidean</b>	OTU_1	0.296	0.253	-0.898	<b><u>&lt;0.001</u></b>	-0.489	<b><u>0.045</u></b>
	OTU_2	-0.105	0.690	0.976	<b><u>&lt;0.001</u></b>	0.091	0.731
	OTU_3	-0.844	<b><u>&lt;0.001</u></b>	-0.317	0.219	0.122	0.643
	OTU_6	0.245	0.347	0.311	0.228	0.809	<b><u>&lt;0.001</u></b>
<b>unweighted UNIFRAC</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

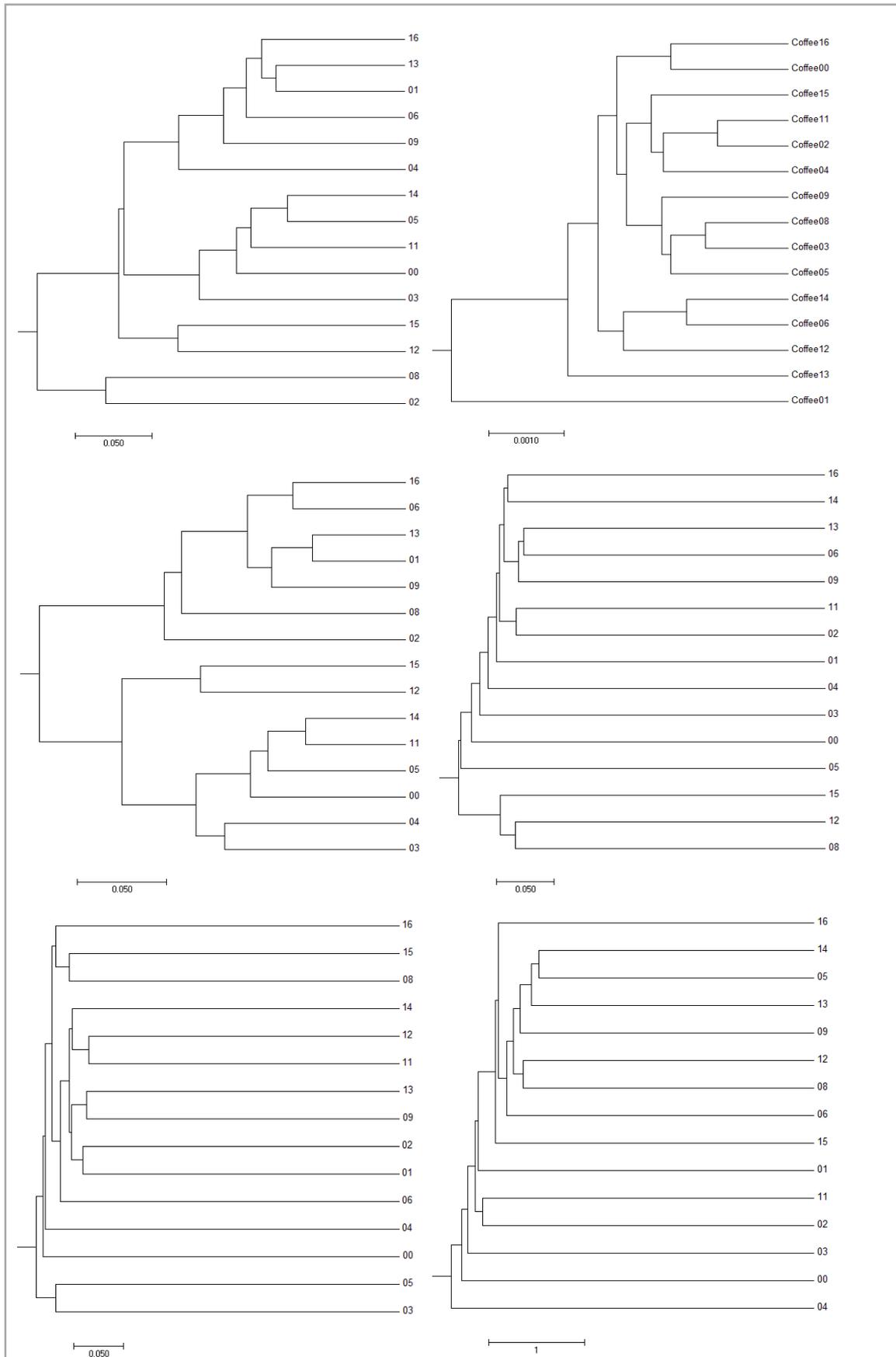


Figura 20 Árvores baseadas em comparações de diversidade beta: Bray-Curtis, Structeuclidean tree, Unweighted UNIFRAC, Unweighted UNIFRAC, Jclass, Memeuclidean.

- **Diversidade alfa**

Foram calculadas estimativas de diversidade alfa aplicando medidas de diversidade filogenética e os índices Chao, Shannon e Simpson, todos eles utilizando o método de subamostragem de 952 sequencias de cada amostra, devido a que o número representa a menor quantidade de leituras obtidas nos locais de coleta (Figuras 18 e 19).

- Diversidade filogenética

Existem dois tipos de diversidade filogenética *unscaled* onde unicamente pesa a relação ordinal e *scaled* onde pesa também a diferença genética (baseada em sequências de OTUs). Os resultados mostram-se na Tabela 5. Em termos de diversidade filogenica *scaled*, baseada nas sequencias de OTUs, os locais com maior diversidade de fungos foram: Coffee01, Coffee11, Coffee02 e Coffee03 e o local com menor diversidade foi Coffee05.

Tabela 5 Diversidade alfa, baseada em filogenia *scaled* e *unscaled*.

<b>Groups</b>	<b>numSampled</b>	<b>phyloDiversity Scaled</b>	<b>phyloDiversity Unscaled</b>
<b>Coffee00</b>	952	0.0035	35.522
<b>Coffee01</b>	952	0.0045	11.999
<b>Coffee02</b>	952	0.0042	11.350
<b>Coffee03</b>	952	0.0040	30.335
<b>Coffee04</b>	952	0.0035	16.704
<b>Coffee05</b>	952	0.0027	18.043
<b>Coffee06</b>	952	0.0031	0.7131
<b>Coffee08</b>	952	0.0037	35.340
<b>Coffee09</b>	952	0.0029	23.007
<b>Coffee11</b>	952	0.0044	33.740
<b>Coffee12</b>	952	0.0028	26.347
<b>Coffee13</b>	952	0.0029	21.887
<b>Coffee14</b>	952	0.0022	22.752
<b>Coffee15</b>	952	0.0016	34.654
<b>Coffee16</b>	952	0.0036	0.7791

Foram calculados também outras estimativas de diversidade alfa, índices Chao, Shannon e Simpson, trabalhou-se com as medias dos dados, e como foi mencionado anteriormente realizando uma subamostragem para poder fazer análises comparativas dos dados. Os resultados mostram-se na Tabela 6 e na Figura 21.

Os valores do índice Chao mostraram que os pontos de coleta com maior riqueza são o Coffee01 e o Coffee02, com valores de 87,235 e 82,109 respectivamente, e o ponto com menor riqueza é o Coffee05. Por outro lado, o índice Shannon que considera igual peso entre espécies raras e abundantes mostrou que Coffee02 e o Coffee04 são os que reportaram maior diversidade e o ponto que apresentou menor diversidade foi também o Coffee05. Finalmente, segundo os valores do índice Simpson, os pontos com mais diversos são o Coffee09 e o Coffee01, pois neste caso quanto menor é o valor encontrado, maior é a diversidade da comunidade. Embora o ponto Coffee08 seja, por ampla diferença, o local com menor quantidade de sequencias obtidas, nenhum dos índices utilizados evidenciaram que é o local com menos diversidade de espécies.

Foi realizada também uma correlação a matriz de conectividade dos pontos amostrados e a diversidade alfa, os resultados mostraram que nenhum dos índices evidenciou uma correlação entre a conectividade com a APP e a diversidade alfa (Figura 20)

Tabela 6 Diversidade alfa baseada nos Índices Chao, Shannon e Simpson

<b>Ponto de Coleta</b>	<b>Species observed</b>	<b>Chao Index</b>	<b>Shannon</b>	<b>Simpson</b>
<b>Coffee00</b>	46,205	72,257	1,776	0,337
<b>Coffee01</b>	50,521	87,235	2,196	0,197
<b>Coffee02</b>	53,239	82,109	2,297	0,204
<b>Coffee03</b>	47,742	74,290	1,672	0,339
<b>Coffee04</b>	54,184	75,921	2,241	0,202
<b>Coffee05</b>	26,898	36,175	1,457	0,403
<b>Coffee06</b>	39,309	55,867	1,832	0,240
<b>Coffee08</b>	39,000	45,000	1,821	0,243
<b>Coffee09</b>	39,627	62,160	2,201	0,174
<b>Coffee11</b>	46,202	78,059	1,744	0,354
<b>Coffee12</b>	39,818	54,159	2,092	0,222
<b>Coffee13</b>	36,676	55,007	1,896	0,227
<b>Coffee14</b>	35,341	47,020	1,698	0,363
<b>Coffee15</b>	40,483	63,451	2,028	0,238
<b>Coffee16</b>	41,299	62,041	2,019	0,220

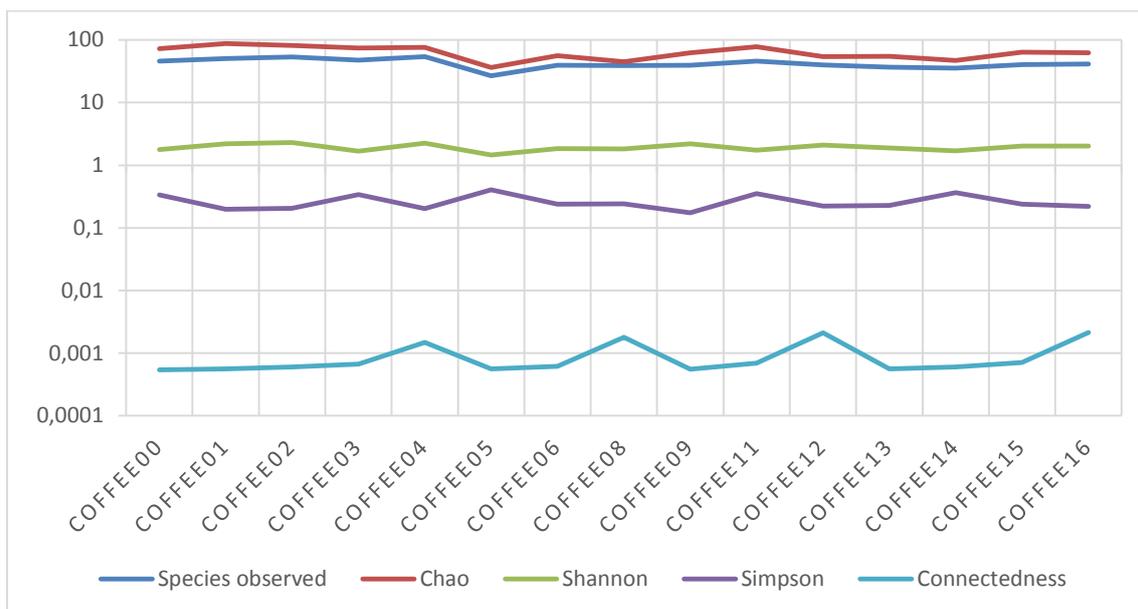


Figura 21 Diversidade Alfa

- **ANOSIM**

Por último, foi realizada a Análise de semelhanças (ANOSIM) que fornece uma maneira de testar se existe uma diferença significativa entre os OTUs nos diferentes pontos de coleta, com a finalidade de comprovar estatisticamente que existe uma diversidade homogênea na área de estudo. Os resultados mostraram que, em média, não existe diferença significativa na área total, dado que o valor  $p=0,19$  maior a  $0,05$ . Comprovando-se assim que existe homogeneidade na diversidade de fungos no interior da fazenda. Por outro lado, os resultados mostram que entre dois pontos sempre existe diferença significativa.

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram uma grande diversidade de fungos associados a folhas do cafeeiro, concordando com outras pesquisas que elucidaram a diversidade do grupo em ecossistemas tropicais (James et al., 2016; Vega et al., 2010; Arnold, 2007). Os 320 OTUs identificados apresentaram uma distribuição de abundância típica, já descrita em outras pesquisas, com 11 táxones dominantes e presentes em todos os pontos de coleta e um grande número de espécies com baixa abundância. De acordo com Vega et al. (2010),

a grande diversidade de fungos no café pode indicar que a maioria destes são "turistas acidentais" sem nenhuma função na planta, ao contrário daqueles que poderiam ser definidos como "passageiros influentes" e cujo papel na planta foi elucidado.

Pesquisas realizadas em folhas de café apontaram a fatores geográficos, climáticos como a principal determinante para o estabelecimento das comunidades fúngicas (James et al., 2016; Vega et al., 2010; Santamaria; Bayman, 2005; Saucedo–Garcia et al., 2014), a continuação serão brevemente descritas cada uma delas. Da mesma forma, James et al. (2016) afirma que outros fatores como, tipo de solo, variedade de café, práticas de manejo, tipo de vegetação, movimento histórico do cafeeiro ou comunidades ecológicas em torno às fazendas, poderiam também afetar as comunidades de fungos.

Vega et al. (2010), fizeram a comparação mais abrangente, coletando fungos endófitos em plantas de café arábica de quatro países tropicais, a Colômbia, o Porto Rico, Havaí e o México. Os resultados mostraram que o café alberga uma grande diversidade de fungos, um total de 843 genótipos, onde os gêneros mais frequentes foram *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Xylariaceae*. Além disso, foram elucidadas diferenças significativas nas comunidades entre as regiões.

Santamaria e Bayman (2005), estudaram comunidades fúngicas endófitas e epífitas associadas a folhas de café em cinco pontos de coleta em Porto Rico. Foram isolados um total de 821 colônias e agrupadas em 131 mofoespécies. Os cinco gêneros comuns em mais de um local foram: *Pestalotia*, *Botryosphaeria*, *Xylaria*, *Colletotrichum* e *Guignardia*. Os resultados mostraram diferenças entre as comunidades, sendo identificadas uma maior quantidade de espécies endófitas. As comunidades diferiam significativamente em número e diversidade de fungos entre os sítios de amostragem, apontando-se também às diferenças condições ambientais como uma das principais causas.

Saucedo–Garcia et al. (2014), analisaram os efeitos de distintos sistemas agroflorestais em diferentes regiões sobre a diversidade de fungos endófitos em folhas de café. Um total de 479 de fungos isolados foram atribuídos a 31 morfoespécies através de identificação morfológica. Os gêneros mais comuns

foram *Colletotrichum* e *Xylaria*, outros com menor frequência foram *Phomopsis*, *Beauveria*, *Alternaria*, *Coniosporium*, *Guignardia*, *Paecilomyces*, o teleomorfo *Diplodia*, *Botryosphaeria*. Os resultados sugeriram, novamente, que a abundância e a riqueza das comunidades endófitas são influenciadas predominantemente pela região cafeeira e, em menor escala, pelo sistema agroflorestal, pois plantações rústicas de café possuíram o maior número de morfoespécies.

Finalmente, James et al. (2016), estudaram a diversidade de fungos associada à ferrugem *Hemileia vastatrix*, amostrando folhas com lesões e folhas controle, concluindo que a região geográfica resultou ser um determinante maior da estrutura da comunidade fúngica do que o status da infecção, pois a diversidade foi apenas ligeiramente reduzida em folhas enferrujadas. Os resultados mostraram também uma grande diversidade de fungos, um total de 313 OTUs identificados, onde as espécies mais abundantes foram: *Glomerella cingulata*, *Passalora* sp, *Mycosphaerella* sp, *Pseudocercospora norchiensis*, *Lecanicillium* sp, *Simplicillium lanosoniveum*, *Lecanicillium fuisporum*, *Mycosphaerella* sp, *Bullera* sp., *Phaeoseptoria* sp. e *Cladosporium ramotenellum*.

Entretanto, não foram realizados estudos para investigar os efeitos da floresta circundante na diversidade de fungos em folhas da café arábica no Brasil. Os resultados obtidos mostraram um total de 320 espécies distribuídas em 143 gêneros, onde as 11 espécies dominantes foram: *Cladosporium exasperatum*, *Derxomyces anomalus*, *Phoma glomerata*, *Cryptococcus aff taibaiensis*, *Acrodontium crateriforme*, *Cryptococcus laurentii*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cryptococcus* sp, *Passalora* sp., *Hannaella sinensis* e *Fusarium beomiforme*. Como descrito por James et al. (2016), os métodos utilizados na presente pesquisa conseguem mostrar uma grande porção da comunidade, fungos endófitos e epífitos, revelando o poder das tecnologias de sequenciamento de próxima geração.

Por outro lado, é importante mencionar que os resultados obtidos mostraram uma sobreposição muito baixa de espécies em comparação com os fungos identificados em folhas de café em outras pesquisas. Isso claramente pode ser devido aos métodos empregados, aos objetivos da pesquisa, tipo de

manejo e a região geográfica, entre outros fatores. No entanto, alguns gêneros foram comuns em todas as pesquisas, como *Colletotrichum*, *Xylaria*, mostrando grande abundância nas pesquisas de Vega et al. (2010), Saucedo–Garcia et al. (2014) e Santamaría e Bayman (2005), e em menor frequência reportados por James et al. (2016) e na presente pesquisa (OTUs 159 e 290). De acordo com Vega et al. (2010), é possível que alguns genótipos sejam ubíquos entre as regiões produtoras de café pela distribuição global dos próprios fungos ou pelo movimento de plantas e sementes de café entre as regiões produtoras.

A ocorrência de genótipos em folhas e outros tecidos de vários países deixa aberta a possibilidade de distribuições globais de fungos. Ludlow et al. (2016), afirmam que as leveduras associadas ao café são muito diversas e específicas para regiões geográficas. As cepas de café da América do Sul e do Caribe se diferenciam daquelas provenientes da África, formando populações particulares e ao mesmo tempo agrupamentos por países. Some-se a isto, atividades humanas, como a migração, podem ter fomentado a criação de grupos híbridos.

Outros gêneros presentes em folhas de café citados em pesquisas, e abundantes nos resultados aqui apresentados são *Cladosporium* (James et al., 2016; Vega et al., 2010) e *Fusarium* (James et al., 2016; Vega et al., 2010; Santamaria; Bayman, 2005). Ambos foram já muito estudados nos frutos de café com funções completamente opostas. Por um lado, uma ampla variedade de pesquisas apontam que *Cladosporium* é um importante agente biológico para a cafeicultura e está associado a bebidas de boa qualidade, não unicamente relacionando-se com as características organolépticas, senão também com o aspecto da segurança do fruto (Carvalho; Chalfoun, 1985; Alves, 1996; Chalfoun, 2007; Chalfoun, 2010; Pereira, 2005). Chalfoun et al. (2007), isolou e identificou *Cladosporium cladosporoides* como espécie que possui essas características bioprotetoras. Por outro lado, gêneros como *Fusarium* são frequentemente associados com micotoxinas que tornam o grão impróprio para o consumo, além de provocar alterações sensoriais na bebida (Silva et al., 2008). Cabe ressaltar que os fungos presentes em frutos podem estar associados também às folhas, pois apresentam ambientes similares (Chalfoun et al., 2007).

No entanto falar em nível de gênero pode ser muito geral, pois existem espécies do mesmo gênero que comportam-se muito diferente. Por exemplo, cinco espécies do gênero *Phoma*: *P. tarda*, *P. exígua*, *P. jolyana* e *P. constarricensis* (Salgado; Pfenning, 2000), foram relacionados com uma das doenças mais virulentas para o cafeeiro a Mancha-de-Phoma. Contrariamente, as espécies *Phoma Glomerata* e *Phoma betae* foram registradas como biocontroladoras de patógenos em outras lavouras (Sullivan; White, 2000; Diamond; Cooke, 2003).

