**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade e biogeografia de fungos no solo sob a projeção da copa
de espécies arbóreas da Mata Atlântica**

Elisa Rabelo Matos

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

Elisa Rabelo Matos
Bacharel em Ciências Biológicas

**Diversidade e biogeografia de fungos no solo sob a projeção da copa de espécies
arbóreas da Mata Atlântica**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Matos, Elisa Rabelo

Diversidade e biogeografia de fungos no solo sob a projeção da copa de espécies
arbóreas da Mata Atlântica / Elisa Rabelo Matos. - - Piracicaba, 2010.
93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Biodiversidade 2. Biogeografia 3. Fungos 4. Mata Atlântica 5. Matéria orgânica do solo
6. Microbiologia do solo I. Título

CDD 631.46
M433d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À mamãe, papai e meus irmãos, Emília e Eduardo, pelo amor incondicional, apoio e incentivo
pra que tudo isso fosse possível, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir estar aqui, me fortalecer perante todos os obstáculos vividos nesses anos e por permitir que minha família continuasse unida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela confiança, paciência, orientação e sobre tudo pela amizade e convívio pessoal.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a execução do trabalho.

À coordenação do PPG Microbiologia Agrícola e à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) pela oportunidade concedida e por fornecer a estrutura para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Andreote pelos ensinamentos, conselhos e auxílio no trabalho desde o início, aos alunos Josiane (“Nasa”) e Armando Dias pela ajuda na execução do trabalho, aos funcionários Denise, Fernando, Luiz Silva, Wladimir pela ajuda e amizade. A todos do Laboratório de Microbiologia do Solo, pela ajuda, críticas e sugestões e por permitirem o uso do laboratório para algumas análises.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular Adriano Lucheta, Alice Cassetari, Rafael Valadares (Bolinha), Eder Santos, Gisele Nunes, Giselle Gomes (uai), Joze Correa, Kelly Justin, Maryeimy Varón, Rafael Dutra, Sandra Patrícia, Winston Ruiz, Silvia Barrera e Vívian Carvalho pela amizade, companheirismo, pelos ótimos momentos compartilhados que serão sempre lembrados, pela ajuda no trabalho e inúmeros ensinamentos.

Ao meu pai, José Domingos, irmãos, Emília e Eduardo, meu cunhado Vinícius, minha cunhada Cristiane e Gustavo por terem me ajudado a superar a fase mais difícil de nossas vidas e especialmente pela minha mãe, Maria Olinda, por ter lutado tanto para continuar entre nós.

Aos amigos que fiz durante o mestrado e que vou levar pela vida inteira: André Mazzeto, Bruna Oliveira, Carlos Eduardo Oltramari (Dudu), Daniel Lammel, Geraldo Junior, João Luis, Ligia Hansen, Luciano França, Luiz Zaidan, Mylenne Pinheiro, Nara Gustinelli, , Thaís Paula e Renê Voltani por tornarem meus dias piracicabanos mais alegres e prazerosos e principalmente a Daniel Lammel e André Mazzeto pela ajuda e sugestões na correção da dissertação.

Sem vocês com certeza essa jornada se tornaria mais difícil!

Aos amigos eternos Jana Menegassi, Gicely Lapola, Luciana Lanchote, Aline Trindade e a todos da turma de 2003/2 da Biologia da UFLA, por ainda fazerem parte da minha vida e pelos animados encontros de turma durante esse tempo.

Às queridas amigas-irmãs de república Layanne Souza, Fabiana Mingossi e Vívian Carvalho pela companhia, convívio e por serem minha família aqui, com todo o significado que a palavra FAMÍLIA tem! Deus sabia o que estava fazendo quando nos colocou juntas em Piracicaba!

A toda minha enorme família e amigos, de Poços de Caldas e de Lavras, que mesmo distantes foram sempre lembrados durante esse tempo e a todos não citados que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIDAGA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
3 DESENVOLVIMENTO	21
3.1 Revisão Bibliográfica.....	21
3.1.1 Mata Atlântica.....	21
3.1.2 Diversidade microbiana do solo	23
3.1.3 Comunidades de fungos do solo	25
3.1.4 Fatores que influenciam os microrganismos do solo.....	27
3.1.5 Técnicas moleculares para estudo da diversidade de fungos do solo	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Área de estudo e amostragem	35
4.2 Análises químicas	39
4.3 Fracionamento da Matéria Orgânica do solo (MOS)	40
4.4 Carbono da biomassa microbiana do solo	41
4.5 Extração do DNA metagenômico	41
4.6 Amplificação da região ITS do rDNA através de PCR.....	42
4.7 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	42
4.8 Clonagem e sequenciamento da região ITS do rDNA.....	43
4.9 Análise das sequências da região ITS do rDNA.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Caracterização química do solo	47
5.2 Fracionamento da Matéria Orgânica do solo (MOS)	50
5.3 Carbono na Biomassa Microbiana do Solo (CBM)	53
5.4 Estrutura de comunidades e diversidade de fungos.....	57
5.4.1 Análises das estruturas das comunidades de fungos com base em PCR-DGGE	57
5.4.2 Sequenciamento de clones da região ITS do rDNA	68

6 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Diversidade e biogeografia de fungos no solo sob a projeção da copa de espécies arbóreas da Mata Atlântica

A estrutura da comunidade e a diversidade fúngica do solo sob a copa de quatro espécies arbóreas (*Ocotea dispersa*, *Ocotea teleiandra*, *Mollinedia schottiana* e *Tabebuia serratifolia*), no Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB), foram examinadas em duas estações climáticas distintas, utilizando-se PCR-DGGE e sequenciamento de bibliotecas de clones da região ITS do rDNA. As relações entre as estruturas das comunidades fúngicas, a concentração de carbono na biomassa microbiana (CBM), os atributos químicos do solo e as diferentes frações da matéria orgânica do solo (MOS), foram avaliadas utilizando-se análise de redundância. Os valores de pH, MO, C, Ca, V% e Al apresentaram diferenças significativas no solo sob a copa das diferentes espécies de árvores amostradas. Os maiores valores de pH, MO, C, Ca e V% foram observados sob a copa de *O. dispersa*, enquanto que as maiores concentrações de Al foram observadas no solo sob a copa de *O. teleiandra*. A concentração de ácidos húmicos (AH) foi significativamente maior no solo sob a copa de *O. dispersa*. A concentração de CBM foi maior na época de baixa pluviosidade, independente da espécie vegetal. As estruturas das comunidades fúngicas dos solos sob a copa das quatro diferentes espécies de árvores analisadas mostrou comunidades distintas no solo sob a copa de cada espécie de árvore avaliada. As estruturas das comunidades fúngicas mostraram também variação em relação à pluviosidade. A estimativa de riqueza de UTOs, com base no sequenciamento de clones da região ITS do rDNA, foi significativamente diferente entre as amostras analisadas. Com base no índice de Shannon, a diversidade fúngica no solo sob a copa de *Ocotea dispersa* foi maior do que no solo sob a copa das demais espécies de árvores. A afiliação filogenética das UTOs mostrou a ocorrência dos filos Basidiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota, em ordem de abundância, além de fungos não-cultivados que compreenderam 25% das sequências analisadas. UTOs relacionadas ao filo Basidiomycota foram as mais abundantes no solo sob a copa das quatro espécies arbóreas analisadas (67% em MS, 59% em OT, 66% em TS e 57% em OD). Nesse filo, as UTOs representando *Cryptococcus podzolicus* e *Trichosporon sporotrichoides* foram as mais abundantes. De Zygomycota, UTOs afiliadas ao gênero *Mortierella* foram mais abundantes. Dessa forma, pode-se concluir que a diversidade e a estrutura de comunidades de fungos no solo depende da espécie vegetal crescendo no mesmo, e podem estar associadas aos teores de matéria orgânica, nitrogênio e saturação por bases.

Palavras-chave: Solos Tropicais; ITS; Matéria Orgânica; PCR-DGGE; Sequenciamento

ABSTRACT

Diversity and biogeography of fungi in soil under the canopy of tree species in the Atlantic Forest

The community structure and diversity of fungi in soil under the canopy of four tree species (*Ocotea dispersa*, *Ocotea teleiandra*, *Tabebuia serratifolia*, and *Mollinedia schottiana*), in the Carlos Botelho State Park (PECB) were examined in two different seasons, using PCR-DGGE and rDNA ITS region clone library sequencing. The relationships between fungal community structures, concentration of microbial biomass carbon (MBC), soil chemical properties, and different fractions of soil organic matter (SOM) were evaluated using redundancy analysis. The pH, OM, C, Ca, Al, and V% showed significant differences in soil under the canopy of different species of trees. The highest values of pH, OM, C, Ca, and V% were observed under the *O. dispersa* canopy, while the highest concentrations of Al were observed in the soil under the *O. teleiandra* canopy. The concentration of humic acid (HA) was significantly higher in soil under the canopy of *O. dispersa*. The concentration of MBC was higher in the low rain precipitation season, regardless of plant species. The fungal community structures observed in soil under the canopies of the studied tree species were distinct in each soil micro-environment. The fungal community structures also showed variation with the variation in rain precipitation. The estimated OTU richness based on the sequencing of clones of the rDNA ITS region was significantly different between samples. Based on the Shannon diversity index, the fungal diversity in soil under the canopy of *Ocotea dispersa* was higher than in soil under the canopy of other tree species. The phylogenetic affiliation of OTUs showed the occurrence of phyla Basidiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Chytridiomycota and Glomeromycota, in order of abundance, and non-cultivated fungi that comprised 25% of the analyzed sequences. OTUs related to the phylum Basidiomycota were more abundant in soil under the canopies of all studied tree species (67% in MS, 59% in OT, 66% in TS and 57% in OD). In this phylum, OTUs affiliated to *Cryptococcus podzolicus* and *Trichosporon sporotrichoides* were the most abundant. From Zygomycota, OTUs affiliated to the genus *Mortierella* were more abundant. It can be concluded that the fungal diversity and community structure in the soil depends on the plant species growing in it, and may be associated with the concentration of organic matter, nitrogen, and base saturation.

Keywords: Tropical soils; ITS; Organic Matter; PCR-DGGE; Sequencing

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Localização do Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) na cidade de Sete Barras (SP).....**38**
- Figura 2- Mapa da Parcela Permanente do Projeto BIOTA/FAPESP no Parque Estadual Carlos Botelho contendo a Parcela Permanente do Projeto BIOTA/FAPESP. Os símbolos representam a localização das espécies arbóreas sob as quais as amostras de solo foram coletadas.....**38**
- Figura 3- Coleta das amostras de solo. A. Coleta das 3 subamostras. B. Marcação das subparcelas no PECB. C. Marcação das árvores nas subparcelas.....**39**
- Figura 4- C na biomassa microbiana (mg g^{-1} solo seco) do solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas do PECB, em amostras coletadas nas épocas de baixa pluviosidade e alta pluviosidade. 1-4 (OD – *Ocotea dispersa*), 5-8 (OT – *Ocotea teleiandra*), 9-12 (MS – *Mollinedia schottiana*) e 13-16 (TS – *Tabebuia serratifolia*). Os dados correspondem à média de 2 repetições. As barras representam o desvio padrão da média.....**54**
- Figura 5- Carbono na biomassa microbiana do solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas, amostrado no período de baixa e alta pluviosidade (BP e AP, respectivamente). Os dados são médias de 16 repetições. Médias acompanhadas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).....**55**
- Figura 6- Comparação de médias da quantidade de carbono na biomassa (mg C g^{-1}) no solo nas amostras coletadas nas duas épocas BP e AP sob a copa das espécies: OD – *Ocotea dispersa*, OT – *Ocotea teleiandra*, MS – *Mollinedia schottiana* e TS – *Tabebuia serratifolia*.....**56**

Figura 7- Estrutura das comunidades fúngicas nos diferentes solos amostrados durante a época de alta e baixa pluviosidade. A) Imagem do perfil de amplicons após DGGE; letras em vermelho: época de baixa pluviosidade; letras em azul: época de alta pluviosidade B) Análise discriminante das amostras analisadas: círculo (baixa pluviosidade); quadrado (alta pluviosidade). A mesma cor corresponde à mesma espécie. OD – *O. dispersa*, OT – *O. teleiandra*, MS – *M. schottiana* e TS – *T. serratifolia*; 1 e 2 correspondem as épocas de baixa pluviosidade e alta pluviosidade, respectivamente.....**59**

Figura 8- RDA das amostras de solo e variáveis ambientais significativas, segundo o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). AP (época de alta pluviosidade), BP (época de baixa pluviosidade). As setas vermelhas representam as variáveis ambientais e os triângulos vermelhos as nominais ou espécies arbóreas: OD – *Ocotea dispersa*, OT – *Ocotea teleiandra*, MS – *Mollinedia schottiana* e TS – *Tabebuia serratifolia*.....**65**

Figura 9- - RDA das amostras de solo e variável significativa do fracionamento da MOS, segundo o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). AP (época de alta pluviosidade), BP (época de baixa pluviosidade). As setas vermelhas representam a variável significativa e a pluviosidade e os triângulos vermelhos as nominais ou espécies arbóreas: OD – *Ocotea dispersa*, OT – *Ocotea teleiandra*, MS – *Mollinedia schottiana* e TS – *Tabebuia serratifolia*.....**67**

Figura 10- Frequência (%) dos filamentos do domínio Fungi no solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas. OD – *Ocotea dispersa*, OT – *Ocotea teleiandra*, MS – *Mollinedia schottiana* e TS – *Tabebuia serratifolia*.....**73**

Figura 11- Curva de rarefação indicando o número estimado de UTOs em bibliotecas de clones da região rDNA ITS de fungos nos solos coletados sob a copa das espécies arbóreas OD (*Ocotea dispersa*), OT (*Ocotea teleiandra*), MS (*Mollinedia schottiana*) e TS (*Tabebuia serratifolia*).....**77**