Todos os estudos anteriormente citados mostraram heterogeneidade nas comunidades de fungos, pois os locais amostrados pertenciam a diferentes sítios de estudo, seja países ou regiões com diferenças geográficas. Pelo contrário, a pesquisa aqui apresentada, não mostrou diferenças significativas entre todos os pontos de coleta no interior da fazenda, a análise de similaridade ANOSIM apresentou um valor de p de  $0,19 > 0,05$ , reforçando a ideia da importância dos fatores geográficos e climáticos no desenvolvimento de comunidades fúngicas, pois uma fazenda de 25 hectares aproximadamente, está sendo influenciada por condições ambientais similares. Concordando com os resultados obtidos por Saucedo–Garcia et al. (2014) que descobriram que plantações de café geograficamente mais próximas possuíam estruturas de comunidades fúngicas semelhantes, demonstrando que as similitudes das mesmas é uma função entre a distância dos pontos de coleta. Situação que foi confirmada também em associações de fungos com outras plantas hospedeiras herbáceas (Gange et al., 2007), plantas do gênero *Podocarpus* (Joshee et al., 2009) e em outras culturas como *Theobroma cacao*, onde Arnold e Herre (2003) relataram que existe uma redução na similaridade entre fungos endófitos à medida que a distância entre os locais de amostragem aumenta mais de 50 km.

Igualmente, o fato de não apresentar diferenças significativas nas comunidades fúngicas entre os sítios amostrados sugere que pode existir um equilíbrio ecológico entre as espécies que habitam as folhas, sendo compatíveis entre elas. No entanto, existe a preocupação de interromper esse balanço, por exemplo com a introdução de alguma espécie ou o uso de algum controlador químico não seletivo que possa interromper esse equilíbrio. Portanto, uma espécie com menor abundância poderia virar uma praga secundária, conforme

o mencionado por Schulz (2005), os fungos representam individualmente ou coletivamente, uma variável continua de associações mudáveis com as plantas, que vão desde o mutualismo até a patogenicidade latente.

Outro fator importante que deve ser considerado no desenvolvimento dos fungos são as práticas de manejo, especialmente o uso controladores químicos (James et al., 2016). Na área de estudo, são utilizados os fungicidas a base de cobre, os fungicidas sistêmicos Cantus, Comet e o Opera. Os controladores químicos tem diferentes mecanismos de ação e podem ser de ampla gama ou de um grupo específico de fungos (Morton, 2008), eles atuam nas vias metabólicas dos insetos e pragas que desejam-se controlar, não obstante, muitas daquelas vias são comuns em outros organismos e conseqüentemente espécies não alvo podem ser afetadas (Soares, 2001), reduzindo a microfauna benéfica e provavelmente aumentando as populações de insetos e outras pragas, provocado desequilíbrios ecológicos com possíveis conseqüências para a saúde das plantas e produtividade da lavoura (Soares, 2001; Karlsson et al., 2014). Com essa preocupação Chalfoun et al. (2007) fizeram uma pesquisa ressaltando a importância da utilização de fungicidas seletivos, com o objetivo de preservar fungos endófitos que possuem implicações positivas com o cafeeiro.

Informações relacionadas ao efeito em microrganismos não alvo é escassa, porém deve ser mais estudada pelas importantes funções que estes organismos desempenham para a sustentabilidade dos ecossistemas (Fernandez-Calviño, 2010) e com o objetivo de desenvolver novas estratégias sustentáveis de controle de doenças em plantações agrícolas (Karlsson et al., 2014).

Wang et al. (2009), afirma que o uso de fungicidas cúpricos poderia explicar grande parte da microfauna, pois este tipo de produtos produzem mudanças nas atividades microbianas e enzimáticas nos solos, reduzindo os processos mediados por microrganismos, inclusive em solos onde o controlador químico tem sido utilizado por poucos anos. Karlsson et al. (2014), verificaram que o uso de fungicidas teve um efeito significativo na composição da comunidade fúngica nas folhas do trigo, provocando mudanças na abundância relativa dos fungos.

Segundo Karlsson et al. (2014), o tratamento com fungicidas teve um efeito negativo na homogeneidade da comunidade. No entanto, o padrão foi diferente quando incluíram-se amostras infectadas de *P. striiformis*, pois houve uma interação significativa entre a área e o tratamento com o fungicida, conseqüentemente houve uma maior homogeneização da comunidade em amostras tratadas fungicidas do que em amostras controle. Essa descoberta é de grande importância para a pesquisa apresentada, pois pode-se inferir que a homogeneidade de fungos nos 15 pontos de coleta é provavelmente provocada pelo uso de controladores químicos. No entanto devem ser feitas uma maior quantidade de pesquisas para conhecer os efeitos dos controladores químicos nas comunidades fúngicas.

Por outro lado, foi realizado o Teste Mantel para determinar a relação entre a matriz de diversidade de fungos e a matriz de distâncias geográficas, com a finalidade de conhecer se a distância da floresta teve efeitos nas comunidades fúngicas. De acordo com Clough et al. (2011), existe maior riqueza de fungos e outros grupos taxonômicos perto da floresta, enfatizando na importância da conservação de florestas primárias perto de paisagens agrícolas. Contrariamente, os resultados apresentados não mostraram diferenças significativas na diversidade de fungos em relação a distância da floresta. No entanto, os resultados relacionados aos membros da comunidade “*community membership*”, foram significativos, ou seja enquanto mais perto fisicamente encontram-se os pontos amostrados existe uma relação entre a presença/ausência de fungos. Portanto, o fato da diversidade ser mais semelhante quanto mais próximos estão os locais amostrados sugere que o equilíbrio é mantido localmente.

Segundo Herre e Arnold (2003), os fungos endófitos são transmitidos horizontalmente através das plantas. De acordo com os resultados apresentados, pode-se deduzir que eles vão infectando as folhas e árvores mais próximas sem ter a necessidade de se deslocar vários quilômetros. Essa informação é importante para o manejo das lavouras, pois, pequenos produtores de café podem considerar que a diversidade de fungos nas folhas da fazenda é homogênea. No entanto, aqueles produtores com grandes hectares de cultivo,

deve possuir um plano de manejo gerencial da fazenda em função as diferentes partes do cafezal, pois é provável que a distribuição das espécies seja distinta.

Em relação à conectividade com a floresta, unicamente o teste memeuclidean apresentou um valor significativo,  $p= 0,012$ . Portanto, utilizando matrizes de distâncias euclidianas e considerando presença/ausência de espécies os resultados são correlacionados com a conectividade com a Área de Preservação Permanente. No entanto, todos os outros testes de diversidade beta realizados Jclass, UNIFRAC unweighted e weighted, Bray-Curtis e Structeuclidean e também os índices de diversidade alfa, Chao, Shannon e Simpson e diversidade filogenética não foram significativos, porém futuras pesquisas devem ser realizadas, pois a metagenômica representa uma importante ferramenta para relacionar a ecologia de paisagem e a agricultura sustentável. Fungos e outros grupos como insetos e bactérias podem ser estudados com técnicas de biologia molecular para apoiar aos agricultores e desenhar matrizes de paisagem sustentáveis em áreas de café no Brasil, pois a conservação de florestas primárias perto trazem inúmeros benefícios para a diversidade, além de fornecer serviços ecossistêmicos entre os quais podem ser citados a polinização, regulação do clima, controle da erosão, sequestro de carbono, ciclagem de nutrientes, controle de pragas, entre outros (Vandermeer et al., 2010).

De acordo com Clough et al. (2011), sistemas agroflorestais podem ser desenhados para otimizar benefícios tanto para produção quanto para a biodiversidade, sem adicionar pressão na conversão de habitats naturais para terras agrícolas. Essa afirmação surge a partir da pesquisa realizada em sistemas agroflorestais de cacau na Indonésia, onde a riqueza de espécies de árvores, fungos endófitos, invertebrados e vertebrados não diminui com o rendimento. Sugerindo assim que a sombra moderada e mão de obra adequada podem-se combinar com uma estrutura de habitat complexa para fornecer altos rendimentos e favorecer à biodiversidade local. Por outro lado, Vandermeer et al. (2010), afirmam que em sistemas agroflorestais de café múltiplas interações entre diferentes espécies resultam na regulação dinâmica de potenciais doenças e pragas, sugerindo controle autônomo através de uma rede ecológica que favorece a produção de café evitando surtos extremos de doenças e pragas.

Finalmente, foi confirmado que os OTUs responsáveis da variância dos dados nos quinze pontos de coleta foram: o OTU\_1 *Cladosporium exasperatum*, o OTU\_2 *Derxomyces anomalus*, o OTU\_3 *Phoma glomerata* e o OTU\_6 *Cryptococcus laurentii*, com uma porcentagem de abundância do total dos dados de 42%, 17%, 15% e 1,7% respectivamente. Cabe destacar que pesquisas relacionadas com essas espécies ainda são insuficientes.

No caso dos dois primeiros OTUs, *C. exasperatum* e *Derxomyces anomalus* estudos relacionadas ao papel ecológico que desempenham nas lavouras é muito escasso. O OTU\_1 *C. exasperatum* foi isolado de *Eucalyptus tintinnans* na Austrália e foi uma espécie associada ao complexo *Cladosporium cladosporioides* (Bensch et al., 2010). Por outro lado, o OTU\_2 *Derxomyces anomalus* é uma espécie que pertence a um gênero recentemente reclassificado através de sequenciamento molecular, pois antigamente acreditava-se que espécies de *Dexomyces* pertenciam ao gênero *Bullera* (Wang; Bai, 2008; Wang et al., 2011). Espécies do gênero já foram isoladas de plantas subtropicais da China, *D. amylogenes*, isolado em folhas de Pino (*Pinus* sp.) e folhas de *Acer* sp, *D. bambusicola* em folhas de bambu (*Phyllostachys heterocycla*) e *D. corylopsis* em folhas de *Corylopsis* sp. (Liu et al, 2012).

Devido à abundância encontrada nas folhas de café, na área de estúdio, pode-se entender que ambas espécies estão desempenhando importantes funções no cafeeiro. Portanto, uma maior quantidade de pesquisas em plantações agrícolas devem ser realizadas para conhecer as implicações que tem na saúde das plantas.

Entretanto, os OTUs 3 e 6, já foram relatados em associação benéfica em outras lavouras. O fungo *Phoma glomerata*, foi relatado por Sullivan e White (2000) como antagônico do oídio, *Microsphaera penicillata*, um conhecido patógeno das plantas que ataca a mais de 1500 gêneros (Braun, 1987). Igualmente, *P. glomerata* foi registrada como um fungo endófito em folhas de soja no Brasil (De Souza Leite et al., 2013).

Por outro lado, *Cryptococcus laurentii* é uma espécie que já foi associada a outras culturas. De acordo com Roberts (1990), *C. laurentii* ocorre naturalmente em folhas, brotos e frutos de maçãs e atua como agente

biocontrolador de *Penicillium expansum*, uma das espécies causantes das podridões pós colheita em peras e maçãs. Igualmente, Tolaini et al. (2010), confirmou o efeito biocontrolador de *C. laurentii* junto com o basidiomiceto *Lentinula edodes* com a finalidade de aumentar a inibição sobre *P. expansum*, o qual além de causar o mofo-azul também pode produzir uma perigosa micotoxina, conhecida como patulina. O fungo também foi reportado em plantações orgânicas de cana de açúcar (Ribeiro, 2009).

A maioria dos fungos identificados nas pesquisas relacionadas a consórcios microbianos tem papéis pouco claros no que diz respeito à saúde das plantas, mas compreende uma proporção maciça e ubíqua da biodiversidade fúngica global, especialmente nos trópicos (James et al., 2016). Estudar os fungos associados à phyllosfera de cafeeiros permite reconhecer a presença de patógenos do café e avaliar, em estudos futuros, a potencialidade de alguns fungos endófitos e de comunidades de fungos no controle de doenças ou pragas (Saucedo–Garcia et al., 2014). Além disso, pesquisas futuras sobre fungos devem se concentrar na tentativa de entender a ecologia dos mesmos em um contexto que enfoca seus papéis como endófitos, antagonistas de doenças de plantas, colonizadores de rizosfera e promotores de crescimento (Vega et al., 2009).

Nos últimos anos, ferramentas moleculares como a análise de sequências de DNA levaram a uma nova classificação filogenética dos fungos que desafiou muitas das suposições sobre as relações entre entomopatogênicos e outros fungos (Vega et al., 2009) e representam uma grande oportunidade para apoiar a agricultura sustentável.

## **5. CONCLUSÃO**

No presente trabalho foi sequenciado com sucesso o ADN dos fungos presentes nas folhas de café arábica em uma fazenda convencional do Município de Caconde – SP. Um total de 320 OTUs foram identificados, dos quais unicamente 11 foram representados com mais de 1% do total das amostras, estando presentes em todos os pontos de coleta. A grande diversidade encontrada, própria de ecossistemas tropicais, foi possível mediante avançadas técnicas de biologia molecular que permitem quantificar e qualificar fungos endófitos e epífitos.

Por outro lado, não se mostraram diferenças significativas da diversidade de fungos com relação à distância da floresta e à conectividade com a floresta. Pelo contrário, foi descoberta homogeneidade das comunidades fúngicas no interior da Fazenda. Esse resultado pode se dever tanto as condições ambientais e geográficas que estão interagindo na lavoura quanto as práticas de manejo, especialmente o uso de controladores químicos.

Com relação às espécies e aos gêneros encontrados, pouco se conhece da ecologia dos mesmos e dos consórcios microbianos em plantações agrícolas. Nesse sentido, a metagenômica representa uma oportunidade para continuar estudando microrganismos e melhorar o manejo das fazendas através de estratégias sustentáveis de controle de pragas e doenças. Igualmente, pode ser utilizada para estudar a dinâmica espacial das espécies e a criação de paisagens agrícolas que beneficiem a conservação da diversidade e os altos rendimentos das plantações.

## CAPITULO III

### DADOS ÚTEIS PARA OS PRODUTORES DE CAFÉ AS MARGENS DO RESERVATÓRIO DA UHE DE CACONDE

#### 1. INTRODUÇÃO

O café amplamente comercializado, é considerado o produto agrícola mais valioso e é a segunda maior *commodity*, perdendo apenas para o petróleo. Portanto, a sua importância para o comércio internacional é notável. Da mesma forma, o grão fornece um meio de subsistência para aproximadamente 125 milhões de pessoas ao redor do mundo, proporcionando emprego tanto para homens quanto para mulheres em áreas rurais de países de economias emergentes. Cabe destacar que 25 milhões de pequenos agricultores cultivam 80% do café do mundo (Fairtrade Fundation, 2012).

Entretanto, quando se fala de café é impossível não relacioná-lo com o Brasil, pois o país é responsável por um terço da produção mundial, sendo o maior produtor e exportador e o segundo maior consumidor de bebida, unicamente superado pelos Estados Unidos (ICO, 2016). De acordo com os dados do Ministério de Agricultura, em 2015 o café gerou uma receita de 6,16 milhões de dólares, representando 7% do total das exportações do agronegócio brasileiro. A produção do grão no país possui uma área estimada de 2,25 milhões de hectares, distribuída em cerca de 1.900 municípios onde trabalham cerca de 287 mil produtores. Esses dados corroboram com o contexto global, demonstrando assim a relevância dos papel dos pequenos produtores. Da mesma forma, o café destaca-se como o principal gerador de postos de trabalho na agropecuária nacional, sendo o gerador de mais de oito milhões de empregos (MAPA, 2016).

Por outro lado, muitos fatores podem afetar a produção do grão, provocando um forte impacto na economia dos pequenos agricultores e concomitantemente, em toda a cadeia produtiva. Entres esses fatores pode-se citar: mudanças climáticas, enchentes, secas, altas temperaturas e baixo regime hídrico que provocam estresse na planta e pragas ou doenças causadas por fungos ou bactérias. No entanto, a maior parte dos microrganismos nas plantas

agem de forma endófitas, isto é, colonizando os tecidos saudáveis cuja associação pode ser obrigatória ou facultativa, sem causar aparentes sintomas de doença (Nair; Padmavathy, 2014). Contudo, pouco se conhece sobre eles e do seu papel no desenvolvimento das plantas.

Desta forma, os métodos moleculares vieram como uma ferramenta que está revolucionando a taxonomia dos fungos e outros microrganismos. Muitas espécies estão se descobrindo e muitas outras se reclassificando dentro do reino fungi, um grupo que compreende um universo tão amplo e complexo que ainda é considerado pouco estudado em relação aos outros grupos como os mamíferos e às aves, por exemplo. Segundo Wang et al. (2008), o número real de fungos é ainda desconhecido e somente de 5% a 13% da estimativa global das espécies têm sido descritas. No entanto, espécies tão pequenas estão, o tempo todo, cumprindo funções muito importantes para os ecossistemas onde habitam, sendo organismos decompositores e atuando em associações mutualistas ou patógenas nos solos, animais e plantas hospedeiras.

Os fungos, considerados por anos prejudiciais para o desenvolvimento adequado das plantas, são bem conhecidos como patógenos e “inimigos” dos produtores. No entanto, nas últimas décadas, tem se estudado o papel dos mesmos como biocontroladores e bioprotetores de alimentos, o que pode fazer com que eles se tornassem grandes aliados dos agricultores no combate a pragas e doenças, de maneira natural e segura para o meio ambiente e para a saúde humana. Há de reconhecer, entretanto que os esforços na pesquisa ainda são insuficientes, pois muitas delas estudam o desenvolvimento dos fungos em condições de laboratório e não em condições de campo, onde sabe-se que fatores ambientais interferem na estrutura das comunidades fúngicas. Por outro lado, as pesquisas também são pouco divulgadas entre os produtores, assim acabam sendo pouco práticas ou inviáveis para sua aplicação.

Portanto, a finalidade do presente capítulo é mostrar os resultados da pesquisa para o produtor de café, com objetivo principal de conhecer a diversidade de fungos que estão interagindo nas folhas e provavelmente nos frutos da lavoura, pois ambas superfícies possuem características similares. Além disso, deseja-se poder entender a influência das APPs e fatores ambientais na diversidade do grupo e como o uso de fungicidas químicos pode afetar a

estrutura da comunidade, bem como os efeitos dos mesmos no meio ambiente e na saúde humana. Por último, pretende-se analisar se as novas tecnologias moleculares de sequenciamento representam uma oportunidade para o produtor.

## **2. FUNGOS EM FOLHAS DO CAFÉ**

No presente trabalho, como já foi apresentado nos capítulos anteriores, foram estudadas as folhas de árvores de café na fazenda São Luis situada no Município de Caconde, com a finalidade de conhecer a diversidade de fungos que habitam nelas e como esses microrganismos agem habitualmente em lavouras de café.

Os resultados obtidos mostram uma grande diversidade de fungos endófitos e epífitos, corroborando com o que outras pesquisas afirmam relacionadas ao reino fungi em ecossistemas tropicais (James et al., 2016; Vega et al., 2009; Arnold, 2007). Foram encontrados um total de 320 espécies distribuídas em 143 gêneros, dos quais apenas 11 espécies pertenciam a oito gêneros possuindo dominância com relação a abundância e riqueza, pois estavam presentes em todos os pontos de coleta (Figura 22). Pode-se constatar também a presença de uma grande quantidade de espécies com baixa abundância (ANEXO B). Por outro lado, por ponto de coleta amostrado no interior fazenda foram encontrados entre 39 e 94 espécies. Segundo Vega et al. (2009), a grande diversidade de fungos em plantações de café pode indicar que a maior parte deles são “turistas acidentais” sem nenhuma função na planta, enquanto aqueles que tem um desempenho elucidado poderiam ser definidos como “passageiros influentes”.