Figura 12- Diagrama de Venn com a distribuição do número de UTOs do domínio Fungi dos solos coletados sob a copa de OD (*Ocotea dispersa*), OT (*Ocotea teleiandra*), MS (*Mollinedia schottiana*) e TS (*Tabebuia serratifolia*).....**77**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores referentes à temperatura média e pluviosidade na área de coleta, durante as duas épocas de alta (AP) e baixa (BP) pluviosidade.....	36
Tabela 2- Análise física dos solos coletados sob a copa das espécies arbóreas OD – <i>Ocotea dispersa</i> , OT – <i>Ocotea teleiandra</i> , MS – <i>Mollinedia schottiana</i> e TS – <i>Tabebuia serratifolia</i>	37
Tabela 3- Análises químicas das amostras de solo coletadas sob a copa de 4 espécies arbóreas no PECB – época de baixa pluviosidade (BP) e alta pluviosidade (AP).....	49
Tabela 4- Valores de p para Teste de F para os atributos químicos do solo.....	50
Tabela 5- Concentrações de humina, ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH) no solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas, em duas épocas de amostragem (alta - AP e baixa - BP pluviosidade).....	51
Tabela 6- Valores de p para Teste de F para as concentrações de humina, ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH).....	51
Tabela 7- Valores <i>p</i> dos fatores ambientais do PECB obtidos no teste de permutação de Monte Carlo.....	64
Tabela 8- Valores <i>p</i> dos fatores de fracionamento da MOS do PECB obtidos no teste de permutação de Monte Carlo.....	66
Tabela 9- Frequência dos grupos de fungos de OD – <i>Ocotea dispersa</i> , MS – <i>Mollinedia schottiana</i> , TS – <i>Tabebuia serratifolia</i> e OT – <i>Ocotea teleiandra</i>	69
Tabela 10- Informações disponíveis no <i>GenBank</i> do NCBI sobre as sequências correspondentes aos grupos de fungos detectados no solo sob a copa de OD – <i>Ocotea dispersa</i> , MS – <i>Mollinedia schottiana</i> , TS – <i>Tabebuia serratifolia</i> e OT – <i>Ocotea teleiandra</i>	71
Tabela 11- Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências de clones da região rDNA ITS de amostras de solo coletadas sob a copa de diferentes espécies arbóreas (OD, OT, TS, MS).....	76

Tabela 12- Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones da região rDNA ITS das comunidades de fungos de amostras de solo coletadas sob a copa de diferentes espécies arbóreas (OD, OT, TS, MS)....**76**

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é internacionalmente conhecida por ser um *hotspot* de biodiversidade (1 a 8% do total de espécies no mundo) e pelo alto número de espécies endêmicas (MYERS et al., 2000). Apesar da riqueza biológica, essa floresta é provavelmente a mais ameaçada dentre as florestas tropicais. Essa devastação está intimamente relacionada com a expansão das grandes culturas agrícolas, por exemplo, café e cana-de-açúcar (METZER, 2009). Acredita-se que a biodiversidade na Mata Atlântica, com base nos atuais níveis de degradação, já está comprometida, pois muitas espécies foram extintas antes mesmo de serem descritas (REIS et al., 1992).

Embora uma grande quantidade de informações sobre a diversidade vegetal esteja disponível, pouco se sabe sobre a diversidade de micro-organismos existentes no solo e na superfície das plantas da Mata Atlântica. Os micro-organismos estão associados à manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, fluxos de gases e outros processos que determinam a sustentabilidade dos ecossistemas, até mesmo alterações climáticas globais. Embora a importância dos organismos do solo seja amplamente reconhecida, estudos esclarecendo seus papéis funcionais ainda são reduzidos (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; DORAN; ZEISS, 2000; HILL et al., 2000; CABELLO; ARAMBARRI, 2002; KIRK et al, 2004; MUMMEY et al., 2010).

Fungos são integrantes de um dos grupos funcionais mais importantes do solo, devido à sua participação na ciclagem de nutrientes, transporte de nutrientes para plantas, promoção de crescimento de plantas e indução ou supressão de doenças (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; BRIDGE; SPOONER, 2001). Apesar de seus papéis nos ecossistemas serem bem documentados, estima-se que apenas 5% das espécies de fungos tenham sido descritas, e pouco se sabe sobre sua dinâmica populacional, estrutura de comunidades e diversidade (HAWKSWORTH, 2001). O entendimento da diversidade e do funcionamento das comunidades fúngicas do solo permanece relativamente restrito, em comparação às comunidades de bactérias (HATTORI et al., 1997; OGRAM, 2000; KENT; TRIPLETT, 2002). No entanto, as comunidades fúngicas são importantes determinantes dos processos biogeoquímicos que ocorrem no solo.

Inventariar fungos e bactérias na Mata Atlântica é de grande importância, pois poderá auxiliar na identificação de espécies ainda desconhecidas e contribuir para a caracterização da biodiversidade microbiana em ecossistemas florestais. Poderá também demonstrar que tipo de relação micro-organismos e plantas estabelecem entre si e qual a influência que exercem um sobre o outro.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a estrutura das comunidades de fungos no solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas em uma parcela permanente de 10 ha do programa BIOTA (Processo 99/09635-0) instalada no Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB), e determinar sua possível relação com a espécie vegetal sob a copa da qual a amostra foi coletada, usando-se PCR-DGGE e sequenciamento de biblioteca de clones da região ITS do rDNA.

2 OBJETIVOS

- ✓ Determinar a diversidade de fungos do solo sob a projeção da copa das espécies arbóreas *Ocotea dispersa*, *Ocotea teleiandra*, *Mollinedia schottiana* e *Tabebuia serratifolia*, em uma parcela permanente no Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB) em duas épocas do ano, utilizando técnicas independentes de cultivo.
- ✓ Determinar a estrutura das comunidades de fungos do solo no PECB por meio de PCR-DGGE e sequenciamento da região ITS do rDNA.
- ✓ Avaliar a variação do C da biomassa microbiana, em períodos de baixa e alta pluviosidade.
- ✓ Caracterizar os atributos químicos e a matéria orgânica do solo nas áreas amostradas e suas relações com as comunidades de fungos do solo.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Revisão Bibliográfica

3.1.1 Mata Atlântica

As florestas tropicais recobrem apenas 7% da superfície terrestre e abrigam alta biodiversidade, englobando cerca de dois terços do total de espécies existentes no planeta (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2008; SATISH et al., 2007). O Brasil apresenta a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, com uma imensa diversidade biológica ainda desconhecida e em avançado estágio de devastação.

A Mata Atlântica brasileira compreende uma vasta região heterogênea (1.481.946 km², aproximadamente 17,4% do território brasileiro), incluindo grande variedade de fitofisionomias em diferentes topografias e condições climáticas (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2008; RIBEIRO et al., 2009). Além das diferentes características ambientais, essa região também apresenta diferenças sócio-econômicas, já que cerca de 70% da população brasileira nela habita (METZER, 2009).