Existem algumas pesquisas realizadas sobre fungos endófitos e epífitos associadas ao cafeeiro em ecossistemas tropicais (James et al., 2016; Vega et al., 2009; Santamaria e Bayman, 2005; Saucedo-Garcia et al., 2014). Algumas delas, coincidiram com os gêneros de fungos dominantes em regiões cafeeicultoras da América Latina como é o caso de *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, apontando que alguns gêneros podem se encontrar de forma ubíqua entre as regiões produtoras do grão. No entanto, a maior parte das pesquisas apontaram a influência dos fatores ambientais na diversidade de

fungos. James et al. (2016), por exemplo afirmam que existe maior quantidade de espécies ou gêneros compartilhados entre os pontos amostrados em Porto Rico em comparação com as amostras do México. Não obstante, pesquisas no Brasil relacionadas à diversidade de fungos em folhas do café não tem sido feitas até agora, impossibilitando assim a comparação e identificação de espécies de fungos dominantes em lavouras no país.

Na tabela 7, descreve-se os gêneros e, se for o caso, as espécies mais abundantes encontradas nas folhas, com especial ênfase na relação com as plantações de café ou outras lavouras, ou seja, se eles tem uma relação patógena ou simbiótica com a planta. No entanto, de acordo com James et al. (2016), a maior parte dos fungos em ecossistemas tropicais não estão bem caracterizados com relação ao seu papel ecológico.

Cabe ressaltar a importância da pesquisa para identificar espécies de fungos, pois geralmente trabalha-se até o nível taxonômico de gênero pela complexidade da taxa. No entanto, existem espécies dentro de um mesmo gênero com associações com as plantas totalmente diferentes. Contudo, as técnicas de biologia molecular estão sendo uma importante ferramenta para a identificação mais precisa dos microrganismos.

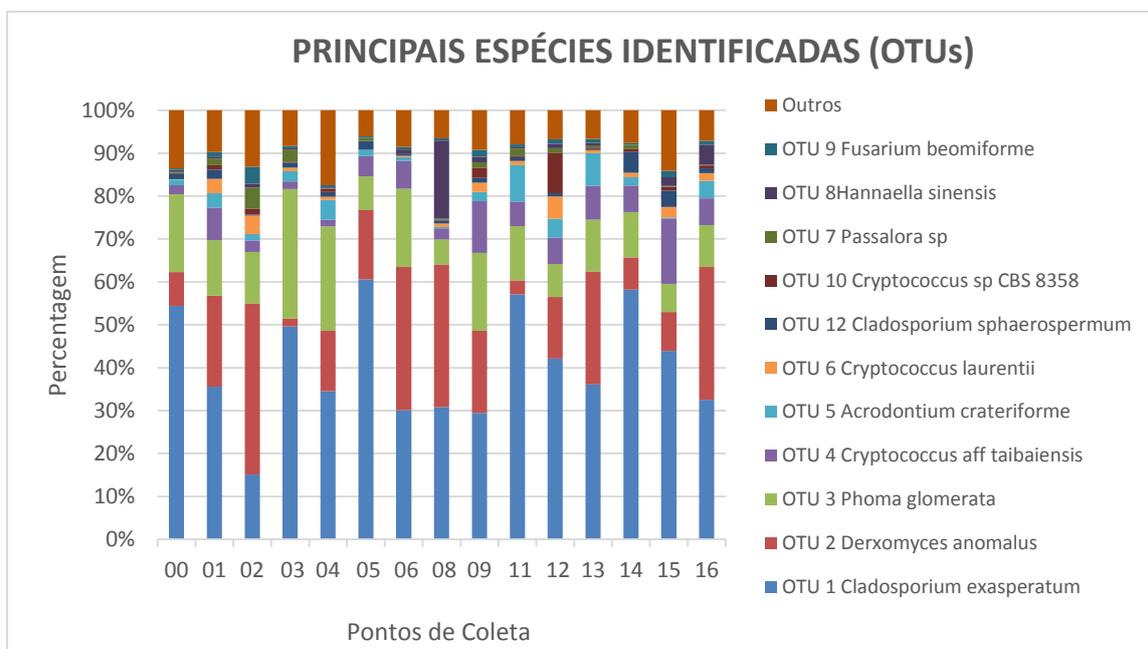


Figura 22 Principais Espécies de Fungos Identificadas em cada ponto de coleta na fazenda São Luis

Tabela 7 Descrição das Principais espécies Identificadas.

Gênero	Espécie Identificada	Relação com o café ou outras lavouras
<b>Cladosporium</b> 42% do total dos dados.	OTU 1 <i>Cladosporium exasperatum</i> OTU 12 <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O gênero é conhecido como “o fungo do bem” na cafeicultura, pois recobre os frutos maduros impedindo a entrada de fungos nocivos e melhora também a qualidade da bebida.</li> <li>• <i>C. cladosporoides</i> tem se destacado como um importante agente biológico que inibe os gêneros <i>Fusarium</i>, <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> que, por sua vez, são fungos relacionados com a deterioração da qualidade dos frutos e a produção de micotoxinas que tornam o grão impróprio para o consumo (Silva et al., 2008; Chalfoun, 2010).</li> <li>• Em relação às espécies <i>C. exasperatum</i> e <i>C. sphaerospermum</i> as pesquisas ainda são insuficientes.</li> </ul>
<b>Derxomyces</b> 17% do total de dados.	OTU 2 <i>Derxomyces anomalus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouco se sabe sobre o <i>D. anomalus</i> com relação ao café ou a outras espécies agrícolas.</li> <li>• Três espécies já foram isoladas de plantas subtropicais da China e reveladas por métodos moleculares: <i>D. amylogenes</i>, isolado em folhas de <i>Pinus sp.</i> e de <i>Acer sp.</i>, <i>D. bambusicola</i> em folhas de bambu e <i>D. corylopsis</i> em folhas de <i>Corylopsis sp.</i> (Liu et al, 2012).</li> <li>• A falta de informações com pode ser atribuída à recente reclassificação, já que acreditava-se que espécies de <i>Dexomyces</i> pertenciam ao gênero <i>Bullera</i>.</li> <li>• Nenhum dos gêneros enquadram-se como doenças na agricultura Brasileira (AGROFIT, 2016).</li> </ul>
<b>Phoma</b> 15% do total dados.	OTU 3 <i>Phoma glomerata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O gênero <i>Phoma</i> na cafeicultura é frequentemente associado à doença Mancha-de-Phoma.</li> <li>• No entanto o fungo <i>P. glomerata</i>, é uma espécie que embora não tenha sido muito estudada, está longe de ser relatada como doença, pois foi registrada por Sullivan e White (2000) como antagonista do oídio.</li> <li>• O fungo pode colonizar e suprimir o desenvolvimento da doença no carvalho em condições de laboratório (Sullivan, 2000). Assim, pode continuar sendo estudado para ser utilizado como um agente micoparasítico em outras espécies de importância agrícola.</li> </ul>
<b>Cryptococcus</b> 9% do total dos dados.	OTU 4 <i>Cryptococcus aff. taibaiensis</i> OTU 10 <i>Cryptococcus sp.</i> OTU 6 <i>Cryptococcus laurentii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouco se sabe do gênero em plantações café, não se enquadram dentro das principais doenças da lavoura.</li> <li>• <i>C. laurentii</i> ocorre naturalmente em folhas e frutos de maçãs e atua como agente biocontrolador de <i>Penicillium expansum</i>, causante das podridões pós colheita em peras e maçãs (Roberts, 1990), além de produzir a perigosa micotoxina patulina.</li> <li>• Tolaini et al. (2010), confirmou ou o efeito biocontrolador de <i>C. laurentii</i> junto com o basidiomiceto <i>Lentinula edodes</i> com a finalidade de aumentar a inibição sobre <i>P. expansum</i>.</li> <li>• Yu et al. (2008) demonstrou que a presença da quitina em condições de laboratório melhorou o processo de biocontrole, induzindo a atividade antagonista de <i>C. laurentii</i> sem influenciar o seu crescimento.</li> </ul>
<b>Acrodontium</b> 3% do total dos dados.	OTU 5 <i>Acrodontium crateriforme</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fungo pouco estudado no café, contudo a espécie já foi identificada associada a outras plantas.</li> <li>• Kiss (2003) fez uma revisão dos principais fungos com a capacidade de parasitar o fungo causante do oídio.</li> <li>• <i>Acrodontium crateriforme</i> foi reportado como agente potencial de controle biológico do oídio em folhas de <i>Medicago lupulina</i> em condições de laboratório (Hijwegen; Buchenauer, 1984). No entanto, o seu potencial biocontrolador em campo ainda não foi investigado (Fondevilla; Rubiales, 2012).</li> </ul>

Gênero	Espécie Identificada	Relação com o café ou outras lavouras
<b>Passalora</b> 2% do total dos dados.	OTU 7 <i>Passalora sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouco se sabe do gênero em plantações café.</li> <li>• Não se enquadram como doenças do cafeeiro (AGROFIT, 2016).</li> <li>• Douanla-Meli et al. (2013), evidenciou que a espécie <i>Passalora loranti</i> era predominante em folhas saudáveis e estava ausente em folhas amareladas de limão.</li> <li>• James et al. (2016) registrou o fungo em folhas de café arábica no México e Porto Rico, como a segunda espécie mais abundante nos pontos coletados</li> </ul>
<b>Hannaella</b> 2% do total dados.	OTU 8 <i>Hannaella sinensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouco se sabe do gênero em plantações café.</li> <li>• O gênero compreende espécies que ocorrem amplamente na superfície das folhas das plantas.</li> <li>• Wang e Bai (2008), registraram a espécie em plantações de trigo na China.</li> <li>• Nutaratat et al. (2014), sugerem que <i>H. sinensis</i> é capaz de produzir elevados níveis de ácido indol – 3 – acético – IAA, um hormônio, derivado da família das auxinas, que possui um efeito positivo nas planta como promotor do crescimento vegetal, estimulando a germinação de sementes, o alongamento das células e o desenvolvimento das mudas.</li> <li>• Na literatura pode ser encontrada a espécie como <i>Bullera sinensis</i> ou <i>Hannaella sinensis</i>, pois <i>Hannaella</i> é um gênero recentemente criado.</li> <li>• James et al. (2016), registraram <i>Bullera sp.</i>, entre os gêneros mais abundantes, nas folhas de café no México e Porto Rico.</li> </ul>
<b>Fusarium</b> 1% do total dados.	OTU 9 <i>Fusarium beomiforme</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leslie et al. (2006), afirmam que pelo menos 80% de todas as plantas cultivadas estão associadas com uma ou mais doenças causadas por espécies de <i>Fusarium</i>.</li> <li>• No café, <i>Fusarium xylarioides</i> causa a traqueomicose “coffee wilt disease” ou murcha vascular do cafeeiro, uma das doenças mais agressivas que ataca o café robusta no continente africano (Geiser et al., 2005). O fungo pode atacar todos os estádios de crescimento, invadindo o sistema vascular causando clareamento das nervuras e epinastia nas folhas, ao mesmo tempo, há um retardo do crescimento, seguido de um amarelecimento das folhas inferiores, murcha progressiva das folhas e caule, desfolha e, finalmente, a morte da planta (Pietro et al, 2003).</li> <li>• A Fusariose é uma doença de menor gravidade, que não representa uma grande ameaça para os cafeicultores brasileiros (Matiello; Almeida, 2016), as espécies associadas a doença são <i>F. oxysporum</i>, <i>F. solani</i>, <i>F. verticillioides</i>, <i>F. equiseti</i> e <i>F. stilboides</i> (Pfenning; Martins, 2000).</li> <li>• Algumas espécies do gênero produzem micotoxinas, que contaminam os alimentos e conseqüentemente expõem a saúde dos seres humanos e dos animais (Desjardins, 2006).</li> <li>• Rheeder et al. (2002), evidenciou que 15 espécies do gênero são capazes de produzir fumonisinas, uma família de micotoxinas cancerígenas nos alimentos. Em contrapartida, analisaram e isolaram espécies não produtoras das micotoxinas, entre elas a espécie encontrada na fazenda de café em estudo, <i>Fusarium beomiforme</i>.</li> </ul>

### 3. CONTROLE DE DOENÇAS

Um dos fatores principais que limitam a produção agrícola são as perdas no rendimento causado por insetos e doenças, as quais estão relacionadas diretamente a fungos e outros microrganismos. Programas de controle biológico de pragas eram empregados nas lavouras até o surgimento de agroquímicos no mercado, a partir de 1940 (Bustillo, 2005) (Vega et al., 2009). Desde aquela época até a atualidade houve um grande aumento no uso de controladores químicos. Apesar disso, de acordo com Oerke (2006), as perdas no rendimento nas plantações agrícolas tem se mantido relativamente constantes. Da mesma forma, Clough et al. (2011), afirmam que embora o uso de pesticidas tem se mostrado fortemente crescente, eles não se correlacionaram com as pragas e a incidência da doença, sugerindo um viés em direção as despesas em vez de uma redução significativa da doença. Contrariamente, Campanhola e Bettiol (2003) afirmam que, os produtos de controle químico auxiliaram no controle de pragas e possibilitaram o aumento da produtividade da agricultura.

Nos últimos anos, o mercado mundial de agrotóxicos tem crescido em média 93% (Melo, 2016). No contexto brasileiro, a situação é ainda mais impactante, pois o uso desses produtos aumentou em 190% (Melo, 2016), o que coloca o país em primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos, desde 2009 (Bombardi, 2011). De acordo com Peres et al. (2001), o uso indiscriminado pode estar relacionado tanto à intensa produtividade agrícola quanto à pressão exercida pelo mercado de agrotóxicos, pois as empresas comercializadoras se dirigiam aos agricultores descrevendo aqueles produtos como a salvação da lavoura diante de insetos e pragas, além de representar um status de modernidade.

É bem conhecido que o uso excessivo provoca múltiplos impactos no meio ambiente, degradando os recursos naturais, afetando a fertilidade dos solos, poluindo as águas, gerando resíduos químicos na planta e diminuindo a biodiversidade (Bustillo, 2005; Ferreira et al., 2014; Soares, 2011). Com relação aos microrganismos, sabe-se que eles representam funções chave nos agroecossistemas e que o uso de pesticidas tem um impacto prejudicial nos mesmos. Portanto, mudanças nas comunidades perturbam o sistema solo-

planta, tendo possíveis efeitos ao longo do tempo, impactando na qualidade do solo e na produtividade das lavouras (Viti, 2008; Ampofo et al., 2009).

Por outro lado, os controladores químicos atuam nas vias metabólicas dos insetos e pragas que desejam-se controlar, não obstante, muitas daquelas vias são comuns em outros organismos e conseqüentemente, espécies não alvo podem ser afetadas, eliminando possivelmente a fauna benéfica e aumentando as populações de insetos e outras pragas, provocado desequilíbrios ecológicos (Soares, 2001). Com essa preocupação, Chalfoun et al. (2007) fizeram uma pesquisa ressaltando a importância da utilização de fungicidas seletivos, com o objetivo de preservar fungos endofíticos que possuem implicações positivas no cafeeiro.

De acordo com Chalfoun et al. (2007), o desenvolvimento *C. cladosporoides*, fungo benéfico para o café, ocorre juntamente com o controle químico de doenças, como a ferrugem e a cercosporiose. Logo, surge o questionamento se a aplicação de fungicidas químicos afeta também o desenvolvimento de *C. cladosporoides*, enfatizando a importância de selecionar aqueles que sejam seletivos aos agentes antagonistas de fungos deletérios à qualidade do grão. Os resultados mostraram que os tratamentos com o fungicida epoxiconazole, fungicida sistêmico, aplicado isoladamente ou associado ao fungicida cúprico afetam negativamente as populações do fungo. Enquanto que os tratamentos unicamente com fungicidas cúpricos revelaram uma alta incidência de *C. cladosporoides* que não foi afetada pela aplicação do produto. Esses resultados são de grande importância para o produtor rural de sistemas convencionais de café na hora de selecionar os fungicidas que serão aplicados na lavoura.

Além disso, os resultados de Chalfoun et al. (2007) coincidem com os dados obtidos na presente pesquisa, pois a Fazenda São Luis utiliza fungicidas cúpricos para o controle de doenças que evidentemente não afetaram o desenvolvimento de *Cladosporium* nas folhas de café, mostrando a presença do gênero em todos os pontos coletados e com uma grande abundância em relação aos outros, representando aproximadamente 42% do total dos dados.

Ferreira et al. (2014) afirmam que há uma relação inversamente proporcional entre a eficácia e o número de aplicações dos agrotóxicos, ou seja, a efetividade dos mesmos decresce conforme aumentam o número de aplicações. Isso porque, muitas vezes, as pragas não são completamente dizimadas e restam alguns indivíduos que apresentam genótipos com maior resistência. Acrescenta-se a isso o fato de que aproximadamente 40% das terras destinadas a agricultura estão passando por um processo de degradação, apontando ao uso de agrotóxicos como o principal responsável (Dumanski; Pieri, 2000).

Em relação à saúde humana, a exposição contínua a agrotóxicos compromete a saúde tanto dos agricultores quanto dos consumidores (Ferreira et al., 2014). De acordo com Ngowi (2007), entre os principais sintomas associados ao uso encontram-se problemas da pele e distúrbios do sistema neurológico. É importante destacar que os dias de confinamento e tratamento das doenças tem um impacto não só na produtividade agrícola e na geração de renda (Ferreira et al., 2014), mas também nos custos com a recuperação, transporte ao centro de saúde, perdas de mão de obra, que não são contabilizados nas análises dos custos dos pesticidas (Ngowi, 2007). De acordo com a Fait et al. (2004), a maior parte dos controladores químicos de doenças são tóxicos. Logo recomenda-se a utilização da maneira mais racional possível, gerando não só uma economia ao produtor quanto uma diminuição dos riscos para a saúde.

- Fungicidas cúpricos

Entre os controladores químicos mais utilizados em lavouras de café, enquadram-se os fungicidas cúpricos, empregados também na Fazenda São Luis. O Cobre é um metal presente naturalmente no meio ambiente e é essencial para os processos metabólicos em todos os seres vivos em pequenas quantidades. No entanto, a aplicação foliar de fungicidas cúpricos, por longos períodos de tempo, para controlar doenças em diferentes cultivos agrícolas resultou em sérios prejuízos ambientais.

Pesquisas apontam que o uso daqueles produtos aumenta a concentração do metal no solo em diversas culturas (Ferreyra, 2014; Ruyters et

al., 2013; Wang et al., 2009; Viti, 2008), entre elas o café (Loland e Singh, 2004). O cobre é um metal pouco móvel que tem a tendência de se acumular nos horizontes superficiais do solo. De acordo com Loland e Singh (2004), a concentração de cobre em cafeeiros cuja profundidade era de 0 – 5 cm, foi aproximadamente três vezes maior em relação à profundidade de 15 – 30 cm, havendo uma maior concentração nas folhas da planta. Da mesma forma, apresenta-se uma excessiva acumulação na primeira camada, muito acima das concentrações naturais de metais encontrados em solos florestais (Fernandez-Calviño, 2010). Segundo Ruyters et al. (2013), as concentrações presentes na camada superior das videiras não afetam as raízes das planta, o que diminui a possibilidade de toxicidade nos frutos. No entanto, o cobre pode ser tóxico para outros cultivos com raízes menos profundas em casos de mudança no uso do solo.

De acordo com Miotto (2014), solos que apresentam altos níveis de cobre (devido a aplicação de fungicidas) podem demonstrar um aumento da absorção, concentração, acumulação e toxicidade do último nos tecidos. A acumulação nas raízes pode afetar a absorção de outros nutrientes, provocando problemas na nutrição da planta. Vinit-Dunand (2002) afirma, que o cobre em excesso é fortemente fitotóxico e pode alterar a permeabilidade da membrana, a estrutura da cromatina e a síntese de proteínas. Além disso, estudos em cloroplastos isolados e folhas tem demonstrado um efeito direto do cobre na cadeia de transporte de elétrones. Outros problemas encontrados são a diminuição da fotossíntese, redução da superfície foliar e a inibição do crescimento das plantas (Alaoui-Sossé et al., 2004). Ademais, análises bioquímicos nas folhas mostraram sintomas de estresse oxidativo que foram correlacionados com as concentrações de cobre no solo (Miotto, 2014).