Localiza-se em regiões úmidas, com numerosas plantas arborícolas e epífitas e de temperatura média de 25 °C. A alta pluviosidade anual, entre 2400 e 4000 mm, garante um solo sempre úmido e a manutenção de grande variedade de espécies vegetais e animais. Não apresenta períodos de seca, podendo distinguir um período chuvoso de outono a abril com temperaturas mais altas, e um período menos úmido de maio a setembro, com menores índices pluviométricos e temperaturas mais baixas (TABARELLI et al., 2008)

Atualmente, a Mata Atlântica é a quinta área mais ameaçada no mundo. Sua conservação é, pois, um grande desafio para o desenvolvimento ambiental, principalmente devido ao conhecimento existente sobre sua diversidade permanecer ainda bastante fragmentado (METZER, 2009). Essa floresta é internacionalmente conhecida por ser um *hotspot* de biodiversidade (1 a 8% do total de espécies no mundo) e pelo alto número de espécies endêmicas (MYERS et al, 2000).

No início do século XVI, a Mata Atlântica estendia-se por todo o litoral brasileiro, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, atingindo áreas da Argentina e do Paraguai, e hoje está reduzida à cerca de 7,3% da cobertura original (SOS MATA ATLÂNTICA, 2008; BIODIVERSITY HOTSPOTS, 2008; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2007; RIBEIRO et al., 2009). Atualmente, ocorre no litoral das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país, avançando para o interior em extensões variadas e é composta de uma série de unidades fitogeográficas, constituindo um mosaico vegetal de grande diversidade (RIBEIRO et al., 2009). Em virtude dessa grande riqueza biológica e níveis de ameaça, é considerada um dos 25 biomas classificados como *hotspots*, ou seja, prioritários para conservação (MYERS et al., 2000)

Desde as primeiras etapas da colonização do Brasil, a Mata Atlântica tem passado por uma série de surtos de conversão de florestas naturais em ambientes para os mais diversos usos. A fragmentação de habitats alterou seriamente a maior parte da Mata Atlântica e o maior impacto desse processo de fragmentação florestal é a destruição de habitats extremamente ricos em recursos biológicos. A eliminação de grandes trechos de floresta gera mudanças no microclima, dentre outras características, afetando as comunidades animais e vegetais, levando em extinção um número incalculável de espécies, e suas relações ecológicas (RAQUIM DE MERONA, 1987; MORI et al., 1991). Acredita-se que a biodiversidade desse bioma, com base nos atuais níveis de degradação, já está comprometida, pois muitas espécies foram extintas antes mesmo de serem descritas (REIS et al., 1992).

Atualmente mais de 530 plantas e animais que ocorrem no bioma estão oficialmente ameaçados e muitas dessas espécies não são encontradas em áreas protegidas (TABARELLI et al., 2008). Em relação aos micro-organismos, há uma grande quantidade de estudos relacionados a essas comunidades em solos (AGNELLI et al., 2004, JESUS et al., 2009; TAKETANI, TSAI, 2010; PITTL et al., 2010). Por outro lado, inventários sobre a diversidade, principalmente a de fungos, em solos de florestas tropicais não são numerosos (VERGHESE, 1972; BETTUCCI E ROQUEBERT, 1995; PERSIANI E CASADO, 1998; BETTUCCI et al., 2002). Embora uma grande quantidade de informações sobre a diversidade vegetal esteja disponível, pouco se sabe sobre a

diversidade dos micro-organismos existentes no solo e na superfície das plantas da Mata Atlântica. Em relação à comunidade fúngica do solo, o conhecimento é restrito, uma vez que poucos estudos foram realizados e a maioria deles se concentra na avaliação de grupos específicos de fungos (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006; PIRES-ZOTTARELLI, GOMES, 2007)

3.1.2 Diversidade microbiana do solo

O entendimento da biologia e da ecologia do solo tem sido valorizado por sua importância na restauração e na sustentabilidade de ecossistemas (STEENWERTH et al., 2002). Segundo Tótola e Chaer (2002) diversidade biológica é a variedade de espécies de um ecossistema, e também a variedade de genótipos dentro de uma mesma espécie. A diversidade biológica pode ser explicada pela riqueza de espécies e sua interação com os processos bioquímicos do solo (KENNEDY; SMITH, 1995)

Recentemente a exploração da biodiversidade microbiana aumentou significativamente e tem sido estudada com alto nível de detalhamento (FORNEY et al., 2004; HIBBERTT et al., 2009). Apesar de representarem as formas de vida mais abundantes no planeta e deter a maior proporção da diversidade genética global estimada, pouco se sabe sobre a real diversidade de micro-organismos presentes nos ecossistemas (LAMBAIS et al., 2005).

O estudo e caracterização da diversidade microbiana do solo são essenciais tanto para a definição de estratégias para a preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios causados por práticas de manejo e pela presença de poluentes (LAMBAIS et al., 2005). Além disso, é importante para aumentar o conhecimento das fontes de diversidade genética em uma comunidade, entender padrões de distribuição dos microrganismos e o envolvimento da biodiversidade no funcionamento e na sustentabilidade de ecossistemas (ØVREÅS, 2000). Um dos primeiros passos para a caracterização de um ecossistema é a descrição dos organismos que o habitam a fim de estabelecer relações sobre a diversidade e as funções e estabilidade do

ecossistema. Essas relações definem a diversidade funcional dos ambientes (VALINSKY et al., 2002)

Os micro-organismos são responsáveis pela maioria das transformações do C, N e S, entre outros elementos essenciais para a manutenção da vida no planeta e também estão envolvidos em inúmeras relações ecológicas que determinam a sobrevivência de populações de plantas, insetos e animais importantes para a funcionalidade dos ecossistemas. Em um contexto mais amplo, os micro-organismos estão associados à manutenção do equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos, fluxos de gases e outros processos que determinam a sustentabilidade dos ecossistemas, até mesmo as alterações climáticas globais (CHRISTENSEN, 1989; THORN; 1997; DORAN; ZEISS, 2000; HILL et al., 2000; FORNEY et al., 2004).

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios (*Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*) sendo que os procariotos correspondem à maior parte da biota da Terra. Estima-se que o número global de células procarióticas seja de $4\text{-}6 \times 10^{30}$ e que sua biomassa representa cerca de 60 a 100% do total de C na biomassa global de procariotos (WHITMAN et al., 1998). Estudos relatam que bactérias e arqueas são sensíveis a alterações de determinados atributos químicos do solo, como pH e relação C/N (FAORO et al., 2010; NIELSEN et al., 2010) enquanto que fungos estão intimamente relacionados à vegetação do local, ou seja, alterações na vegetação podem selecionar determinados grupos de fungos (NIELSEN et al., 2010).

A diversidade de fungos é tão impressionante quanto à de procariotos. Cerca de 74.000 espécies de fungos são conhecidas e estima-se que o número total de espécies possa chegar a 1,5 milhões (HAWKSWORTH, 2001). Embora ainda seja difícil estimar a população fúngica no solo, a grande maioria destas espécies descritas ocorrem no solo em algum estágio do seu ciclo de vida (BRIDGE; SPOONER, 2001). De fato, informações sobre a real diversidade e biogeografia de fungos ainda são escassas. O entendimento sobre a diversidade e o funcionamento das comunidades fúngicas do solo se mostra relativamente pequeno em comparação às comunidades de bactérias (e.g. HATTORI et al., 1997; OGRAM, 2000; KENT; TRIPLETT, 2002) e é comum encontrar estudos em ecologia microbiana do solo referindo-se apenas a comunidades de bactérias (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

Técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da ecologia de microrganismos têm revelado a existência de uma grande biodiversidade ainda não caracterizada devido à antiga limitação e incapacidade de se estudar organismos não cultiváveis. A introdução de técnicas independentes de cultivo permite que se determine a composição de comunidades microbianas e a identificação de inúmeros microrganismos não detectados em meio de cultura (FORNEY et al., 2004).

3.1.3 Comunidades de fungos do solo

Fungos compõem um dos grupos funcionais mais importantes no solo devido à sua participação na ciclagem de nutrientes, transporte de nutrientes para as plantas, promoção do crescimento de plantas e indução ou supressão de doenças (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; BRIDGE; SPOONER, 2001). Fungos saprófitos representam a maior proporção de espécies fúngicas no solo e desempenham papel crucial na decomposição de polímeros estruturais de plantas, como celulose, hemicelulose e lignina, contribuindo para a manutenção global do ciclo de carbono (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997; DORAN; ZEISS, 2000; HILL et al., 2000; ANDERSON et al., 2003).

Apesar de seus papéis nos ecossistemas serem bem documentados, e que apenas cerca de 5% das espécies de fungos tenham sido descritas, o conhecimento sobre sua dinâmica populacional, organização de comunidades e diversidade é restrito (HAWKSWORTH, 2001). Das espécies de fungos conhecidas, estima-se que apenas 17% pode se desenvolver em meio de cultura, e embora possam ser cultivadas, em muitos casos, não é possível germinar estruturas latentes como esporos, ocorrendo apenas o micélio vegetativo, o que dificulta a identificação das espécies (BRIDGE; SPOONER, 2001).

Em solos sob vegetação natural, fungos interagem com uma comunidade microbiana complexa, incluindo bactérias e componentes da microfauna. Fungos saprófitos como dos filos Zigomycota, Ascomycota e Chytridiomycota podem estar associados à decomposição da matéria orgânica do solo por decomporem tanto açúcares simples como celulosas e hemicelulosas, podendo também contribuir para a

solubilização do fósforo não-lábil nos solos (OSORIO; HABTE, 2001; KWASNA et al., 2006; CURLEVSKI et al., 2010a, GLEANSON et al., 2010).

Devido à importância dos micro-organismos em geral, muitos estudos têm sido realizados a fim de determinar os fatores que regulam as comunidades microbianas ao longo de escalas temporais e espaciais, e o impacto de diferentes espécies de plantas sobre a diversidade microbiana (SMALLA et al., 2001). Os estudos sobre o impacto de alterações ambientais em comunidades microbianas e suas atividades são restritos a avaliações de parâmetros genéricos como a biomassa microbiana, atividade respiratória, atividades enzimáticas e contagem de micro-organismos (ØVREÅS et al., 1997; LAMBAIS et al., 2005; TÓTOLA, CHAER, 2002). Esses parâmetros em conjunto com parâmetros bioquímicos são sensíveis indicadores de estresses ecológicos. Mudanças na biomassa microbiana podem explicar muitos processos ecológicos no solo. A biomassa microbiana é considerada a parte viva da MOS e geralmente compreende 1 a 5% do total da mesma. Por ser um atributo altamente dinâmico, a biomassa microbiana responde rapidamente a mudanças ecológicas em diferentes solos (JIN-PING et al., 2009).

Esses parâmetros genéricos são importantes e suficientes para detectar determinados impactos ambientais, mas a introdução de técnicas moleculares baseadas na análise do DNA total extraído diretamente de amostras ambientais sem a necessidade de cultivo prévio dos micro-organismos tem sido um grande avanço nos estudos da ecologia microbiana (MUYZER; SMALLA, 1998; ØVREÅS et al., 1997; MUYZER et al., 1993).

Atualmente não há levantamentos sobre a diversidade fúngica do solo com uma identificação precisa das espécies que permitam extrapolar a real diversidade desses organismos tanto em solos agrícolas quanto em solos florestais. Para regiões de clima temperado há disponível um grande número de estudos comparando a diversidade de espécies e a frequência de isolamento em solos sob diferentes tipos de usos ou que sofreram impacto humano (CHRISTENSEN, 1981; ANDERSON et al., 2003; DEACON et al., 2006; WALLENSTEIN et al., 2007). Sugere-se que a diversidade de fungos nos trópicos seja maior do que em regiões temperadas e que os poucos gêneros e nichos

ecológicos estudados não fornecem informações adicionais ao que já se sabe dos 5% dos fungos conhecidos na Terra (HAWKSWORTH, 2001).

Em relação aos solos da Mata Atlântica, poucos são os trabalhos desenvolvidos nessa área. Miranda (2007) avaliou a diversidade de oomicetos em amostras de solo e em corpos d'água no Parque Estadual da Serra da Cantareira, um fragmento da Mata Atlântica localizado no estado de São Paulo. Foi utilizada uma metodologia dependente de cultivo que permitiu o isolamento de 213 oomicetos de uma grande variedade de táxons. Pires-Zottarelli e Gomes (2007) fizeram um estudo sobre a diversidade de fungos do filo Chytridiomycota na Reserva Biológica de Paranapiacaba, um fragmento de Mata Atlântica localizado em Santo André, SP. Foram identificadas 29 espécies de fungos, sendo que uma das espécies foi registrada pela primeira vez no Brasil.

Um dos poucos estudos que investigou a comunidade total de fungos do solo da Mata Atlântica foi realizado no município de Cubatão, SP. Neste estudo foram analisadas comunidades de fungos de amostras de água, solo e folheto através da metodologia de iscas para isolamento de fungos zoospóricos, e metodologia de cultivo para os demais grupos. Ao todo foram obtidos 280 taxons de fungos, sendo que 23 espécies deste estudo foram reportadas pela primeira vez no Brasil (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006). Vale ressaltar que em nenhum desses trabalhos foram utilizadas técnicas moleculares e que todos se restringiram a avaliação de grupos específicos.

3.1.4 Fatores que influenciam os microrganismos do solo

O solo é um ambiente fundamental, complexo e dinâmico. Os organismos que nele vivem compõem a macrofauna, mesofauna, microfauna e microbiota. No entanto, aproximadamente 80-90% dos processos bioquímicos que ocorrem no solo são mediados por micro-organismos (NANNIPIERI et al., 2003). Os micro-organismos do solo são fundamentais para a manutenção e o funcionamento de solos naturais e agrícolas devido à sua participação na estruturação do solo, fixação biológica do nitrogênio, decomposição da matéria orgânica, incluindo xenobióticos, remoção de toxinas e ciclagem de nutrientes (GARBEVA et al., 2004; GOMES et al., 2003;

MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; HILL et al., 2000; KIRK et al., 2004). As características biológicas do solo são afetadas diretamente pela matéria orgânica, pois esta atua como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes, e sua mineralização pode servir como fonte de energia para micro-organismos heterotróficos (BAYER et al., 2008; CRASWELL; LEFROY, 2001).