Informações relacionadas ao efeito em microrganismos não alvo são escassas, devendo ser bem estudadas pelas importantes funções que estes organismos desempenham para a sustentabilidade dos ecossistemas (Fernandez-Calviño, 2010). Níveis elevados de cobre, poderiam ser um risco para os microrganismos de solos agrícolas tratados com fungicidas cúpricos (Viti et al., 2008). Wang et al. (2009) afirmam que o uso de fungicidas cúpricos produz mudanças nas atividades microbianas e enzimáticas em solos, inclusive

naqueles onde o controlador químico tem sido utilizado por poucos anos. Karlsson et al. (2014), verificaram que o uso de fungicidas teve um efeito significativo na composição da comunidade fúngica nas folhas do trigo, provocando mudanças na abundância relativa dos fungos. Portanto, o uso deste tipo de fungicidas poderiam explicar uma grande parte da microfauna.

Do mesmo modo, Karlsson et al. (2014), afirmaram que o tratamento com fungicidas teve um efeito significativo na homogeneização das comunidades. Esta pode ser uma consideração importante com relação aos resultados obtidos na presente pesquisa, pois na fazenda São Luis são aplicados fungicidas para o controle de doenças e foi constatada uma biodiversidade de fungos homogênea nos quinze pontos de coleta, não apresentando diferenças significativas em relação à distância da Área de Preservação Permanente.

Em relação à atividade enzimática no solo, ela tende a diminuir conforme aumenta o teor total de cobre. No entanto, um fator importante que deve ser considerado é o pH, pois é determinante para a composição de comunidades microbianas. Baixas atividades enzimáticas pode ser também, em parte, devido a baixos valores de pH do solo (Fernandez-Calviño, 2010).

Devido aos problemas já mencionados em relação ao uso de fungicidas cúpricos, Loland e Singh (2004) afirmam que os mesmos podem causar potenciais problemas à saúde da humana. Conseqüentemente, cabe ressaltar que muitas regiões do mundo estão se preocupando com as concentrações de cobre em plantações agrícolas. Em alguns países europeus, como Holanda e Suíça por exemplo, foram aplicadas medidas restritivas quanto à utilização desses produtos (Wang et al., 2009). Portanto, a sustentabilidade dos cultivos agrícolas requer uma mudança nas estratégias de controle de pragas. Além disso, existe a necessidade de um Manejo Integrado de Pragas incentivando as práticas de controle biológico e um manejo mais sustentável da cultura (Fait et al., 2004).

Um dos mecanismos importantes para o controle biológico de pragas e insetos é o emprego de fungos entomopatogênicos, os quais tem sido estudados por muito tempo, porém a efetivação do uso em campo ainda é escassa. Os principais requisitos que os fungos devem cumprir para que possam ser

utilizados são: a reprodução em massa, estabilidade ao longo do tempo, custo razoável e, o mais importante, ser eficientes em condições de campo. Os biofungicidas mais utilizados no mercado correspondem aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*. Além disso, são necessárias pesquisas que melhorem a compreensão da ecologia dos fungos e o papel que cumprem no ecossistema para o seu uso na agricultura (Vega et al., 2009). A maior parte delas acaba focando em uma determinada espécie em particular que protege as plantas frente ao ataque das pragas.

No entanto, o uso de organismos em um consórcio coexistente nos tecidos internos das plantas está começando a ser uma área de grande interesse, pois proporcionam níveis mais elevados de resistência contra pragas e doenças. Pesquisas desenvolvidas em plantações de bananas demonstram que consórcios de fungos agem positivamente na supressão de nematódeos, tendo efeito favorável na saúde da planta (Backman; Sikora, 2008). Nesse sentido, a pesquisa apresentada é muito importante dado que mostra a diversidade de espécies interagindo nas folhas de café.

O Manejo Integrado de pragas através de fungos e outros microrganismos, possui um papel fundamental no controle de pragas e doenças, cujo objetivo é o uso racional de controladores químicos e a preservação do meio ambiente. Pode ser definido como: a utilização de medidas de controle sejam biológicas, químicas e da própria cultura com a finalidade de evitar perdas econômicas e permitir a produção de café de forma competitiva sem causar efeitos deletérios aos cafeicultores, aos moradores e ao ecossistema no seu conjunto (Bustillo, 2005).

Segundo Bustillo (1995), a Colômbia é um dos países que merecem maior destaque com relação ao manejo do ecossistema cafeeiro, preservando os recursos naturais e mantendo o equilíbrio ecológico através do uso de agrotóxico de forma racional. Doenças e pragas que representam um grande problema para os cafeicultores em outros países não chegaram a se tornar uma preocupação séria no país, devido à estabilidade do ecossistema e sua elevada biodiversidade, beneficiando assim o desenvolvimento de espécies favoráveis e contribuindo para o equilíbrio entre as espécies. Cabe destacar que a Colômbia

é o único país que até a chegada da broca do café manejou as lavouras com muito pouco ou nenhum agrotóxico.

Um exemplo bem sucedido que pode ser citado é o trabalho realizado na Colômbia, pelo *Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé* com relação ao fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, que como foi mencionado no Capítulo I é um importante biocontrolador da broca do café, o inseto considerado a maior praga do cultivo. Eles desenvolveram, um Programa Integral de Manejo de Pragas que inclui recomendações para o monitoramento do controle biológico e do manejo da cultura, com a finalidade de preservar o meio ambiente e uso racional de fungicidas sintéticos.

Em relação ao controle biológico, as pesquisas incluíam além da produção industrial, a produção do fungo em nível artesanal com o objetivo de ajudar aos cafeicultores a produzi-lo na própria fazenda através de uma metodologia simples e de baixo custo. O Cenicafé em parceria com o *Servicio de Extención de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia* tem treinado mais de 20.000 agricultores que estão produzindo *B. bassiana* eficientemente (Bustillo, 2005). Por outro lado, um programa relacionado a técnicas da própria cultura para o controle da broca do café deu ênfase na colheita frequente e efetiva, conforme uma pesquisa realizada também na Colômbia. Os resultados mostraram que treinar trabalhadores para manter alta eficiência na colheita (fase importante para evitar focos de infecção da broca de café), permite uma diminuição considerável das taxas de infestação do inseto e conseqüentemente uma produção de café de qualidade exportável (Aristizábal et al., 2011).

#### **4. IMPORTÂNCIA DA FLORESTA E DAS APPS DA UHE DE CACONDE**

Muitos agricultores tradicionais e ambientalistas afirmam a ideia popular que o mundo natural oferece serviços que contribuem à estabilidade, produtividade e sustentabilidade da agricultura. Por outro lado, os opositores desta ideia argumentam que esta visão pode ser considerada até perigosa, porque se coloca no caminho do progresso tecnológico que tem fornecido o mundo com alimento abundante para os últimos 60 anos e que a fazenda não é um ambiente para ser conduzido por ambientalistas românticos e sim um campo

de batalha onde os inimigos da produção, frequentemente insetos, pragas e patógenos das plantas, devem ser vencidos (Vandermeer et al., 2010).

É através de investigação teórica e empírica que se pode constatar que os sistemas ecológicos geram serviços ecossistêmicos como resultado de componentes de interação complexos, entre os quais podem ser citados a polinização, regulação do clima, controle da erosão, sequestro de carbono, ciclagem de nutrientes e controle de pragas, entre outros (Vandermeer et al., 2010).

#### 4.1 Importância das Agroflorestas e do Café sombreado

A produção de café sombreado tem sido valorada cada vez mais pelas comunidades públicas e científicas devido à contribuição à conservação da biodiversidade e na provisão de serviços ecossistêmicos. De acordo com a pesquisa realizada por Jha et al. (2014), a sombra produz efeitos positivos em 58% dos estudos de polinização, 60% dos estudos relacionados ao controle de pragas, 93% dos estudos de ciclagem de nutrientes e em 100% dos estudos de regulação do clima.

Em relação ao controle de pragas, um serviço crítico na produção de café, muitos organismos ajudam a desempenhar essa função em fazendas sombreadas, como é o caso de formigas e aranhas que reduzem os danos causados pelo bicho mineiro *Leucoptera coffeella* Guer. (De la Mora et al., 2008) e pela broca do café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Perfecto; Vandermeer 2006). Da mesma forma, aves atraídas por árvores de sombra ajudam a controlar a abundância de insetos que danificam as folhas de café (Johnson et al., 2009).

De acordo com Vandermeer et al. (2010), em sistemas de café orgânicos múltiplas interações entre diferentes espécies resultam na regulação dinâmica de potenciais pragas. Um trabalho de dez anos em uma fazenda orgânica no México que envolve pelo menos 13 componentes (insetos e fungos), seis processos ecológicos (competição, predação, o parasitismo, hiperparasitismo, doenças, mutualismo) e o papel da dinâmica espacial, sugere um controle de pragas autônomo através de uma rede ecológica que favorece a produção de café, evitando surtos extremos de doenças e pragas.

Por outro lado, as Áreas de Proteção Permanente – APPs e o café sombreado tem sido bem estudado ao longo das últimas décadas, pois ajudam a conectar habitats fragmentados dentro de um mosaico da paisagem. Portanto, é um componente na criação de matrizes de alta qualidade neste tipo de habitats, contribuindo para a conservação da biodiversidade (Philpott et al., 2008; Clough et al., 2011). Aves migratórias, polinizadores e outras espécies utilizam o café sombreado como corredor para se movimentar em regiões tropicais e temperadas. Cabe destacar que os polinizadores são muito importantes durante a floração da cultura e são capazes de manter a reprodução e o processo de fluxo genético (Jha; Dick, 2010). De acordo com Vandermeer et al. (2010), uma variedade de espécies encontra refúgio nas fazendas de café sombreadas e as vezes níveis de diversidade se aproximam ao de florestas naturais. Por outro lado, De Beenhouwer et al. (2013) afirmam que os serviços ecossistêmicos tendem a diminuir na medida que as florestas se convertem em sistemas de café rustico e este se converte em sistemas de café sombreado.

Na América Latina, até 1970, a maior parte do café era produzido em sistemas sombreados diversificados, cujas principais características eram o baixo impacto ecológico e a baixa produtividade (Jaramillo-Botero et al., 2006). Posteriormente, inovações tecnológicas começaram a ser introduzidas com a intenção de intensificar a agricultura e melhorar a produtividade. Vários métodos fitossanatórios duvidosos, como a redução da cobertura de sombra e o plantio de variedades resistentes de café altamente dependentes de fertilizantes minerais, foram encorajados por toda a região (Vandermeer et al., 2010; Perfecto et al., 1996). Na medida em que o manejo da vegetação se intensifica, as plantações de café diminuem o número e as espécies de árvores de sombra. Essa intensificação no manejo usualmente tem vindo acompanhada de um aumento no uso de controladores químicos (Jha et al., 2014), cujos danos ao meio ambiente e à saúde dos produtores pelo uso indiscriminado tem sido bastante documentada.

Embora essas medidas tenham sido realizadas também para reduzir doenças, as pesquisas tem demonstrado que a dinâmica das mesmas não depende da redução de árvores de sombra e sim da doença específica, condições ambientais como umidade, altitude, temperatura, fertilização e tipo do

manejo (Jha et al., 2014). De fato, sombra moderada, entre 35% - 65%, pode reduzir a incidência de algumas doenças, como a mancha-de-olho-pardo (*Cercospora coffeicola*) (Staver et al. 2001). Da mesma forma, de acordo como Soto-Pinto et al. (2000) um gradiente contínuo de sombra entre 35% e 50% produzem um rendimento mais elevado do café, provavelmente porque são mantidos o equilíbrio entre temperaturas ótimas e taxas fotossintéticas adequadas em ambientes sombreados. Cabe ressaltar a dificuldade de comparar os resultados entre as diferentes pesquisas devido as diferenças geográficas e as condições ambientais. Portanto, uma maior quantidade de pesquisas são necessárias para projetar sistemas agroflorestais que otimizem tanto a riqueza de espécies quanto o rendimento agrícola (Clough et al., 2011).

Nos últimos anos, tem se observado uma tendência de juntar a agricultura amigável com a vida silvestre “*wildlife-friendly*”, combinando a agricultura altamente diversificada com a preservação da natureza. De acordo com Clough et al. (2011), sistemas agroflorestais podem ser desenhados para otimizar benefícios tanto para produção quanto para a biodiversidade, sem adicionar pressão na conversão de habitats naturais para terras agrícolas. Essa afirmação surge a partir da pesquisa realizada em sistemas agroflorestais de cacau na Indonésia, onde a riqueza de espécies de árvores, fungos endófitos, invertebrados e vertebrados não diminui com o rendimento. Sugerindo assim que a sombra moderada e mão de obra adequada podem-se combinar com uma estrutura de habitat complexa para fornecer altos rendimentos e favorecer a biodiversidade local.

Entre outros benéficos, o sombreamento dos cafeeiros permite a produção em regiões com déficit hídrico ou com geadas, reduz os custos de produção e diversifica a produção (Jaramillo-Botero, 2006). Além disso, níveis moderados de sombra podem dificultar a ocorrência de doenças fúngicas através da criação de barreiras contra o vento e da redução da propagação horizontal das esporas (Soto-Pinto et al., 2002). Por outro lado, em regiões cujas condições de cultivo não são as mais adequadas e estão afetadas por altas temperaturas, a sombra pode trazer condições ambientais que se aproximem a níveis ideais (Muschler, 2001). Finalmente, em relação a qualidade do café, em seus estudos,

Bosselmann et al. (2009), relataram que existe um efeito positivo da sombra no grão e a qualidade da bebida a uma altura menor que 500 metros.

De acordo com Jha et al. (2014), de 19 países produtores em 2010, aproximadamente 41% da superfície do café é manejada sem sombra, 35% com sombra escassa e unicamente 24% com sombra diversa tradicional. O café cultivado a pleno sol está dominando muitas regiões novas de cultivos de café como é o caso do Vietnã, da Tailândia e da Indonésia. Contrariamente, só alguns poucos países como a Colômbia, o Haiti e a Índia continuam com o manejo da sombra diversificada na maior parte das suas regiões produtoras. Se a remoção do sombreamento persistir, a perda de muitas espécies de interesse para conservação e funcionamento do ecossistema de paisagens agrícolas é inevitável (Clough et al., 2011).

#### 4.2 Importância da Proximidade das APPs

Além do especial interesse nos sistemas agroflorestais e no café com sombra é muito importante considerar a conservação de florestas em combinação com as paisagens agrícolas. Nesse sentido, as Áreas de Preservação Permanente – APPs, tem um papel fundamental.

As APPs limítrofes a cursos de água formam corredores ecológicos ao longo da paisagem. Portanto, podem contribuir para a conectividade entre fragmentos de vegetação e para o aumento da biodiversidade da paisagem (Braga, 2011). Igualmente, as florestas as margens dos reservatórios, também conhecidas como matas ciliares, asseguram os recursos hídricos, pois atuam como reguladoras do regime hídrico devido à retenção da água de chuva, regulação do escoamento superficial da água, aumento do tempo de infiltração no lençol freático e conseqüentemente o aumento da capacidade de carga dos aquíferos. Igualmente, atuam como proteção estrutural de habitats, abrigo e sombra para a fauna, manutenção da qualidade da água e do ar, regulação climática, fixação de carbono, ciclagem de nutrientes, evitam a erosão do solo e propiciam o fluxo gênico, entre outros serviços ecossistêmicos oferecidos pelas APPs (Metzger, 2010) (Martins, 2005) (Neiva, 2009).

Existem também outros benefícios diretos para as lavouras, as APPs desempenham também a função de barreiras quebra-ventos nas áreas de

cultivos, que impedem o ingresso de ventos fortes e frios. A instalação dos nos mesmos é necessária em cafezais onde há exposição às frentes frias e é também uma medida preventiva para evitar o ingresso ou minimizar a disseminação de fungos patógenos nas plantações. Igualmente, as APPs geram sítios de alimentação e reprodução para os inimigos naturais de pragas e fornecem refúgio para insetos polinizadores de culturas (Gonçalves, 2009).

É importante destacar que as APPs não são um obstáculo para a produção agrícola. No Brasil a dicotomia entre a produção de alimentos e a preservação da vegetação na realidade é inexistente, as maiores entraves para a produção não se devem as restrições do Código Florestal, mas, sim à desigualdade na distribuição de terras, restrições de créditos ao agricultor que produz alimentos de consumo direto, ausência de assistência técnica, falta de investimento em infraestrutura, entre outros (Martinelli et al., 2010). Pelo contrário, de acordo com Scardua (2008), as APPs garantem a saúde da propriedade rural e trazem maior equilíbrio ecológico em áreas de cultivo por todos os serviços ecossistêmicos que fornecem. Além disso, contribuem à produção sustentável a longo prazo no campo e com uma produção agrícola sustentável, assegura-se a qualidade ambiental e o bem-estar das populações (Gonçalves, 2008).

A presente pesquisa, teve entre os objetivos conhecer se a Área de Preservação Permanente circundante à fazenda São Luis, teve algum efeito na diversidade de fungos em folhas de café arábica, devido a que recentes pesquisas afirmam que a proximidade a floresta em áreas agrícolas tem efeitos na diversidade de diferentes grupos taxonômicos e no rendimento das lavouras.

Clough et al. (2011) estudaram se distância da floresta natural altera a relação entre a biodiversidade e o rendimento. Os resultados mostram que conservar florestas primárias perto de paisagens agrícolas deve ser uma prioridade, pois vários grupos registrados em agroflorestas tem maior riqueza de espécies perto da floresta, enfatizando a importância da conservação de habitats naturais. Por outro lado, a riqueza de espécies de árvores, fungos, invertebrados e vertebrados não diminui com o rendimento e até evidenciou-se que a distância à floresta teve um efeito positivo marginalmente significativo no rendimento.

Johnson et al. (2009), afirmaram que a proximidade com manchas de habitat natural além de atrair pássaros que se alimentam de insetos que causam danos às folhas de café, favorecendo o controle deste tipo de pragas, também foi associado com a prevalência de sintomas fúngicos foliares, ou seja, uma maior complexidade vegetativa correlacionou-se debilmente com o aumento de doenças fúngicas. O Resultado se mostra contrário aos dados da pesquisa apresentada no Capítulo II, pois a diversidade de fungos na área de estudo não mostrou diferenças em relação à distância da floresta, mostrando uma diversidade homogênea deste grupo no interior da fazenda de café arábica, que por sua vez, pode estar correlacionado com o uso de fungicidas e as condições ambientais.

Concluindo, os ecossistemas agrícolas devem ser vistos de maneira holística, compreendo a complexidade ecológica que os agricultores tradicionais intuitivamente compreendiam desde o começo (Vandermeer et al., 2010). Até agora as pesquisas em sistemas de café tem permitido um melhor entendimento das relações entre os serviços ecossistêmicos, biodiversidade, conectividade e manejo agrícola. No entanto, devido à importância sócio-econômica do grão e os benefícios ecológicos das APPs e do café sombreado, inúmeros desafios para futuras pesquisas são necessários para vincular o manejo sustentável do café com os meios de vida sustentáveis (Jha et al., 2014). Igualmente, a manutenção de APPs nas bordas dos reservatórios de forma integrada com paisagens agrícolas deve ser uma prioridade. Os serviços ecossistêmicos oferecidos pelas APPs da UHE de Caconde devem ser considerados de enorme importância sócio econômica regional, e utilizados em programas de educação ambiental buscando o envolvimento dos proprietários rurais que vivem as margens do reservatório. Com isso espera-se que eles assumam o papel de verdadeiros guardiões dessas florestas.

## **5. COMO NOVAS TECNOLOGIAS PODEM AJUDAR A SOCIO-ECONOMIA DO ENTORNO DA UHE DE CACONDE?**

Para saber se as tecnologias de biologia molecular podem ajudar o produtor rural, o primeiro passo é saber quais são e como vem evoluindo nos últimos anos no estudo de microrganismos. Para entendê-las é preciso falar de uma nova ciência denominada metagenômica.

A metagenômica é uma ferramenta que permite a identificação de seqüências extraídas de uma determinada amostra que contém uma comunidade microbiana (Figura 23). No presente estudo, buscou-se conhecer a diversidade fúngica que habita as folhas de café arábica na Fazenda São Luis, situada no município de Caconde – SP. Nesse sentido, seria muito difícil isolar cada um dos fungos e cultivá-los em condições de laboratório, além do que existem espécies que não podem ser cultivadas, portanto não poderíamos representar a diversidade total presente nas folhas.

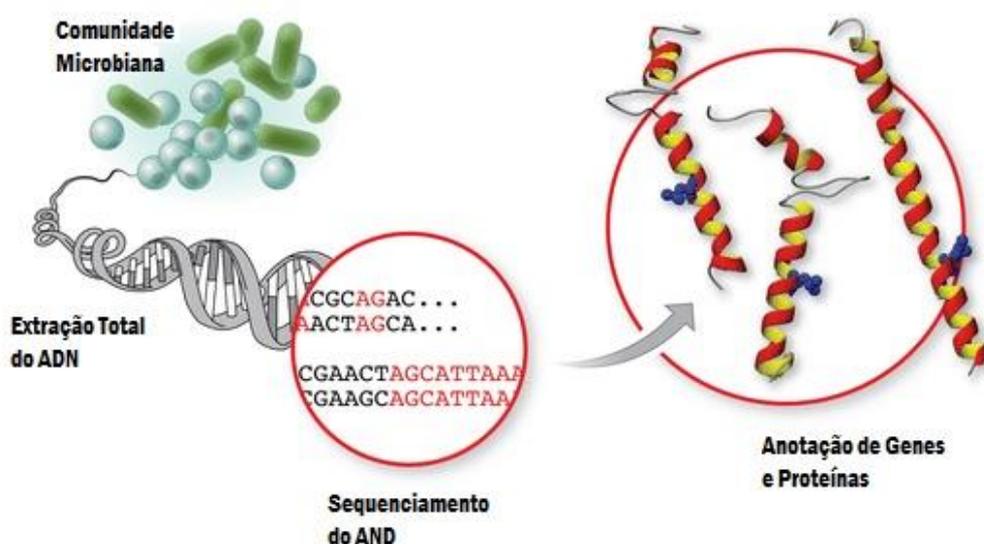


Figura 23 Visão geral da metagenômica. 1) Extração total de DNA do habitat; 2) Sequenciamento do DNA; 3) Anotação de genes e proteínas nos bancos de dados públicos.

Fonte: Adaptado de Gilbert e Dupont (2011).

No entanto, surge os seguintes questionamentos: como é feita a leitura do ADN extraído da amostra? Qual é o custo para saber que espécies de fungos estão presentes nas folhas do café? A resposta à primeira pergunta é através de plataformas de sequenciamento. Como já foi mencionado anteriormente, as tecnologias de sequenciamento são muito úteis para o estudo de microrganismos, além de serem mais rápidas, os resultados podem mostrar quase que a totalidade de espécies interagindo numa determinada amostra. As técnicas baseadas no cultivo, vem sendo substituídas por técnicas de biologia molecular porque, além delas mostrarem resultados questionáveis em relação à classificação das espécies, não refletem o total da biodiversidade já que existem muitas espécies de fungos não cultiváveis.

Em relação à segunda pergunta, nos últimos quinze anos as tecnologias de sequenciamento tem evoluído velozmente, criando-se novas plataformas de sequenciamento, denominadas tecnologias de nova geração, cuja aparição começou em 2005 e que estão sendo melhoradas constantemente. Entre as principais e mais utilizadas na pesquisa, encontra-se o Sequenciamento 454 da Roche, cuja principal característica é gerar uma grande quantidade de informação economizando tempo e custo por base sequenciada (Carvalho; Silva, 2010). Cabe ressaltar que o custo foi diminuindo consideravelmente ao longo do tempo, de um valor aproximado de 1.100 dólares no ano 2001 para 0,14 dólares por megabase de DNA sequenciada na atualidade (Figura 24) (National Human Research Institute, 2016), tornando a sua utilização viável, tanto no meio da pesquisa quanto no mundo da prática.

Portanto, utilizando a metagenômica como ferramenta, o produtor consegue saber com um maior nível de segurança quais são as espécies que estão interagindo na lavoura e em que quantidade. Nesse sentido, pode-se saber se existem espécies potencialmente daninhas que podem afetar severamente a produção com antecedência, ou seja, antes do patógeno manifestar sintomas da doença. Portanto, pode ser utilizada para diminuir o uso de controladores químicos nas lavouras, pois grande parte deles são aplicados de maneira preventiva, no caso de doenças que uma vez estabelecidas (nas folhas), não possam ser controladas por fungicidas.

Por exemplo, como dito anteriormente, algumas espécies do gênero *Phoma* causam a perigosa doença da mancha-da-phoma, cujo controle é feito de maneira preventiva através de fungicidas sintéticos, principalmente aqueles à base de cobre, entre os meses novembro e dezembro. No entanto, alguns especialistas recomendam o uso no período pré e pós florada, de agosto a setembro, pois a doença pode encontrar condições favoráveis para se desenvolver nessa época do ano (EMBRAPA, 2016; EPAMIG, 2016).

Consequentemente, de acordo com Chalfoun et al. (2007), existe a preocupação com a seletividade dos produtos químicos empregados para o controle de fungos, pois os fungicidas podem afetar também a organismos benéficos à planta. Dessa forma, realizar o sequenciamento das espécies que estão presentes nas folhas, pode mostrar com antecedência a presença do

patógeno na lavoura e até o nível de gravidade da infecção que ele pode vir a provocar. Assim, se a espécie não se encontra nas folhas isso se traduz num custo monetário economizado para o produtor, dado que não precisa comprar o agrotóxico, além de menores riscos para a saúde do produtor, dos consumidores e do meio ambiente.

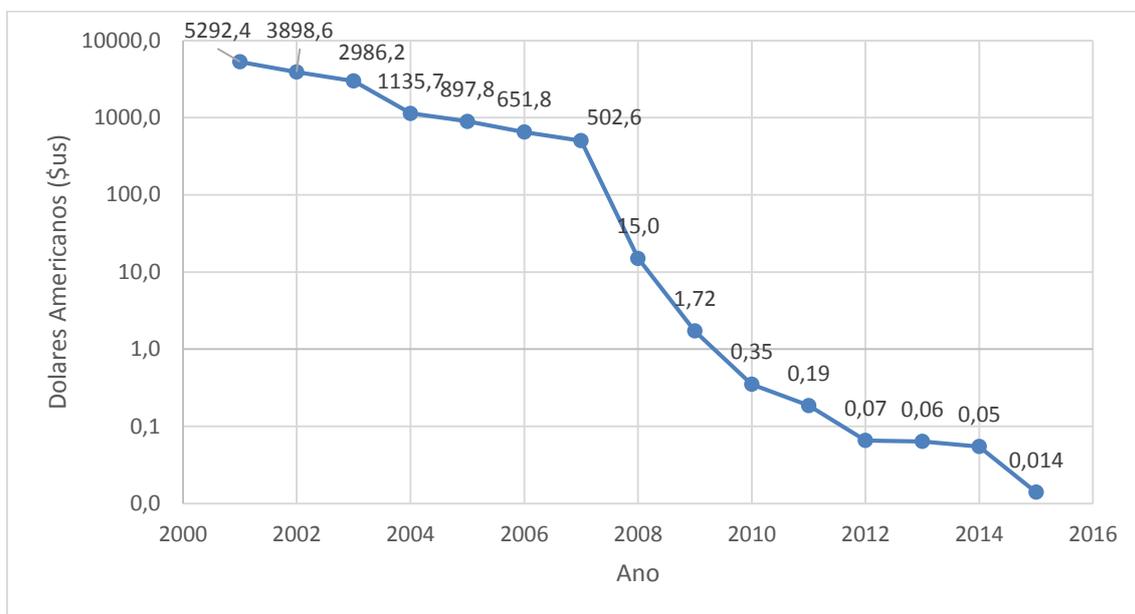


Figura 24 Custo por megabase de DNA sequenciado. Fonte: National Human Genome Research Institute, 2016.

\*Valores convertidos em escala logarítmica base 10 para uma melhor visualização dos dados.

## 6. CONCLUSÕES

No presente capítulo, foram apresentados os resultados da diversidade de fungos interagindo em folhas de café arábica na Fazenda São Luis, registrando uma grande riqueza e abundância, com 320 espécies de fungos distribuídas em 143 gêneros. Encontrar essa quantidade de espécies foi possível graças a técnicas moleculares que o Sequenciamento 454 fornece. Da mesma forma, foi avaliada a relação entre a diversidade de fungos e a distância da floresta. Os resultados não apresentaram uma diferença significativa, identificando-se uma diversidade homogênea em toda a fazenda. Isso pode ser atribuído aos fungicidas sintéticos, que de acordo com algumas pesquisas, produzem mudanças nas atividades microbianas que poderiam explicar a existência de uma grande parte da microfauna. Por outro lado, uma grande

quantidade de pesquisas afirma que as condições ambientais tem uma implicância direta na diversidade de fungos.

Foi apresentada também uma descrição das espécies mais abundantes nos pontos de coleta, evidenciando que tanto espécies com características patogênicas quanto espécies com implicações positivas para a planta estão interagindo na superfície foliar. Isso demonstra a importância de se estudar consórcios microbianos para se ter uma melhor compreensão da ecologia dos fungos e de suas funções, assim como ajudar o produtor rural no manejo mais eficiente e sustentável da lavoura.

Mostrou-se também os impactos de fungicidas sintéticos, especialmente de fungicidas cúpricos, no meio ambiente, na saúde da planta, na saúde humana e nos microrganismos, dado que atuam nas vias metabólicas dos insetos e pragas que se deseja controlar. Não obstante, muitas daquelas vias são comuns em outros organismos e conseqüentemente espécies não alvo podem ser afetadas, eliminando assim, a microfauna benéfica e provocando desequilíbrios ecológicos. Portanto, deve-se dar prioridade melhores práticas agrícolas como o manejo integrado de pragas, utilizando organismos biocontroladores de pragas, como fungos entomopatógenos, e minimizando o uso de agroquímicos, utilizando-os unicamente quando for necessário e em quantidades estabelecidas.

Nesse sentido, pesquisas realizadas apontam que os sistemas agroflorestais e as APPs (Áreas de Preservação Permanente) envolvem múltiplas interações entre organismos cujo resultado é a regulação dinâmica de potenciais pragas, sugerindo o serviço ecossistêmico de um controle de pragas autônomo, beneficiando assim a produção de café no entorno da UHE de Caconde. Além disso, APPs e níveis moderados de sombra podem dificultar a ocorrência de doenças fúngicas através da criação de barreiras contra o vento. Da mesma forma, a produção agrícola sombreada e associada a manutenção de florestas nas bordas dos reservatórios deve ser cada vez mais valorizada por sua contribuição na conservação biodiversidade e na provisão de este e outros serviços ecossistêmicos, como: a polinização, a ciclagem de nutrientes e a regulação do clima.

Apesar da redução significativa da vegetação nativa e árvores de sombra em cultivos de café nas últimas décadas (sob o argumento de que este tipo de sistemas reduz o rendimento das lavouras). Estudos recentes demonstram que níveis de sombra apropriados, aliados a mão de obra qualificada, podem se combinar com uma estrutura de habitat complexa a fim de aumentar o rendimento da cultura e favorecer a biodiversidade local.

Os resultados desse estudo corroboram a importância dos programas de restauração e da manutenção de Áreas de Preservação Permanente nas bordas dos reservatórios, sempre de forma integrada com paisagens agrícolas rurais, uma vez que vários grupos de fungos registrados têm maior riqueza de espécies perto da floresta, enfatizando a importância da conservação de habitats naturais para sustentabilidade das plantações de café na região. Os serviços ecossistêmicos oferecidos pelas APPs do UHE de Caconde devem ser considerados de enorme importância sócio econômica regional, e utilizados em programas de educação ambiental buscando o envolvimento dos proprietários rurais que vivem as margens do reservatório. Com isso esperamos que esses proprietários assumam cada vez mais o papel de guardiões dessas florestas as margens dos reservatórios. A disseminação dessas informações nas associações de produtores e cooperativas locais podem ainda aumentar a adoção de proprietários na implantação de APPs as margens dos reservatórios.

Finalmente, as técnicas moleculares para a identificação de microrganismos estão cada vez são mais acessíveis aos produtores rurais e para serem empregadas na prática, pois os custos com o sequenciamento vem diminuindo consideravelmente nos últimos dez anos. Conhecer as espécies de fungos presentes na lavoura pode ser muito útil para identificar potenciais pragas ou evitar custos desnecessários com a aplicação de agrotóxicos.

## REFERÊNCIAS

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC. Evolução do consumo interno de café. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#tabconsin2015.2>>. Acesso em: 05 fev. 2016

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. Estatísticas. Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 10 set. 2016.

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. **Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, 2002.

AGRIOS, G. B. **Plant pathology**. 4ed. San Diego: Academic Press, 635p. 1998.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th. Ed. Elsevier Academic Press, London, pp: 952. 2004.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 23 abr. 2016.

AHMAD, J. S.; BAKER, R. **Rhizosphere competence of Trichoderma harzianum**. Phytopathology, v. 77, n. 2, p. 182-189, 1987.

ALAOUI-SOSSÉ, B. et al. **Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents**. Plant Science, v. 166, n. 5, p. 1213-1218, 2004.

ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B. **Estudo de novos produtos para controle químico a *Phoma* spp. em cafeeiros, a nível de campo**. Em: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 15. 1989, Maringá, Anais. 1989. p.145-146. 1989.

ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo**. Tese de Mestrado - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1996.

ALVES, H. M. et al. **Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, vol. 32, no 261, p. 18-29. 2011.

AMPOFO, J. A.; TETTEH, W.; BELLO, M. **Impact of commonly used agrochemicals on bacterial diversity in cultivated soils**. Indian journal of microbiology, v. 49, n. 3, p. 223-229, 2009.

ANDREMONT, A. **The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents**. American Journal of Infection Control, Saint Louis, v.29, n.4, p.256-25. 2001

APS - The American Phytopathological Society. 2011. **Coffee rust (*Hemileia vastatrix*)**. Disponível em <  
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

APTA - AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS. **Ciência Agropecuária Paulista Pesquisa e inovação gerando produtividade e qualidade de vida**. Governo do Estado de São Paulo - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. 2014.

ARISTIZÁBAL, L. F. et al. **Monitoring cultural practices for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) management in a small coffee farm in Colombia**. Florida Entomologist, v. 94, n. 3, p. 685-687, 2011.

ARISTIZÁBAL, L. F.; LARA, O.; ARTHURS, S. P. **Implementing an integrated pest management program for coffee berry borer in a specialty coffee plantation in Colombia**. Journal of Integrated Pest Management, v. 3, n. 1, p. G1-G5, 2012.

ARNOLD, A. E. **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers**. Fungal biology reviews, v. 21, n. 2, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, A. E.; HERRE, E. A. **Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae)**. Mycologia, v. 95, n. 3, p. 388-398, 2003.

ARNOLD, A. E.; LEWIS, L. C. Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects. **Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution**. Oxford University Press, New York, p. 74-96, 2005.

AVELINO, J. et al. **The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions**. Food Security, v. 7, n. 2, p. 303-321, 2015.

AZEVEDO, J. L. et al. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 233-268, 2002.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.

BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. **Endophytes: an emerging tool for biological control**. Biological control, v. 46, n. 1, p. 1-3, 2008.

BANDEIRA, Fábio P. et al. **The role of rustic coffee plantations in the conservation of wild tree diversity in the Chinantec region of Mexico**. Biodiversity & Conservation, v. 14, n. 5, p. 1225-1240, 2005.

- BANKS, John E. et al. **Effects of seasonality and farm proximity to forest on Hymenoptera in Tarrazú coffee farms**. International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management, v. 10, n. 2, p. 128-132, 2014.
- BARGUIL, Beatriz M., et al. **Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on Phoma costarricensis of coffee plants**. Fitopatologia brasileira, 2005, vol. 30, no 5, p. 535-537.
- BENAVIDES M. P. et al. **Biogeografía y aspectos genéticos de la Broca del café Hypothenemus hampei. Manejo da Broca-do-café**. Anais. In: Workshop Internacional de Manejo da Broca-de-Café. Londrina (Brasil). 2004.
- BENSCH, K. et al. **Species and ecological diversity within the Cladosporium cladosporioides complex (Davidiellaceae, Capnodiales)**. Studies in Mycology, v. 67, p. 1-94, 2010.
- BERBEGAL, M.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.. **Evaluation of fungicides to control circular leaf spot of persimmon caused by Mycosphaerella nawae**. Crop Protection, v. 30, n. 11, p. 1461-1468, 2011.
- BERGAMIN, J. **Contribuição para o conhecimento da biologia da broca do café "Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867)"(Col. Ipidae)**. Arq. Inst. Biol, v. 14, p. 31-72, 1943.
- BOMBARDI, L. M. **Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado**. Boletim DATALUTA, 2011.
- BOOTH, C. **The genus Fusarium**. Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- BOSELDMANN, A. S. et al. **The influence of shade trees on coffee quality in small holder coffee agroforestry systems in Southern Colombia**. Agriculture, ecosystems & environment, v. 129, n. 1, p. 253-260, 2009.
- BRAGA, Vivian Diniz. **O papel dos espaços protegidos privados para a conservação da biodiversidade**. Brasília: Universidade de Brasília, 2011.
- BRAUN, U. **A monograph of the Erysiphales (powdery mildews)**. Beihefte zur Nova Hedwigia, n. 89, 1987.
- BRUN, E. et al. **An energy and mass model of snow cover suitable for operational avalanche forecasting**. Journal of Glaciology, v. 35, n. 121, p. 333-342, 1989.
- BUEE, Marc et al. **454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity**. New Phytologist, v. 184, n. 2, p. 449-456, 2009.

BUITRAGO-JARAMILLO, H., FERNÁNDEZ-BORRERO, O. **Esporulación “in vitro” de *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke.** *Cenicafé*, Colômbia, v.33, p. 3-14, 1982.

BUSTILLO, A. E. **El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae).** *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 29, p. 55-68, 2005.

BUSTILLO, A. E. **El uso del hongo *Beauveria bassiana* como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei*.** XXII Congreso de Socolen, Memorias, Santafé de Bogotá. 1995.

BUSTILLO, A. E. et al. **Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries.** *Florida Entomologist*, p. 491-498, 1999.

BUSTILLO, A. E. et al. **Manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia.** 1998.

CALDEROLI, P. A. **Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos.** 2016. Tese de Doutorado. Facultad de Ciencias Exactas.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil.** Programa de defesa ambiental rural, v. 1, p. 7-26, 2003.

CANJURA-SARAVIA, E. M. et al. **Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*.** *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, v. 66, n. 13-19, p. 274, 2002.

CARNEIRO, A. A. et al. **Genotyping Isolates of *Beauveria* spp. by rDNA- ITS Sequencing and RAPD Markers.** In: Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 2.; SIMPÓSIO SOBRE COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA, 1., 2006, Belo Horizonte. Inovação para sistemas integrados de produção: trabalhos apresentados. [Sete Lagoas]: ABMS. 2006

CARROLL, G. **Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont.** *Ecology*, p. 2-9, 1988.

CARVALHO, A. **Histórico do desenvolvimento do cultivo do café no Brasil.** Campinas: Instituto Agrônomo, 2007.

CARVALHO, C. R. et al. **Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*.** *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. e26387, 2011.

CARVALHO, M.; SILVA, D. **Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas**. *Ciência Rural*, p. 735-744, 2010.

CARVALHO, V. ; CHALFOUN, S. M. **Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro**. *Informe Agropecuário*, v. 19, n. 193, p. 27-35, 1998.