Em ambientes tropicais e subtropicais, a matéria orgânica do solo (MOS) tem grande importância como fonte de nutrientes, na retenção de cátions, complexação de elementos tóxicos e de micronutrientes, infiltração e retenção de água, aeração, e estabilidade da estrutura do solo (BAYER et al., 2008). A MOS apresenta uma fração que pode ser prontamente degradada pelos microrganismos, bem como frações mais recalcitrantes. As substâncias húmicas constituem a maior parcela do compartimento de carbono estável da MOS (MIRANDA et al., 2007)

A biomassa microbiana do solo (BMS) é uma importante fonte de matéria orgânica, sendo constituída principalmente pelos organismos pertencentes aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya. Dentro do domínio Eukarya, destaca-se a biomassa fúngica e de nematóides. Como a decomposição e a mineralização dos resíduos vegetais dependem da atividade microbiana, a avaliação da biomassa fornece informações importantes para o entendimento da ciclagem de nutrientes. Dentre os micro-organismos que compõem a biomassa do solo, os fungos merecem destaque por se tratarem do principal grupo decompositor da matéria orgânica complexa, degradando a lignina e celulose, além de outros componentes amplamente encontrados em áreas florestais (CHRISTENSEN, 1989; THORN, 1997, DORAN, ZEISS, 2000; HILL et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que tanto a qualidade quanto a quantidade de matéria orgânica podem afetar significativamente a diversidade microbiana do solo e a estrutura de suas comunidades (KIM et al., 2002; GILLEVET et al., 2009; NIELSEN et al., 2010; CHAPMAN; NEWMAN, 2010). A atividade microbiana também pode ser controlada pela umidade do solo, temperatura e pH (HOUSTON et al., 1998; KIM et al., 2002). O pH é um fator limitante para o crescimento de micro-organismos. Enquanto a maioria das bactérias crescem em pH 6,0 e 8,0 e poucas crescem em pH 4,0, a maioria dos fungos filamentosos e leveduras são mais tolerantes a variações de pH, crescendo em pH 5,0

a 6,0 e podem ser bem adaptados em pH menor que 5,0. Dependendo da acidez ou alcalinidade do solo, há o favorecimento de um ou outro grupo (STANDING, KILLHAM, 2007).

A água é um fator essencial para a vida no solo, mas também pode ser um fator limitante. Alto teor de umidade no solo pode provocar uma condição anaeróbia, sendo desfavorável à produção de biomassa microbiana (SIX et al., 2006). Da mesma maneira, a temperatura afeta as células microbianas, pois pode alterar reações fisiológicas e metabólicas, sendo determinante tanto na distribuição quanto na atividade dos organismos do solo. Altas temperaturas podem alterar funções metabólicas, ocasionando mudanças na estrutura das moléculas e na ação de enzimas (STANDING, KILLHAM, 2007).

O estado nutricional do solo também pode afetar a diversidade e estrutura das comunidades microbianas (LAMBAIS et al., 2005). Em solos com altas concentrações de nutrientes disponíveis predominam bactérias do filo *Proteobacteria*, enquanto que em solos com baixa disponibilidade de nutrientes o filo predominante é o *Acidobacteria*, sendo a razão entre a abundância da primeira em relação a segunda um possível indicador do estado trófico do solo (SMIT et al., 2001). Altas concentrações de matéria orgânica selecionam bactérias do filo *Proteobacteria* (McCaig et al., 2001).

A MOS tem origem e natureza química muito complexas, sendo constituída principalmente por três frações, com base em sua solubilidade em meio ácido e alcalino: ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina. AF é a fração alcalino-solúvel que se mantém em solução após acidificação, AH é a fração alcalino-solúvel que se mantém insolúvel após acidificação e a humina é a fração insolúvel em meio alcalino (GUERRA et al., 2008). Os AF correspondem à fração menos complexa e de maior biodegradabilidade e são reciclados a cada 100 anos enquanto que os AH e humina possuem elevada estabilidade química e demoram cerca de 1000 anos para serem reciclados, acumulando-se lentamente no perfil do solo. A relação da comunidade fúngica com a matéria orgânica, principalmente com as frações mais recalcitrantes, se deve a especialidade desses micro-organismos em degradar substâncias que persistem mais no ambiente (SANTOS, et al., 2008).

Vários trabalhos têm demonstrado que diferentes espécies de árvores possuem a capacidade de selecionar determinadas comunidades de fungos (MYERS et al., 2001; LEJON et al., 2005; DE BELLIS et al., 2007). De Bellis et al. (2007) estudaram a relação entre grupos de fungos do solo e comunidades de plantas em uma floresta boreal em Québec, Canadá, através de métodos de lavagem de solo e sequenciamento de DNA. Através de análise multivariada, pôde-se observar que as espécies de fungos estiveram relacionadas com as espécies vegetais e não com as propriedades químicas do solo.

O tipo de vegetação também influencia as propriedades físico-químicas e a composição da matéria orgânica do solo (Nielsen et al., 2010). Dessa maneira, em regiões de clima temperado, com formações vegetais homogêneas e menor riqueza de espécies de plantas, é possível prever as comunidades de fungos mais frequentes (BILLS et al., 2004). Essa afirmação é baseada na suposição de que há uma correlação entre a comunidade de fungos, o tipo de vegetação e as condições edafo-climáticas. No entanto, o que já foi alcançado com relação ao conhecimento das comunidades de fungos do solo nas formações vegetais homogêneas, ainda precisa ser extrapolado para as florestas tropicais (PFENNING; ABREU, 2006).

Os restos vegetais selecionam diferentes comunidades de fungos devido às diferenças nos componentes químicos, uma vez que a permanência de uma população no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e de resposta às características ambientais (PERSIANI, 1998; DE BELLIS et al., 2007). Além disso há relatos de que plantas podem causar mudanças nas propriedades do solo que levam a interações complexas com a vegetação, podendo influenciar a comunidade fúngica do solo (JIN-PING et al., 2009).

Myers e colaboradores (2001) realizaram um estudo em Michigan, nos Estados Unidos, e verificaram que ecossistemas florestais distintos, em relação às espécies de árvores e características edáficas, diferiram na composição das comunidades de bactérias, fungos e protozoários do solo e no uso do substrato. Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo sobre a estrutura da comunidade microbiana realizado na França (LEJON et al., 2005) que constatou forte influência de espécies de árvores sobre a estrutura das comunidades de bactérias e fungos de um solo ácido sob floresta. É possível que o impacto das espécies de árvores na diversidade microbiana do solo

esteja relacionado às características da matéria orgânica do solo. Correlação entre a composição das comunidades de fungos e de plantas foi também observada em uma floresta boreal mista, no oeste do Canadá, através do sequenciamento da região ITS do rDNA de fungos (DE BELLIS et al., 2007).

A rizosfera também exerce grande influência na comunidade microbiana do solo, pois é nesta zona que se concentra a maior parcela da diversidade de micro-organismos nos solos. A alta influência das raízes se deve à intensa atividade microbiana, pela presença de secreções e exsudatos das raízes, que contribuem com diferentes fontes de carbono e nitrogênio prontamente disponíveis, favoráveis à sobrevivência e multiplicação de microrganismos capazes de metabolizá-las (HATTORI et al., 1998)

3.1.5 Técnicas moleculares para estudo da diversidade de fungos do solo

O desenvolvimento de técnicas baseadas em análises de DNA tem permitido o estudo de comunidades microbianas complexas, pois muitas vezes o inventário da diversidade de fungos em amostras de solo através de técnicas de cultivo é comprometido pelo fato de alguns grupos, como os fungos micorrízicos arbusculares, serem de natureza biotrófica e, por isso não poderem ser cultivados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; VAN ELSAS et al., 2000). Já outros, como os Basidiomycota, por exemplo, são difíceis de serem isolados e, geralmente, não produzem esporos em cultura axênica (THORN et al., 1996). Além disso, técnicas dependentes de isolamento podem favorecer organismos de crescimento rápido e grupos específicos, dependendo das exigências fisiológicas e de crescimento do micro-organismo (BRIDGE; SPOONER, 2001).

As limitações na identificação de fungos por técnicas baseadas em cultivo favoreceram a intensificação do uso de métodos moleculares, que podem acessar uma maior diversidade destes organismos (BRIDGE; SPOONER, 2001). Esses métodos oferecem respostas a perguntas sobre a diversidade microbiana e permitem acompanhar o destino de populações introduzidas no meio ambiente (ROSADO; DUARTE, 2002). Essas metodologias, aliadas aos avanços da bioinformática e aos

métodos de análise estatística, são ferramentas promissoras para estudos de caracterização da diversidade microbiana e sobre como as comunidades microbianas se organizam em diferentes ambientes (LAMBAIS et al., 2005).

A maioria dos métodos moleculares para o estudo da ecologia de micro-organismos baseia-se em técnicas de amplificação específica por PCR (reação em cadeia da polimerase) usando ácidos nucléicos diretamente extraídos do solo (HOLBEN et al., 1988; TREVORS; VAN ELSAS, 1995). Os métodos para identificação molecular de espécies de fungos têm sido, em sua grande parte, baseados em ITS rDNA (regiões intergênicas transcritas do DNA ribossomal) (VAN ELSAS et al., 2000). Por outro lado, as sequências da subunidade menor do rRNA, que evoluem mais lentamente, podem servir como marcadores para grupos taxonomicamente mais distantes, facilitando a resolução da diversidade fúngica total do sistema (WHITE et al., 1990).

O estabelecimento de uma relação entre filogenia e função metabólica no ambiente pressupõe que propriedades funcionais são conservadas entre populações filogeneticamente relacionadas. A aplicação de metodologias independentes de cultivo tem revelado uma enorme diversidade de micro-organismos nos solos, sem, no entanto, elucidar suas funções nos diferentes processos biogeoquímicos (LAMBAIS et al., 2005). Assim, postula-se que os processos bioquímicos realizados por micro-organismos cultiváveis que já foram caracterizados nestas funções, são também realizados por não-cultiváveis filogeneticamente relacionados (VAN ELSAS et al., 2000).

Diversas técnicas moleculares permitem a análise de comunidades de fungos de solo. Segundo Kennedy e Clipson (2003), dentre as mais importantes, podem-se citar: eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP), polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) e análise automatizada de espaçadores intergênicos ribossomais (ARISA). Essas técnicas são baseadas em padrões de bandamento e são utilizadas para investigar mudanças sazonais e variações espaciais em comunidades fúngicas do solo (VAN ELSAS et al., 2000; ANDERSON et al., 2003; LIM et al., 2010)

A técnica PCR-DGGE foi desenvolvida originalmente para pesquisa médica a fim de analisar mutações pontuais do DNA (FISCHER; LERMAN, 1980). Foi introduzida

no estudo da ecologia microbiana por Muyzer et al. (1993) e é considerada uma das técnicas de *fingerprinting* mais utilizadas para análises de comunidades de fungos e bactérias do solo. Apesar destas novas ferramentas moleculares contribuírem para estudos da biodiversidade, as técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo são também essenciais para o conhecimento das capacidades metabólicas e das características fenotípicas dos micro-organismos, sendo necessária uma abordagem polifásica por meio de vários enfoques, para se chegar, o mais próximo possível, do quadro real de um ambiente (MUYZER; SMALLA, 1998).

Com as técnicas de fingerprinting não é possível uma caracterização taxonômica dos micro-organismos presentes na amostra. Isso só é possível com o uso conjunto de sequenciamento de fragmentos diagnósticos de DNA. O sequenciamento de determinadas regiões do rDNA (18S, 16S e ITS) a partir de amostras ambientais tem auxiliado no conhecimento da estrutura das comunidades e na diversidade de procariotos e eucariotos (ANDERSON et al., 2003; LAMBAIS et al., 2005; GILLEVET et al., 2009).

Recentemente, estudos de diversidade microbiana ambiental vem sendo feitos com nível de detalhamento jamais imaginado devido ao surgimento e desenvolvimento de técnicas de sequenciamento em larga escala, como por exemplo, o pirosequenciamento. Exemplos disso são os estudos conduzidos por Buée e colaboradores (2009) e Lim e colaboradores (2010) em amostras de solos florestais.

Buée et al. (2009) estudaram seis diferentes solos florestais da região de Burgundy na França, através de pirosequenciamento da região ITS do rDNA, e identificaram entre 600-1000 UTOs em cada amostra de solo florestal (4 g) identificando entre 249 e 409 grupos taxonômicos. A maioria das UTOs (81%) encontradas foram relacionadas aos filos Basidiomycota e Ascomycota, sendo a maioria das sequências referentes a *Ceratobasidium* sp., *Cryptococcus podzolicus*, *Lactarius* sp. e *Scleroderma* sp., do filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes.

Lim e colaboradores (2010) ao avaliarem a diversidade de fungos de solos de três ilhas na Coreia e China através de pirosequenciamento da região do gene do rRNA 18S, obtiveram 372 taxa a partir de 9698 sequências analisadas. A maioria das

sequências analisadas foi relacionada também aos filos Basidiomycota e Ascomycota, ocorrendo a predominância desse último.

Segundo Buée et al. (2009), ainda há um alto número de erros de anotação taxonômica e erros em atribuições taxonômicas no depósito de sequências da região ITS do rDNA em bancos de dados internacionais de sequências de DNA o que implica em uma grande quantidade de sequências de fungos não classificadas. Essas são as maiores limitações na pesquisa sobre diversidade de fungos em geral. No entanto, a utilização de técnicas como o pirosequenciamento poderão acelerar o estudo das comunidades de fungos em ecossistemas florestais (BUÉE et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e amostragem

Este estudo foi realizado em uma parcela permanente de 10 ha no Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB), na cidade de Sete Barras (SP) (Figura 1), caracterizada em detalhes no projeto “Diversidade, dinâmica e conservação em Florestas do Estado de São Paulo: 40ha de parcelas permanentes” do Programa BIOTA/FAPESP (RODRIGUES, 2005). Nesse projeto foram instaladas parcelas permanentes de 320 x 320 m no Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), Estação Ecológica de Assis (EEA), Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) e Estação Ecológica do Caetetus (EEC) com uma área total de 10,24 ha subdividida em 256 sub-parcelas contíguas de 20 x 20 m (400 m²). Os indivíduos arbóreos contidos em cada sub-parcela estão numerados e georreferenciados, permitindo a precisa localização dos mesmos.