CARVALHO, V. D; CHALFOUN, S. M. **Aspectos qualitativos do café**. *Informe agropecuário*, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.

CASTAÑO, J. J. **Mancha de hierro del cafeto**. *Cenicafé*, v.7, p.313-27, 1956.

CASTELLANOS, G. et al. *Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol*. **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**, 232 p. 2011.

CAVERO, P. A. S. et al. **Biological control of banana black Sigatoka disease with Trichoderma**. *Ciência Rural*, v. 45, n. 6, p. 951-957, 2015.

CEDRSSA – CENTRO DE ESTUDIOS PARA EL DESARROLLO RURAL SUSTENTABLE Y SOBERANIA ALIMENTARIA. **Producción y mercado de café en el mundo y en México**. 2014.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (Cepea/Esalq-USP). **Dimensionamento do PIB do agronegócio do Estado de São Paulo**. Relatório Final. 2014.

CHALFOUN, SMS. **O café (Coffea arabica L.) na Região Sul de Minas Gerais-relação da qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1996. 171p. 1996. Tese de Doutorado. Tese-Doutorado em Fitotecnia.

CHALFOUN, S. M et al. **Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo Cladosporium cladosporioides em cafeeiro**. *Summa Phytopathol*, v. 33, p. 93-95, 2007.

CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, VL de. **Complexo seca-de-ponteiros em cafeeiros**. *NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA*. Manejo fitossanitário da cultura do cafeeiro. Lavras: UFLA, p. 95-104, 2008.

CHALFOUN, S.M. et al. **Antifungal potential of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries metabolites in reduction of coffee contamination by toxigenic *Aspergillus* genera**. *BioMicroWorld*, Lisboa, n.259, Dec. 2009.

CHALFOUN, S. M. **Biological control and bioactive microbial metabolites: a coffee quality perspective**. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 5, p. 1071-1085, 2010.

CLIMATE-DATA.ORG. Clima: <http://pt.climate-data.org/location/34826/>. Acesso em: 24 nov. 2015.

CLOUGH, Y. et al. **Combining high biodiversity with high yields in tropical agroforests**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 108, n. 20, p. 8311-8316, 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira – Café. Safra 2015 Quarto Levantamento. Monitoramento Agrícola. 2015.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

COOKE, M. C. *Cercospora coffeicola*. *Grevillea* 9:99. 1881.

CRESSEY, D. **Coffee rust regains foothold**. *Nature*, v. 493, n. 7434, p. 587, 2013.

CRIVELANTI, R. C. **Adequação Ambiental e Levantamento de Fauna em Propriedades Cafeeiras. Estudo de Caso: Fazenda Bela Vista, Altinópolis, SP**. Monografia Curso de Especialização em Gerenciamento Ambiental da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP. 2010.

CROUS, P. W. et al. **Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics**. *Studies in Mycology*, v. 50, p. 457-469, 2004.

DAVIS, A. P. et al. **An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae)**. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 152, n. 4, p. 465-512, 2006.

DAVIS, B. H. **The *Cercospora* leaf spot of rose caused by *Mycosphaerella rosicola***. *Mycologia*, v. 30, n. 3, p. 282-298, 1938.

DE BEENHOUWER, M.; AERTS, R.; HONNAY, O. **A global meta-analysis of the biodiversity and ecosystem service benefits of coffee and cacao agroforestry**. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 175, p. 1-7, 2013.

DE LA MORA, A.; LIVINGSTON, G.; PHILPOTT, S. M. **Arboreal ant abundance and leaf miner damage in coffee agroecosystems in Mexico**. *Biotropica*, v. 40, n. 6, p. 742-746, 2008.

DE SOUSA, G. **Cercosporiose nas lavouras cafeeiras**. Disponível em: <<https://3rlab.wordpress.com/2016/04/29/cercosporiose-nas-lavouras-cafeeiras/>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

DE SOUZA LEITE, T. et al. **Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques**. *Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 56-69, 2013.

DELGADO, G. **Nicaraguan fungi: a checklist of hyphomycetes**. *Mycotaxon*, v. 115, p. 534, 2011.

DESJARDINS, A. E. et al. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology**. American Phytopathological Society (APS Press), 2006.

DIAMOND, H.; COOKE, B. M. **Preliminary studies on biological control of the Fusarium ear blight complex of wheat**. Crop Protection, v. 22, n. 1, p. 99-107, 2003.

DONALD, P.F. **Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems**. Conserv. Biol. 18, 17–37. 2004

DOUANLA-MELI, C.; LANGER, E.; MOUAFO, F. T. **Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus limon**. Fungal Ecology, v. 6, n. 3, p. 212-222, 2013.

DUMANSKI, J.; PIERI, C. **Land quality indicators: research plan**. Agriculture, Ecosystems & Environment, v. 81, n. 2, p. 93-102, 2000.

ECHANDI, E. **La quema de los cafetos causada por Phoma costarricensis n. sp.** Revista de Biología Tropical, 1957, vol. 5, p. 81-102.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Cultivo de Café Orgânico. Sistemas de Produção**, 2 - 2ª Edição ISSN 1806-2830. Versão Eletrônica. Disponível em: <[https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico\\_2ed/index.htm](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico_2ed/index.htm)>. Acesso em: 15 set. 2015.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Disponível em: <[http://www.epamig.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1926](http://www.epamig.br/index.php?option=com_content&task=view&id=1926)> Acesso em: 23 abr. 2016.

FAIRTRADE FOUNDATION. **Fairtrade and Coffe**. Commodity Briefing. 2012.

FAIT, A. et al. **Prevención de los riesgos para la salud derivados del uso de plaguicidas en la agricultura**. Serie protección de la salud de los trabajadores, v. 1, 2004.

FERNÁNDEZ-BORRERO, O., CADENA-GOMÉZ, G. LÓPEZ-DUQUE, S., SERNA, H. B. de, ARANGO BERNAL, L. G. **La mancha de hierro del cafeto (*Cercospora coffeicola* Berk y Cooke), biología, epidemiología y control**, Dixieme Colloque Scientifique International Sur Le Café, Colombia, p.541-51, 1982.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. **Enzyme activities in vineyard soils long-term treated with copper-based fungicides**. Soil Biology and Biochemistry, v. 42, n. 12, p. 2119-2127, 2010.

FERREIRA, L. C. et al. **Copper oxychloride fungicide and its effect on growth and oxidative stress of potato plants**. Pesticide biochemistry and physiology, v. 112, p. 63-69, 2014.

FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, G. **Fungi as microbial insecticides against pests**. Handbook of applied mycology, v. 2, p. 665-706, 1991.

FITTER, A.H. **Darkness visible: reflections on underground ecology**. J. Ecol., 93:231-243, 2005.

FONDEVILLA, S.; RUBIALES, D. **Powdery mildew control in pea. A review**. Agronomy for sustainable development, v. 32, n. 2, p. 401-409, 2012.

FONTES, R. E. **Estudo econômico da cafeicultura no sul de Minas Gerais. 94 p.** Tese. Dissertação (Mestrado em Administração Rural)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. **Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king**. Current opinion in microbiology, v. 7, n. 3, p. 210-220, 2004.

GANGE, A. C. et al. **Site-and species-specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants**. Journal of Ecology, v. 95, n. 4, p. 614-622, 2007.

GASPAROTTO, L. et al. **Heliconia psittacorum: hospedeira de Mycosphaerella fijiensis, agente causal da Sigatoka-negra da bananeira**. Fitopatologia Brasileira, v. 30, n. 4, 2005.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; TRINDADE, D. R. **Situação atual da Sigatoka negra da bananeira**. Fitopatologia brasileira, v. 26, p. 448, 2001.

GEISER, D. M. et al. **Gibberella xylarioides (anamorph: Fusarium xylarioides), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the G. fujikuroi species complex**. Mycologia, v. 97, n. 1, p. 191-201, 2005.

GILBERT, J. A.; DUPONT, C. L. **Microbial metagenomics: beyond the genome**. Annual Review of Marine Science, v. 3, p. 347-371, 2011.

GODOY, C. V., BERGAMIN FILHO, A., SALGADO, C. L. **Doenças do cafeeiro (Coffea arabica L.)** In: KIMATI, H. et al. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, 3ed. Agronômica Cerês, v.2, p.184-200, 1997.

GONÇALVES, Marco Antonio Uberti. **O impacto da reserva legal e da área de preservação permanente sobre pequenas propriedades rurais: um estudo na agricultura ecológica de Antônio Prado/RS**. Dissertação Mestrado. Universidade Caixas do Sul, Caixas do Sul, 2008.

GORDON, C. et al. **Biodiversity, profitability, and vegetation structure in a Mexican coffee agroecosystem**. Agriculture, ecosystems & environment, v. 118, n. 1, p. 256-266, 2007.

GOUVEIA, M. C. et al. **Genetic diversity in Hemileia vastatrix based on RAPD markers**. Mycologia, v. 97, n. 2, p. 396-404, 2005.

HARMAN, G. E. et al. **Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts**. Nature reviews microbiology, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. et al. **Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts**. Nature reviews microbiology, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HIJWEGEN, T.; BUCHENAUER, H. **Isolation and identification of hyperparasitic fungi associated with Erysiphaceae**. Netherlands Journal of Plant Pathology, v. 90, n. 2, p. 79-83, 1984.

HINDORF, H.; OMONDI, C. O. **A review of three major fungal diseases of Coffea arabica L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya**. Journal of Advanced Research, v. 2, n. 2, p. 109-120, 2011.

HOCHSTEIN, N. et al. **Pyrosequencing and its applications**. QIAGEN GmbH - Sample & Assay Technologies. 2011.

ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: <[http://www.ico.org/monthly\\_coffee\\_trade\\_stats.asp](http://www.ico.org/monthly_coffee_trade_stats.asp)>. Acesso em: 4 abr. 2016.

ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: <[http://www.ico.org/new\\_historical.asp?section=Statistics](http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics)>. Acesso em: 10 dic. 2015.

ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: <[http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp)>. Acesso em: 19 de jun. 2016.

IEA – INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Área e Produção dos Principais Produtos da Agropecuária do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/bancodedados.html>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

JAMES, T. Y. et al. **Identification of Putative Coffee Rust Mycoparasites via Single-Molecule DNA Sequencing of Infected Pustules**. Applied and environmental microbiology, v. 82, n. 2, p. 631-639, 2016.

JARAMILLO-BOTERO, C.; MARTINEZ, H. E.; SANTOS, R. H. **Características do café (Coffea arabica L.) sombreado no Norte da América Latina e no Brasil: análise comparativa**. Coffee Science, v. 1, n. 2, p. 94-102, 2006.

JHA, S. et al. **Shade coffee: update on a disappearing refuge for biodiversity**. BioScience, v. 64, n. 5, p. 416-428, 2014.

JHA, S.; DICK, C.W. **Native bees mediate long-distance pollen dispersal in a shade coffee landscape mosaic**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 107, n. 31, p. 13760-13764, 2010.

JOHNSON, M. D. et al. **Effects of shade and bird exclusion on arthropods and leaf damage on coffee farms in Jamaica's Blue Mountains.** *Agroforestry Systems*, v. 76, n. 1, p. 139-148, 2009.

JOOSTEN, H. M. L. J. et al. **Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries.** *International journal of food microbiology*, v. 65, n. 1, p. 39-44, 2001.

JOSHEE, S. et al. **Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae.** *Mycological research*, v. 113, n. 9, p. 1003-1015, 2009.

JULIATTI F. C. et al. **Incidência e severidade da cercosporiose em lavoura cafeeira conduzida sob diferentes sistemas de irrigação e lâminas d'água.** In: 1\_ Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos: Embrapa Café, pp 219–222. 2000.

KARLSSON, I. et al. **Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere.** *PloS one*, v. 9, n. 11, p. e111786, 2014.

KHAN, N. I. et al. **Field testing of antagonists of *Fusarium head blight* incited by *Gibberella zeae*.** *Biological Control*, v. 29, n. 2, p. 245-255, 2004.

KISS, L. **A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents.** *Pest management science*, v. 59, n. 4, p. 475-483, 2003.

KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O. **Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para conservação,** 2003.

LAURENTINO, E. COSTA, J. N. M. **Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia.** 1. ed. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 21 p. (Embrapa

LE PELLEY, R. H. et al. **Pests of coffee,** 1968.

LEGENDRE, P.; FORTIN, M. J. **Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data.** *Molecular ecology resources*, v. 10, n. 5, p. 831-844, 2010.

LESLIE, J. F. et al. **The *Fusarium* laboratory manual.** Ames, IA, USA: Blackwell Pub., 2006.

LEWIN, B.; GIOVANNUCCI, D.; VARANGIS, P. **Coffee markets: new paradigms in global supply and demand.** World Bank Agriculture and Rural Development Discussion Paper, n. 3, 2004.

LIMA, L. M. et al. **Relação nitrogênio/potássio com mancha de *Phoma* e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva.** *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, 4, 223-228. 2010.

LIU, X. et al. **Derxomyces amylogenes sp. nov., Derxomyces bambusicola sp. nov. and Derxomyces corylopsis sp. nov., three ballistoconidium-forming yeast species isolated from subtropical plant leaves.** International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 62, n. 4, p. 996-1001, 2012.

LOLAND, J. O.; SINGH, B. R. **Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides.** Nutrient Cycling in Agroecosystems, v. 69, n. 3, p. 203-211, 2004.

LOMBARDI, A. P. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de Cercospora coffeicola.** Tese Mestrado – Universidade Estadual Paulista. 2002.

LÓPEZ-DUQUE, S.; FERNÁNDEZ-BORRERO, O. **Epidemiologia de la mancha de hierro del cafeto (Cercospora coffeicola Berk. & Cooke).** Cenicafé, v. 20, p. 3-19, 1969.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. **UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities.** Applied and environmental microbiology, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

LUDLOW, C. L. et al. **Independent origins of yeast associated with coffee and cacao fermentation.** Current Biology, v. 26, n. 7, p. 965-971, 2016.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafes>>. Acesso em: 18 de jun. de 2016.

MARCOS, M. S. **Estudio de la capacidad de biodegradación de hidrocarburos en los sedimentos marinos de la costa patagónica.** Tese Doctoral – Universidad Nacional del Sur. 2012.

MARDIS, E. R. **The impact of next-generation sequencing technology on genetics.** Trends in genetics, v. 24, n. 3, p. 133-141, 2008.

MARTINELLI, Luiz Antonio et al. **A falsa dicotomia entre a preservação da vegetação natural e a produção agropecuária.** Biota Neotropica, v. 10, n. 4, p. 323-330, 2010.

MARTINS, A. N.; SILVEIRA, A.; SILVA, R. J. **Avaliação da microbiota presente em café armazenado e recém beneficiado.** 2001.

MARTINS, M.; MENDES, A.; ALVARENGA, M. **Incidência de pragas e doenças em agroecossistemas de café orgânico de agricultores familiares em Poço Fundo, MG.** Ciência e Agrotecnologia, v. 28, n. 6, p. 1306-1313, 2004.

MARTINS, Sueli Sato. **Recomposição de matas ciliares no Estado do Paraná.** 2. ed. rev. e atual. Clichetec, Maringá, 2005.

MARTINS, R. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. **Genetic variability of *Cercospora coffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility.** *Phytopathology*, v. 98, n. 11, p. 1205-1211, 2008.

MARTINS, G. et al. **Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations.** *PloS one*, v. 8, n. 8, p. e73013, 2013.

MATIELLO, J.B; ALMEIDA, S.R. **Fusariose – Uma doença pouco conhecida em cafeeiros.** Fundação Procafé. Disponível em: <<http://www.fundacaoprocafe.com.br/sites/default/files/publicacoes/pdf/folhas/Folha96Fusariose.pdf>>. Acesso em: 25 de abr. de 2016.

MCSWEENEY, C.; MACKIE, R. **Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects.** Background study paper, n. 61, 2012.

MELO, L. F. **Agroecologia e nutrição no combate a produção e consumo de agrotóxicos e na promoção de hábitos alimentares mais saudáveis.** *Revista Lugares de Educação*, v. 6, n. 12, p. 125-138, 2016.

METZGER, J. P. **O Código Florestal tem base científica?** *Conservação e Natureza*, v.8, n.1, 2010.

MIOTTO, A. et al. **Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil.** *Plant and Soil*, v. 374, n. 1-2, p. 593-610, 2014.

MONDAL, S. N.; TIMMER, L. W. **Environmental factors affecting pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*, the cause of citrus greasy spot.** *Phytopathology*, v. 92, n. 12, p. 1267-1275, 2002.

MONTEL, E.; BRIDGE, P. D.; SUTTON, B. C. **An integrated approach to *Phoma* systematics.** *Mycopathologia*, v. 115, n. 2, p. 89-103, 1991.

MORA, C.; JULIO, R. **Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma harzianum*.** Dissertação – Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Universidad Zamorano. Honduras, 2001.

MORTON, V.; STAUB, T. **A short history of fungicides.** APSnet Features. Online publication. 2008. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx>>. Acesso em: 12 de dic. 2016.

MUELLER, G. M. et al. **Global diversity and distribution of macrofungi.** Biodiversity and conservation, v. 16, n. 1, p. 37-48, 2007.

MUSCHLER, R. G. **Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica.** Agroforestry systems, v. 51, n. 2, p. 131-139, 2001.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. **Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans.** The Scientific World Journal, v. 2014, 2014.

NAKASE, T.; TSUZUKI, S.; TAKASHIMA, M. **Bullera taiwanensis sp. nov. and Bullera formosensis sp. nov., two new ballistoconidium-forming yeast species isolated from plant leaves in Taiwan.** The Journal of general and applied microbiology, v. 48, n. 6, p. 345-355, 2002.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **DNA Sequencing Costs: Data.** Disponível em: <<https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>>. Acesso em: 10 de ago. 2016.

NEIVA, Sigrid de Aquino. **As áreas de preservação permanente no Brasil: a percepção de especialistas.** 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

NELSON, S. C. **Cercospora leaf spot and berry blotch of coffee.** University of Hawai'i at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, Cooperative Extension Service, 2008.

NEVES, P.; HIROSE, E. **CONTROL BIOLOGICAL.** Neotropical Entomology, v. 34, n. 1, p. 077-082, 2005.

NGOWI, A. V. F. et al. **Smallholder vegetable farmers in Northern Tanzania: Pesticides use practices, perceptions, cost and health effects.** Crop Protection, v. 26, n. 11, p. 1617-1624, 2007.

NUNES, C. C. et al. **Genetic diversity of populations of Hemileia vastatrix from organic and conventional coffee plantations in Brazil.** Australasian Plant Pathology, v. 38, n. 5, p. 445-452, 2009.

NUTARATAT, P. et al. **Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand.** Fungal biology, v. 118, n. 8, p. 683-694, 2014.

OERKE, E. C. **Crop losses to pests.** The Journal of Agricultural Science, v. 144, n. 01, p. 31-43, 2006.

ORMOND, J. G.; PAULA, S.; FAVERET FILHO, P. **Café:(re) conquista dos mercados.** BNDES Setorial, Rio de Janeiro, no 10, p. 3-55. 1999.

PAVA-RIPOLL, M. et al. **Increased pathogenicity against coffee berry borer, Hypothenemus hampei (Coleoptera: Curculionidae) by Metarhizium anisopliae expressing the scorpion toxin (AaIT) gene.** Journal of invertebrate pathology, v. 99, n. 2, p. 220-226, 2008.

PEREIRA, J.C.R. et al. **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas**. EMBRAPA-CPAA, Circular Técnica no 10. 1998.

PEREIRA, L. F. et al. **Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of Coffea arabica L.** Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 17, n. 3, p. 283-289, 2005.

PEREIRA, R. T. **Influência de Cladosporium cladosporioides na qualidade da bebida do café**. Dissertação Mestrado em Fitopatologia. Universidade Federal de Lavras. 2002.

PEREIRA, R. T.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. **Caracterização e dinâmica de colonização de Cladosporium cladosporioides (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (Coffea arabica L.)**. Ciência Agrotec, v. 29, p. 1112-1116, 2005.

PERES, F. et al. **Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado**. Rev Saúde Pública, v. 35, n. 6, p. 564-70, 2001.

PEREZ, C. A. et al. **Species of Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae on native Myrtaceae in Uruguay: evidence of fungal host jumps**. Fungal biology, v. 117, n. 2, p. 94-102, 2012.

PERFECTO, I. et al. **Biodiversity, yield, and shade coffee certification**. Ecological Economics, v. 54, n. 4, p. 435-446, 2005.

PERFECTO, I. et al. **Shade coffee: a disappearing refuge for biodiversity**. BioScience, v. 46, n. 8, p. 598-608, 1996.

PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. **Spatial pattern and ecological process in the coffee agroforestry system**. Ecology, v. 89, n. 4, p. 915-920, 2008.

PERFECTO, I.; VANDERMEER, J. **The effect of an ant-hemipteran mutualism on the coffee berry borer (Hypothenemus hampei) in southern Mexico**. Agriculture, Ecosystems & Environment, v. 117, n. 2, p. 218-221, 2006.

PFENNING, L. H.; MARTINS, M. F. **Espécies de Fusarium associadas ao cafeeiro na região sul de Minas Gerais**. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000.

PHILPOTT, S. M. et al. **Biodiversity loss in Latin American coffee landscapes: review of the evidence on ants, birds, and trees**. Conservation Biology, v. 22, n. 5, p. 1093-1105, 2008

PIETRO, A. et al. **Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus**. Molecular Plant Pathology, v. 4, n. 5, p. 315-325, 2003.

PITTET, A. et al. **Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column**

**cleanup procedure.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 44, n. 11, p. 3564-3569, 1996.

POMELLA, A. W.; RIBEIRO, R. T. S. **Controle biológico com Trichoderma em grandes culturas—uma visão empresarial.** Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 239-244, 2009.

POSADA, F. et al. **Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales).** Mycological research, v. 111, n. 6, p. 748-757, 2007.

POZZA, A. et al. **Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro.** Fitopatologia Brasileira, v. 29, n. 2, p. 185-188, 2004.

POZZA, E. A.; ALVES, M. C. **Impacto potencial de mudanças climáticas sobre as doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil.** Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil, Brasília: Gráfica Embrapa, p. 220-238. 2008.

RENGIFO, H. G.; LEGUIZAMÓN, J. E.; RIAÑO, N. M. **Incidencia y severidad de la mancha de hierro en plántulas de Coffea arabica en diferentes condiciones de nutrición.** Cenicafé, 57(3):232-242. 2006.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.; VISMER, H. F. **Production of fumonisin analogs by Fusarium species.** Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

ROBERTS, R. G. **Postharvest biological control of gray mold of apple by Cryptococcus laurentii.** Phytopathology, v. 80, n. 6, p. 526-530, 1990. Rondônia. Documentos, 90), 2004.

ROTHBERG, J. M.; LEAMON, J. H. **The development and impact of 454 sequencing.** Nature biotechnology, v. 26, n. 10, p. 1117-1124, 2008.

RUFINO, J. L.; VILELA P. **Caracterização da cafeicultura de montanha de Minas Gerais.** INAES, 2010.

RUYTERS, S. et al. **Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: a survey.** Science of the total environment, v. 443, p. 470-477, 2013.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. **Secretion of extracellular enzymes by Verticillium psalliotae Treschow and Verticillium lecanii (Zimm.) Viegas during growth on uredospores of the soybean rust fungus (Phakopsora pachyrhizi Syd.) in liquid cultures.** Journal of Phytopathology, v. 131, n. 2, p. 161-173, 1991.

SALGADO, M. et al. **Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha de Phoma do cafeeiro.** Tropical Plant Pathology, 2009.

SALGADO, M. et al. **Primeiro relato da ocorrência de *Didymella* sp., fase sexuada de *Phoma* tarda, em *Coffea arabica* no Brasil.** 2007.

SALGADO, M.; PFENNING, L.H. **Identificação e Caracterização de Espécies de *Phoma* no Brasil.** Congresso Paulista de Fitopatologia. Campinas SP. 2000.

SANHUEZA, R. M. et al. Caracterização e controle das doenças de maçãs em pós-colheita. Disponível em: <<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/outros/relatoriofinal/Capitulo02.pdf>>. Acesso em: 07 de fev. 2016.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. **Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*).** Microbial Ecology, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.

SAUCEDO-GARCÍA, A. et al. **Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico.** PloS one, v. 9, n. 6, p. e98454, 2014.

SCARDUA, Fernando. **Responsabilidade Ambiental na Produção Agrícola.** São Paulo: Diretoria de Comunicação e Marketing Corporativo Bunge, 2008.

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, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHULZ, B; BOYLE, C. **The endophytic continuum.** Mycological research, v. 109, n. 06, p. 661-686, 2005.

SHAH, Viral B.; MCRAE, B. H. **Circuitscape: a tool for landscape ecology.** In: Proceedings of the 7th Python in Science Conference. 2008.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. **Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, n. 3, p. 521-526, 2008.

SILVA, J. R. et al. **Valor da produção agropecuária do Estado de São Paulo, resultado final de 2014.** Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 1-7. 2015.

SIQUEIRA JR, J. F.; FOUAD, A. F.; ROCAS, I. N. **Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes.** Journal of oral microbiology, v. 4, 2012.

SIRINUNTA, A. et al. **Screening of Antagonistic Bacteria for Controlling *Cercospora coffeicola* in Arabica Coffee.** Journal of Agricultural Technology, v. 11, n. 5, p. 1209-1218, 2015.

SOARES, F. **Impacto de fungicidas e inseticidas na densidade populacional de *Beauveria bassiana* no solo sob efeito da microbiota nativa.** 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2011.

SOTO-PINTO, L. et al. **Shade effect on coffee production at the northern Tzeltal zone of the state of Chiapas, Mexico.** Agriculture, Ecosystems & Environment, v. 80, n. 1, p. 61-69, 2000.

SOUZA, A. G. C. et al. **Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf.** Journal of phytopathology, v. 159, n. 1, p. 6-11, 2011.

STAVER, C. et al. **Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America.** Agroforestry Systems, v. 53, n. 2, p. 151-170, 2001.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. **An overview of endophytic microbes: endophytism defined.** Microbial endophytes, v. 3, p. 29-33, 2000.

SULLIVAN, R. F.; WHITE, J. F. **Phoma glomerata as a mycoparasite of powdery mildew.** Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 1, p. 425-427, 2000.

TANADA, Yoshinori; KAYA, Harry K. **Insect pathology.** Academic press, 2012.

TANIWAKI, M. H. et al. **The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods.** International journal of food microbiology, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.

TAUNAY, A. E. **História do café no Brasil: no Brasil Imperial 1822-1872.** Rio de Janeiro, Departamento Nacional do Café, 1939.

TOLAINI, V. et al. **Lentinula edodes enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits.** International journal of food microbiology, v. 138, n. 3, p. 243-249, 2010.

TOLEDO, V. M.; MOGUEL, P. **Coffee and sustainability: the multiple values of traditional shaded coffee.** Journal of Sustainable Agriculture, v. 36, n. 3, p. 353-377, 2012.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: < <http://www.fas.usda.gov/commodities/coffee>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

VANDERMEER, J.; JACKSON, D.; PERFECTO, I. **Qualitative dynamics of the coffee rust epidemic: educating intuition with theoretical ecology.** BioScience, p. bit034, 2014.

VANDERMEER, J.; PERFECTO, I.; PHILPOTT, S. **Ecological complexity and pest control in organic coffee production: uncovering an autonomous ecosystem service.** *BioScience*, v. 60, n. 7, p. 527-537, 2010.

VEGA, F. E. et al. **Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico.** *Fungal Ecology*, v. 3, n. 3, p. 122-138, 2010.

VEGA, F. E. et al. **Fungal entomopathogens: new insights on their ecology.** *Fungal Ecology*, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

VINIT-DUNAND, F. et al. **Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants.** *Plant science*, v. 163, n. 1, p. 53-58, 2002.

VITI, C. et al. **Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 3, p. 309-318, 2008.

WALLER, J. M.; BRAYFORD, D. **Fusarium diseases in the tropics.** *International Journal of Pest Management*, v. 36, n. 3, p. 181-194, 1990.

WANG, Q.; BAI, F.. **Molecular phylogeny of basidiomycetous yeasts in the *Cryptococcus luteolus* lineage (Tremellales) based on nuclear rRNA and mitochondrial cytochrome b gene sequence analyses: proposal of *Derxomyces* gen. nov. and *Hannaella* gen. nov., and description of eight novel *Derxomyces* species.** *FEMS yeast research*, v. 8, n. 5, p. 799-814, 2008.

WANG, Q.; ZHOU, D.; CANG, L. **Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, n. 7, p. 1504-1509, 2009.

WANG, Q. et al. **Proposal of *Mingxiaea* gen. nov. for the anamorphic basidiomycetous yeast species in the *Bulleribasidium* clade (Tremellales) based on molecular phylogenetic analysis, with six new combinations and four novel species.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 61, n. 1, p. 210-219, 2011.

WHITTAKER, Robert H. **Evolution and measurement of species diversity.** *Taxon*, p. 213-251, 1972.

YU, T. et al. **Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 122, n. 1, p. 44-48, 2008.

ZAMBOLIN, L., VALE, F. X. DO, PEREIRA, A. A., CHAVES, G. M. Manejo Integrado das doenças do cafeeiro In: I ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE. Ed. Viçosa: Livro de palestras, 1999. p.134-215.

ZAMBOLIM, L. et al. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem-do-cafeeiro. **O Estado da Arte de Tecnologias de Produção de Café. UFV-Viçosa, MG, Brasil**, p. 369-450, 2002.

ZILLI, J. E. et al. **Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo**. Cadernos de Ciência & Tecnologia, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

## ANEXOS

### A. Tabela 'MIDs': MIDs utilizados para o sequenciamento nos 15 locais no interior da plantação de café (Localização na fazenda, nome do MID, sequência do iniciador com MID sublinhado)

Ponto de Coleta	MID	Sequência
00	MID-01	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ACGAGTGCCT</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
01	MID-02	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ACGCTCGACA</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
02	MID-03	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AGACGCACTC</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
03	MID-04	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>AGCACTGTAG</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
04	MID-05	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ATCAGACACG</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
05	MID-06	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ATATCGCGAG</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
06	MID-07	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CGTGTCTCTA</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
08	MID-08	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CTCGCGTGTC</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
09	MID-10	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>TCTCTATGCG</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
11	MID-11	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>TGATACGTCT</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
12	MID-13	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CATAGTAGTG</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
13	MID-14	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CGAGAGATAC</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
14	MID-15	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>ATACGACGTA</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
15	MID-16	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CGTCTAGTAC</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'
16	MID-17	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG <u>CGTCTAGTAC</u> GATGAAGAACGYAGYRAA-3'

## B. Tabela OTUs

OTU ID	Taxon assignment accession No.	Sampling locations																TOTAL	As percent of total reads (N=68504)
		00	01	02	03	04	05	06	08	09	11	12	13	14	15	16			
OTU_1	Cladosporium exasperatum HM148090	3169	1795	786	3318	1837	3005	1327	293	1009	2726	1994	808	2791	2431	1502	28791	0.420282027	
OTU_2	Dermomyces anomalus AF453289	456	1072	2071	124	748	799	1467	317	655	153	684	590	357	501	1429	11423	0.166749387	
OTU_3	Phoma glomerata JQ936163	1060	655	623	2018	1296	392	803	55	623	607	361	269	509	361	450	10082	0.147173888	
OTU_4	Cryptococcus aff taibaiensis  MUFRJ 51982 FN428916	121	383	138	118	84	234	284	25	413	271	293	176	296	844	286	3966	0.05789443	
OTU_5	Acrodontium crateriforme AY843112	77	169	78	160	244	72	38	3	73	406	207	172	91	13	189	1992	0.029078594	
OTU_6	Cryptococcus laurentii FN428902	7	171	224	55	42	0	13	8	73	47	249	16	52	136	83	1176	0.017166881	
OTU_12	Cladosporium sphaerospermum DQ780343	77	109	11	80	59	101	17	6	38	43	34	4	232	211	51	1073	0.015663319	
OTU_10	Cryptococcus sp CBS 8358 AF444387	7	50	74	14	38	0	6	2	84	15	448	8	32	50	30	858	0.012524816	
OTU_7	Passalora sp CPC 11147 AY752162	24	82	252	191	7	40	1	2	43	81	48	13	49	10	9	852	0.01243723	
OTU_8	Hannaella sinensis AF444468	15	21	50	21	11	0	43	174	43	14	52	12	0	114	216	786	0.011473783	
OTU_9	Fusarium beomiforme U34582	21	53	204	34	29	13	26	5	56	31	47	20	17	79	40	675	0.009853439	
OTU_15	Alternaria eichhorniae KC146356 Alternaria porri JQ818176	59	51	18	44	52	78	54	2	7	9	11	5	82	20	14	506	0.00738643	
OTU_11	Penicillium sp HQ436051	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	442	0	444	0.006481373		
OTU_17	Sporobolomyces symmetricus AY364836	160	35	43	25	12	35	4	0	0	0	1	2	6	0	21	344	0.005021605	
OTU_13	Bullera pseudoalba AF444399	5	39	77	28	54	5	19	0	56	7	6	5	0	3	18	322	0.004700455	
OTU_14	Microdiplodia sp KC771518 Paraconiothyrium sp EF467438	56	39	26	10	56	33	17	3	2	9	2	8	12	15	17	305	0.004452295	
OTU_16	Pyrenochaetopsis leptospora JF740262	26	8	26	12	26	10	9	1	29	10	5	5	29	37	5	238	0.00347425	
OTU_25	Nigrospora sp TSS 151 KF135620	2	23	30	67	0	13	18	2	5	25	10	5	10	4	15	229	0.00334287	
OTU_19	Cryptococcus sp SA7L02 FJ527034	46	15	2	0	29	0	7	2	4	41	45	2	16	1	5	215	0.003138503	
OTU_40	Boeremia exigua var. populii GU237707	75	4	26	0	0	0	0	0	0	40	10	23	14	3	0	195	0.002846549	
OTU_23	Aureobasidium sp KF800543	81	17	24	5	7	0	9	0	2	11	0	3	6	0	0	165	0.002408618	
OTU_22	Setophaeosphaeria hemerocallidis KJ869161	0	5	17	0	45	0	2	3	25	2	13	1	16	4	23	156	0.002277239	
OTU_18	Alternaria sp EU479803	0	0	0	0	139	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	151	0.002204251	
OTU_21	Hannaella oryzae AF314986	0	13	1	1	6	0	85	3	5	5	9	0	0	23	0	151	0.002204251	
OTU_20	Dioszegia zsolitii var. yunnanensis AF385450	16	31	9	8	44	0	7	3	0	0	1	1	1	1	18	140	0.002043676	
OTU_35	Nigrospora sp Fun25W2 KF496169 Nigrospora sp GU053844	0	15	13	32	14	24	0	0	0	13	15	0	7	0	0	133	0.001941492	
OTU_28	Passalora sp EG 2013 JX507956	5	0	22	11	0	0	11	0	33	20	7	2	6	0	0	117	0.001707929	
OTU_32	Periconia sp JX984754	1	13	8	37	4	6	5	2	3	1	4	2	0	4	4	94	0.001372183	
OTU_24	Coniochaeta lignicola AF083206	0	0	35	10	6	2	0	0	3	13	5	1	0	15	1	91	0.00132839	
OTU_26	Cyphellophora sp JF330177	0	1	59	0	0	0	0	0	4	4	13	0	0	1	7	89	0.001299194	
OTU_36	Nigrospora sp TSS 151 KF135620	26	1	1	9	25	15	5	0	0	6	0	0	0	0	0	88	0.001284597	
OTU_37	Streitiziana africana GQ850386	2	0	30	2	4	0	0	0	1	26	17	0	3	0	0	85	0.001240803	
OTU_44	Nigrospora sp JN207250	7	5	13	0	20	0	2	0	0	0	1	1	11	8	8	76	0.001109424	
OTU_138	Phoma glomerata JQ936163	0	0	4	0	33	0	0	0	37	0	0	0	0	0	0	74	0.001080229	
OTU_27	Alternaria sp EU479803	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	74	0.001080229	
OTU_31	Aspergillus amstelodami AJ853761	2	5	1	13	25	0	0	3	0	3	15	0	0	1	1	69	0.00100724	
OTU_52	Articulospora sp AY615884	5	3	15	0	4	0	4	2	6	3	4	0	6	10	6	68	0.000992643	
OTU_29	Acremonium hennebertii HF680238	6	2	0	6	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	41	58	0.000846666	
OTU_43	Erythrobasidium hasegawianum AB030352	3	1	21	3	1	3	9	0	8	2	0	2	3	0	0	56	0.000817471	
OTU_30	Phoma glomerata JQ936163	0	0	0	0	10	0	0	0	0	1	42	0	0	0	0	53	0.000773677	
OTU_59	Phoma tropicalis GU237864	13	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	37	1	0	53	0.000773677	
OTU_47	Torula sp JX984722	2	3	0	7	5	6	0	1	1	2	1	1	19	1	3	52	0.00075908	
OTU_39	Fusarium sp GU721838	2	0	0	14	6	8	0	0	0	2	2	0	8	4	5	51	0.000744482	
OTU_65	Alternaria sp GU721297	7	7	6	5	1	4	3	0	2	11	0	2	0	0	0	48	0.000700689	
OTU_38	Alternaria sp EU479803 Phoma longicollis GU237767	0	5	0	2	28	0	7	0	0	1	0	0	0	0	0	43	0.000627701	
OTU_34	Lichenomphalia umbellifera GU810928	15	2	0	0	0	0	0	1	0	0	20	0	0	3	0	41	0.000598505	
OTU_42	Hannaella luteola AF444323	0	12	0	6	0	0	0	1	0	2	9	2	5	3	0	40	0.000583908	
OTU_79	Nigrospora sp TSS 151 KF135620	0	0	0	8	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	0.000554712	
OTU_33	Penicillium sp HQ436051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	0	36	0.000525517	
OTU_54	Clavariopsis aquatica GQ411318 Herpotrichia sp T02 79 FJ904498 Neopeckia coulteri FJ904497 Prosthemium intermedium AB554108 Prosthemium stellare AB554111 Seifertia azaleae EU030273 Strumella griseola AF485078 Strumella sp olir138 AY354268 Tumularia sp AY568066	14	6	1	0	3	0	1	0	1	1	0	2	0	0	3	32	0.000467126	
OTU_69	Fellomyces mexicanus AJ608667	0	1	4	3	0	0	0	0	2	10	1	2	0	0	8	31	0.000452528	
OTU_89	Erythrobasidium sp JX998770	0	2	7	12	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	29	0.000423333	
OTU_206	Stagonospora sp AX113 KC507202	0	4	11	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	9	1	27	0.000394138	
OTU_78	Cryptococcus aff taibaiensis  MUFRJ 51982 FN428916 Cryptococcus taibaiensis AY557601	0	5	0	0	0	0	0	0	6	0	2	2	1	8	3	27	0.000394138	
OTU_41	Nectria sp P10E3 JN207270	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	15	4	26	0.00037954	

OTU_62	Cladosporium exasperatum HM148090	10	0	0	0	12	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	26	0.00037954	
OTU_55	Setophoma sacchari KJ476144	0	0	0	9	3	0	10	0	0	2	0	0	1	0	0	25	0.000364942	
OTU_51	Devriesia thermodurans AY692087	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	15	0	0	21	0.000306551	
OTU_56	Phaeosphaeria sp HKC12 DQ092527	4	5	6	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0.000306551	
OTU_265	Nigrospora sp JN207250	4	2	0	0	0	11	0	0	1	1	0	0	0	0	0	19	0.000277356	
OTU_45	Ciborinia erythronii Z73767	11	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	6	0	19	0.000277356
OTU_104	Cyphellophora guyanensis JQ766432	0	0	5	0	0	0	0	0	1	4	2	0	4	2	0	18	0.000262758	
OTU_107	Meira nashicola AB185159	1	4	3	1	0	5	0	0	0	1	0	0	2	1	0	18	0.000262758	
OTU_110	Alternaria sp GU721297	0	2	1	1	0	0	4	0	0	5	2	2	0	0	1	18	0.000262758	
OTU_46	Dioszegia catarinonii AY562154	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0.000262758	
OTU_66	Preussia sp GU909871	9	2	2	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	18	0.000262758	
OTU_103	Cryptococcus aff taibaiensis IMUFRJ 51982 FN428916 Cryptococcus taibaiensis AY557601	1	0	0	3	0	2	6	0	0	0	0	0	0	5	0	17	0.000248161	
OTU_48	Phoma sp FJ752611	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	17	0.000248161	
OTU_50	Degelia plumbea KC618691	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	15	0	0	17	0.000248161	
OTU_117	Shiraia sp PE112 JX875929	0	0	5	0	0	0	0	0	9	0	0	2	0	0	0	16	0.000233563	
OTU_49	Degelia plumbea KC618691	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.000233563	
OTU_57	Periconia sp CY137 HQ607981	0	0	0	13	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0.000233563	
OTU_71	Cercospora conioagrammes JX143583	2	7	2	0	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	16	0.000233563	
OTU_136	Cyphellophora sp TMS 2011 HQ631022	3	2	4	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	15	0.000218965	
OTU_53	Hannaella siamensis AB922850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	0.000218965	
OTU_61	Preussia sp JX984761	0	2	1	6	0	0	4	0	0	0	2	0	0	0	0	15	0.000218965	
OTU_127	Camarsporium sp GU054219	0	2	2	0	0	0	2	0	0	2	4	0	0	0	2	14	0.000204368	
OTU_72	Amanita caesareoides AB758243 Amanita calyptroderma GQ250400 Amanita cf hemibapha TRTC 150286 JX844714 Amanita cf hemibapha TRTC 150314 JX844717 Amanita hemibapha subsp javanica AB451969 Amanita similis AB750727 Amanita sp cinnamomescens JX844699 Amanita sp jack5 JX844720 Inocybe sp UDB008131	3	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	0.000204368	
OTU_81	Cryptococcus sp DQ421212	0	0	0	1	0	0	8	0	1	3	0	0	0	1	0	14	0.000204368	
OTU_82	Nigrospora sp Fun25W2 KF496169 Nigrospora sp GU053844	0	0	0	8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.000204368	
OTU_142	Pseudocercospora norchiensis JX901785	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	6	0	13	0.00018977	
OTU_200	Sporobolomyces symmetricus AY364836	1	0	0	3	0	0	0	8	1	0	0	0	0	0	0	13	0.00018977	
OTU_235	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	2	0	0	0	13	0.00018977	
OTU_58	Gloeocystidiellum sp DLL2011 2 KJ140720	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	13	0.00018977	
OTU_74	Quambalaria pitereka EF427376	11	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0.00018977	
OTU_116	Massarina sp HF12700 JQ889692	0	5	4	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	12	0.000175172	
OTU_118	Hannaella luteola AF444323	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	12	0.000175172	
OTU_60	Peyronellaea gardeniae FJ427003 Stagonosporopsis dorenboschii GU237862 Stagonosporopsis loticola GU237890	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0.000175172	
OTU_63	Acrodontium crateriforme AY843112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	11	0	0	0	0	12	0.000175172	
OTU_90	Rhynchostroma rufum KJ546123	0	2	7	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	12	0.000175172	
OTU_99	Montagnula aloès JX069863	0	4	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	12	0.000175172	
OTU_109	Hannaella luteola AF444323	0	0	2	0	5	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_255	Glomerella cingulata GU223177	3	1	2	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_64	Toxicocladosporium sp KF800466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	11	0.000160575	
OTU_67	Phaeosphaeria sp HKC12 DQ092527	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_68	Massarina sp HF12700 JQ889692	0	0	0	0	10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_75	Mycosphaerella sp 5 ICMP 18846 JN225924	0	1	0	0	0	0	9	0	0	0	1	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_76	Cryptococcus sp CBS 8358 AF444387	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	9	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_85	Paraphaeosphaeria sp TMS 2011 HQ631065	0	3	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.000160575	
OTU_70	Capnodium sp HQ608105	9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.000145977	
OTU_73	Candida sp GJ17M08 FJ873588 Candida sp W382 JN581123	0	0	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.000145977	
OTU_80	Strelitziana malii FJ917557	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	2	0	10	0.000145977	
OTU_84	Pseudallescheria fimeti AY879799	0	2	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.000145977	
OTU_77	Fusicladium sicilianum FN549914	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.000131379	
OTU_91	Wallemia sebi AY328912	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	9	0.000131379	
OTU_113	Sarocladium strictum AY214439	2	0	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	8	0.000116782	
OTU_115	Stagonospora sp AX113 KC507202	0	0	0	3	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	8	0.000116782	
OTU_134	Sporobolomyces poonsookiae AB030327 Sporobolomyces sp Vega180 EU002899	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	8	0.000116782	
OTU_156	Periconia sp BPV93c KC771468	0	3	1	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	8	0.000116782	
OTU_162	Cladosporium exasperatum HM148090	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	8	0.000116782	
OTU_205	Cryptococcus sp JN890200	0	2	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	8	0.000116782	
OTU_83	Podospora multipilosa EF197082	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0.000116782	
OTU_87	Bullera sp TY 154 AY313026	0	0	0	0	7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8	0.000116782	
OTU_88	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium flabelliforme HM148092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	8	0.000116782	
OTU_102	Dioszegia sp TY 217 AY313036	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	0.000102184	
OTU_122	Cryptococcus aff taibaiensis IMUFRJ 51982 FN428916	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	4	0	7	0.000102184	

OTU_125	Alternaria solani JF491215	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	7	0.000102184
OTU_128	Cryptococcus dimennae EU266559	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_137	Torula sp JX984722	0	1	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_139	Cladosporium ramotenellum EF679384 Davidiella tassiana EF679363	0	0	2	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_165	Cyphellophora sp JF330177	0	0	0	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	7	0.000102184
OTU_220	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	2	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_261	Setophoma sacchari KJ476144	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	7	0.000102184
OTU_86	Nomuraea rileyi AY624205	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_92	Acremonium stromaticum JQ647433	6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_93	Myrothecium cinctum AJ302004 Myrothecium sp KF800183	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_94	Davidiella rosigena GU214632	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_97	Aureobasidium sp RBSS 125 FN665415	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.000102184
OTU_100	Pestalotiopsis sp LH251 HQ832827	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_112	Cephalophora sp AM711503	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	6	8.76E-05
OTU_114	Helminthosporium chlorophorae AF120259 Helminthosporium sp XXJW 2014b KJ877647	0	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_129	Glomerobolus gelineus DQ247782	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_130	Bullera sp TY 248 AY313032	0	0	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_146	Fusarium oxysporum f sp lycopersi KF914458	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6	8.76E-05
OTU_189	Chaunopycnis sp ANT 03 065 DQ402530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	0	0	6	8.76E-05
OTU_245	Hannaella zeae AJ965481	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_293	Cladosporium arthropodii JN906979 Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium fiabelliforme HM148092 Davidiella tassiana EF679363	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	6	8.76E-05
OTU_95	Bipolaris victoriae JN601027	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_96	Pyxine soredata AY498681	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_98	Pseudallescheria fimeti AY879799	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8.76E-05
OTU_101	Preussia sp JX298928	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_105	Stictis urceolatum AY661686	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_106	Cephalosporium serraee var fuscum EF543844	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	7.30E-05
OTU_108	Acaromyces ingoldii AY158671	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_111	Monographella albescens AJ132509	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_123	Nigrospora sp Fun25W2 KF496169 Nigrospora sp GU053844	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_152	Colletotrichum annellatum JQ005222	0	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_158	Cryptococcus sp S1D AM931014	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_178	Mycoleptodiscus sp AM901921	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_186	Toxicocladosporium banksiae HQ599598	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	5	7.30E-05	
OTU_193	Torula sp JX984722	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_211	Massarina walkerii AF383965	0	0	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_219	Cryptococcus sp TP Snow Y44 JN400818	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	5	7.30E-05	
OTU_242	Periconia sp CY137 HQ607981	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	5	7.30E-05	
OTU_283	Bipolaris sp UFMGCB 564 FJ466720	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5	7.30E-05
OTU_426	Epicoccum nigrum FJ426996	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	5	7.30E-05	
OTU_119	Aspergillus sp DY115 21 8 M4 KF411579	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_120	Tetracladium sp EU516942	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	5.84E-05	
OTU_121	Shiraia sp PE126 JX875943	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_124	Phoma sp FJ752611	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_126	cf Stagonospora sp CBS 51674 KF251267	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_131	Leptosphaerulina sp SC5GAF0042 JN850998	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_132	Periconia sp CY137 HQ607981 Periconia sp CY191 HQ608021	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_133	Biatoropsis usnearum KJ404876	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_135	Ochroconis mirabilis KF156028	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_140	Sporobolomyces symmetricus AY364836	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_149	Bambusicola splendida JX442034	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_150	Paraconiothyrium sp GU909799	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_170	Veronaea botryosa EU041816	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_179	Cryptococcus sp FN539061	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_180	Alternaria sp JQ081417	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_185	Xenobotrytis acaducospora EU541485	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5.84E-05	
OTU_209	Zymoseptoria verkleyi KC005781	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_228	Cryptococcus aff taibaiensis  MUFRJ 51982 FN428916	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	5.84E-05
OTU_233	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	4	5.84E-05
OTU_234	Nigrospora sp JN207250	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_251	Dioszegia takashimae AY562160	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_275	Lectera longa JQ647448	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_474	Diplodia pseudoseriata EU080922 Diplodia pseudoseriata EU080927 Diplodia seriata AY259094	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5.84E-05
OTU_141	Phaeothecoidea melaleuca HQ599594	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05

OTU_143	Beauveria felina AY261368 Beauveria felina AY261369 Beauveria felina Z54106 Beauveria sp HQ631047 Geosmithia rufescens AM947667 Geosmithia sp P7 16 7 KF934490	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_144	Fibulobasidium murrhardtense GU327540	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_145	Cryptococcus sp EU852364	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_147	Khuskia oryzae EU272487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_148	Periconia sp LVPEIH4157 10 JX868735	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_151	Hannaella oryzae AF314986	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_153	Corynespora smithii HE584870 Epicoccum sp EPIC 1 JN113038	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_154	Bullera globospora AF444407 Cryptococcus dimenae EU266559	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_155	Articulospora sp EU003078 Diaporthe sp 1 19 JF502435 Diaporthe sp 1 27 JF502441 Phacidiella eucalypti EF110617 Phacidiella eucalypti EF110617 Phacidiella eucalypti EF110620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_157	Articulospora sp EU003078	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_159	Periconia sp BPV93e KC771468	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_160	Leptodontidium sp AY394892	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_161	Phoma glomerata JQ936163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_163	Gibellulopsis sp YH 2012 KC287233	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_164	Passalora sp JF691093	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_166	Cryptococcus aff taibaiensis  MUFRJ 51982 FN428916	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_167	Acremonium sp BCC 14080 EU488735	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
TU_16	Sphaeropsis tumefaciens JX431882	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4.38E-05		
OTU_169	Xylaria sp ASMC3 EU164404	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_171	Peyronellaea gardeniae FJ427003 Phoma longicolla GU237767 Phoma pedaeiae GU237770 Stagonosporopsis dorenboschii GU237862 Stagonosporopsis loticola GU237890	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_172	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	4.38E-05		
OTU_173	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium fiabelliforme HM148092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	4.38E-05		
OTU_174	Hannaella zeae AJ965481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	4.38E-05		
OTU_175	Phaeothecoidea melaleuca HQ599594	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	4.38E-05		
OTU_176	Corynespora olivacea JQ044429 Phoma dictamnica GU237877 Phoma glomerata JQ936163 Phoma minor GU237831 Phoma multirostrata FJ427031	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_177	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium fiabelliforme HM148092	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_181	Pisolithus aff. microcarpus AF374704 Pisolithus microcarpus AF004735 Pisolithus sp AF374706	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_182	Geopyxis sp GU083236 Hydnocystis piligera JN048887	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_183	Acremonium fusidioides FN706542	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_184	Penicillium sp HQ436051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	4.38E-05		
OTU_187	Dexomyces anomalus AF453289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4.38E-05		
OTU_188	Exophiala sp GQ999235	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_190	Stagonosporopsis ajacis GU237791	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_191	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_192	Botryosphaeria sp BJ10200 X JN650521	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_194	Calicium salicinum AY450578 Calicium salicinum AY453645 Calicium sp Palice 4047 DQ789083 Furcaspora eucalypti EF110613 Gelatinipulvinella astraeocal U72611 Micarea flagellisporea AY756477	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_195	Penicillium sp HQ436051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_196	Phoma multirostrata FJ427031 Phoma oculi-hominis GU237901 Stagonosporopsis tanacetii JQ897481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_197	Rhodospidium paludigenum AF444492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_198	Cyphellophora sp AY833038	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_199	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_201	Cryptococcus laurentii FN428902	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_202	Plectosphaerella sp CCF3811 FJ430714	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_203	Degelia plumbea KC618691	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4.38E-05	
OTU_221	Aspergillus subversicolor JQ301894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	4.38E-05	
OTU_226	Sporobolomyces sp TD49 HQ014449	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	4.38E-05	
OTU_229	Microdiplodia sp KC771518 Paraconiothyrium sp EF467438 Paraconiothyrium sp JX535078	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	4.38E-05	

OTU_258	Myriangium sp AY843169	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_264	Rhodotorula marina AF444504	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_274	Clinocodium sp TUK S703 AB245088	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_276	Cladosporium exasperatum HM148090	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_288	Hyperphyscia adglutinata GU247154 Rinodina galloway DQ849299	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_292	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium flabelliforme HM148092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	3	4.38E-05
OTU_330	Asteromella sp HM999920	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4.38E-05
OTU_368	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium flabelliforme HM148092	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4.38E-05
OTU_385	Meira nashicola AB185159	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	4.38E-05
OTU_204	Acrodontium crateriforme AY843112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_207	Cyphellophora europaea JQ766443	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_208	Derxomyces anomalus AF453289	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2.92E-05
OTU_210	Bulleribasidium oberjochense GU327541	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_212	Scolecobasidium cateniphorum KF156013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_213	Pleospora herbarum DQ491516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_214	Tilletiopsis pallescens DQ317636	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_215	Opegrapha varia AF138838	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_216	Glomerella sp HQ22969	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_217	Candida sp GJ17M08 FJ873588 Candida sp W382 JN581123	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_218	Cladosporium arthropodii JN906979	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_222	Cryptococcus aff taibaiensis IMUFRJ 51982 FN428916	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_223	Abrothallus usneae KF816170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2.92E-05
OTU_224	Scolecobasidium dendroides FJ914704	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_225	Corynespora torulosa KF771154	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_227	Phoma sp 7606 EF127878	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2.92E-05
OTU_230	Acremonium sp BCC 14080 EU488735	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_231	Alternaria sp EU479803	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2.92E-05
OTU_232	Dioszegia takashimae AY562160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_236	Articulospora sp AY615884	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_237	Spenceriartinsia viticola AY905554	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_238	Sirobasidium intermedium AF444330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2.92E-05
OTU_239	Mycosphaerella sp L357 FJ265759	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_240	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium flabelliforme HM148092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_241	Massarina sp HM992807	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_243	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_244	Massarina sp HM992807	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_246	Dictyosporium subramanianii DQ018094	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_247	Coniothyrium sp EF159550	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_248	Erythrobasidium hasegawianum AB030352	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_249	Letendraea sp GQ999256	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_250	Cladosporium exasperatum HM148090 Cladosporium flabelliforme HM148092	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_252	Penidiella rigidophora EU019276 Trimmatostroma sp MT658 EU707580	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_253	Devriesia lagerstroemiae GU214634	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_254	Massarina sp HF12700 JQ889692	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2.92E-05
OTU_256	Derxomyces anomalus AF453289	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_257	Alternaria sp GU721420	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_259	Umbilicaria arctica HM161454 Umbilicaria haplocarpa HM161474 Umbilicaria spodochoera AF096207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_260	Fusarium fujikuroi AB725607 Fusarium proliferatum KJ017960 Fusarium sp GU721346	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_262	Stictis sp 1 MW 2004 AY527315	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_263	Neofusicoccum batangarum FJ900607 Neofusicoccum parvum AB970960	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_266	Periconia sp CY191 HQ608021	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_267	Myriangium sp CEHS208 EF464585	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_268	Phoma sp 7606 EF127878	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_269	Fusarium oxysporum f sp lycopersici KF914458	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_270	Diplodia allocellula JQ239397	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_271	Lecythophora aff decumbens IMUFRJ 52014 FN428890	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_272	Acrocalymma cycadis KJ869124 Alternaria sp GU721297 Phoma sp AF502832	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_273	Barriopsis iraniana FJ919663	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_277	Aplosporella prunicola EF564375	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_278	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2.92E-05
OTU_279	Rousoella japonensis KJ474829	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_280	Pisolithus aff. microcarpus AF374704 Pisolithus microcarpus AF004735 Pisolithus sp AF374706	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05

OTU_281	Fusarium sp JN207306	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_282	Articulospora sp EU003078	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_284	Alternaria sp GU721297	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_285	Cercospora conioagrammes JX143583 Cercospora zeae-maydis DQ185074	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_286	Cladosporium exasperatum HM148090	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_287	Cladophialophora sp AB847008	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_289	Pleurophragmium sp J530 KF572477	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_290	Colletotrichum asianum FJ972612 Colletotrichum clidemiae JX010265 Colletotrichum hymenocallidis KC790933 Colletotrichum nupharicola JX010187 Colletotrichum queenslandicum JX010276 Colletotrichum salsae JX010242 Colletotrichum siamense FJ972613 Colletotrichum sp PP9 FJ884085 Glomerella cingulata AB970981 Glomerella cingulata AY266400 Glomerella cingulata JF796347	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_291	Phoma medicaginis FJ224118	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_294	Peltaster sp WLE15 HQ386246	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_306	Ramichloridium streititziae EU041803	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2.92E-05
OTU_328	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	2.92E-05
OTU_331	Leptodiscella sp FMR 10885 FR821312	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2.92E-05
OTU_346	Cladosporium exasperatum HM148090	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_359	Penicillium brevicompactum AY484912 Penicillium neocrassum DQ645805	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2.92E-05
OTU_360	Chlorenchocelia torta JN033400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_364	Leptosphaeria sp KC867873	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_375	Cryptococcus aff taibaiensis IMUFRJ 51982 FN428916	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_382	Periconia sp CY137 HQ607981	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_384	Ophiosphaerella sp GU053811	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_442	Dermomyces anomalus AF453289	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2.92E-05
OTU_475	Cryptococcus sp QMW 2009a GQ181170	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_489	Cryptococcus magnus AF190008 Cryptococcus magnus EF126366	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_496	Cyphellophora sp JF330177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2.92E-05
OTU_497	Cryptococcus sp CBS 8358 AF444387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2.92E-05
OTU_536	Chlamydotubeufia cf huaikangplaensis SB 2014 KF301528 Ciliophora sp KF617796 Helicosporium aureum AY916478 Scytalidium lignicola AY762623 Scytalidium sp GU591724 Scytalidium sp GU591728 Umbilicaria sp KF274424	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_575	Deniquelata barringtoniae JX254654	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_590	Fellomyces sp CBS 8275 AJ608660	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2.92E-05
OTU_345	cf Stagonospora sp CBS 51674 KF251267	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.46E-05
OTU_388	Dictyosporium australiense DQ018092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1.46E-05
OTU_509	Lecidella carpathica KF570279	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.46E-05