O PECB é constituído de uma Floresta Ombrófila Densa Montana ou Floresta Atlântica de Encosta, e está situado na região sul do Estado de São Paulo (24°00' – 24°15'S, 47°45' a 48°10'W), inserido na Serra de Paranapiacaba (Figura 1). A área total do parque é de 375km² abrangendo os municípios de São Miguel Arcanjo, Sete Barras e Capão Bonito. A altitude varia entre 30 e 1000m com temperaturas médias de 22 °C no verão e 18 °C no inverno, com ausência de estação seca. No local de amostragem foram registradas temperaturas entre 16 e 27 °C durante o período entre primavera e verão, e entre 10 e 24 °C durante outono e inverno, e a umidade relativa do local foi de cerca de 90%. Segundo Rodrigues (2002), a região é caracterizada predominantemente por períodos de excedentes hídricos oscilando entre 218 e 518 mm, concentrando-se principalmente entre os meses de outubro e março. Nos outros meses, entre abril e setembro, esse excedente hídrico diminui consideravelmente, havendo em alguns anos a ocorrência de déficits hídricos consideráveis.

O solo é classificado predominantemente como Cambissolo sendo argiloso ou arenoso-argiloso com cascalhos e variando de profundos a pouco profundos (RODRIGUES, 2004).

No parque foram coletadas amostras de solo sob a projeção da copa de árvores das espécies *Ocotea dispersa*, *Ocotea teleiandra*, *Mollinedia schottiana* e *Tabebuia serratifolia*, a fim de determinar o nível de variação das estruturas de suas comunidades na área, em função da posição geográfica, e sua possível relação com a espécie vegetal sob a copa da qual a amostra foi coletada.

As amostras foram coletadas em duas épocas do ano: Setembro de 2008 (baixa pluviosidade) e Fevereiro de 2009 (alta pluviosidade), para determinar se existe variação sazonal das estruturas das comunidades de fungos no solo. A amostragem foi feita sob a projeção da copa de 4 indivíduos de cada espécie nas duas épocas do ano, totalizando 32 amostras (Figura 2). Foram amostradas cerca de 500 a 1000 g de terra da camada de 0-20 cm de profundidade sob a copa das árvores, utilizando-se um trado. As amostras foram constituídas de três subamostras, as quais foram homogeneizadas em um saco plástico, formando então uma amostra composta, a qual foi devidamente identificada e armazenada a 4° C para análises químicas, MOS e biomassa microbiana e a -80° C para as análises moleculares (Figura 3).

Os dados referentes à pluviosidade e temperatura da área de coleta foram obtidos no website do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - Ciiagro (<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>). A partir dos dados semanais de temperatura e pluviosidade do município de Sete Barras foram inferidos dados médios desses fatores para o PECB, considerando-se os valores semanais do mês em que foi realizada a coleta (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores referentes à temperatura média e pluviosidade na área de coleta, durante as duas épocas de amostragem (alta - AP e baixa BP pluviosidade)

Atributo	PECB	
	BP	AP
Precipitação (mm)	90,5	243,8
Temperatura (°C)	21	27

Fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - Ciiagro

Os dados referentes à composição física dos solos das áreas de coleta foram obtidos através do banco de dados do Laboratório de Ecologia e Restauração Florestal – (LERF) (<http://lmq.esalq.usp.br/biotapp/>) Em um projeto anterior, foram determinadas

as quantidade de silte, argila e areia das parcelas onde foram coletadas as amostras de solo. Pelos dados obtidos pôde-se verificar que das 12 parcelas onde as amostras foram coletadas, 7 apresentam textura média (menos de 35% de argila) e 5 textura argilosa (mais que 35% de argila) (SANTOS et al., 2005).

Tabela 2 - Análise física dos solos coletados sob a copa de *Ocotea dispersa* (OD), *Ocotea teleiandra* (OT), *Mollinedia schottiana* (MS) e *Tabebuia serratifolia* (TS)

Amostras	Parcela	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)
OD 379	D0	49	15	36
OD 407	E0	53	10	37
OD 2782	E5	61	14	25
OD 2691	B5	50	13	37
OT 2847	F5	52	16	32
OT 4731	F7	43	15	42
OT 8844	H10	43	11	46
OT 1839	D2	51	15	34
MS 391	E0	53	10	37
MS 4781	E5	61	14	25
MS 8879	H10	43	11	46
MS 4616	D7	63	12	25
TS 86	B0	61	17	22
TS 4732	F7	43	15	42
TS 8808	H10	43	11	46
TS 1156	B3	61	12	27

Fonte: Banco de dados do Laboratório de Ecologia e Restauração Florestal (LERF)

Figura 1 - Localização do Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) na cidade de Sete Barras (SP)

Parque Estadual Carlos Botelho(PECB)

Parcela Permanente (PECB)

Figura 2 – Mapa da Parcela Permanente do Projeto BIOTA/FAPESP no Parque Estadual Carlos Botelho contendo a Parcela Permanente do Projeto BIOTA/FAPESP. Os símbolos representam a localização das espécies arbóreas sob as quais as amostras de solo foram coletadas

Figura 3 – Coleta das amostras de solo. **A.** Coleta das 3 subamostras. **B.** Marcação das subparcelas no PECEB. **C.** Marcação das árvores nas subparcelas

4.2 Análises químicas

As amostras de solo foram secas em estufa a 60 °C, moídas e passadas em peneira de 2 mm. A caracterização química do solo foi realizada em todas as amostras compostas em estudo, conforme a metodologia proposta por RAIJ et al. (2001). A acidez ativa do solo foi determinada através da medição do pH em solução de CaCl_2 e a acidez potencial do solo determinada pela concentração de H^+/Al^3+ em solução SMP. A determinação da quantidade de matéria orgânica do solo (MOS) foi feita por colorimetria após oxidação por dicromato. Os elementos fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram extraídos do solo por resina trocadora de íons. Ca e Mg foram mensurados por absorção atômica, e o P foi quantificado por colorimetria usando molibdato. O potássio (K) e o sódio (Na) foram extraídos do solo com solução Mehlich-1 e seus teores foram determinados por espectrofotometria de chama. A capacidade de troca de cátions (CTC) foi obtida através da soma das concentrações de cátions Ca, Mg, K e H^+/Al^3+ . O alumínio trocável (Al troc.) foi extraído com solução KCl 1 M e mensurado por titulação com solução NaOH 0,025 mol L^{-1} . Al total foi determinado de acordo com o método epa 3050 B proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA) (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>). Os teores

totais de carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre (S) foram determinados em analisador elementar Flash EA 1112 (Thermo Finningan Itália, Milan, Itália). A quantidade de íons na solução do solo foi determinada por condutividade elétrica (CE), medida em condutivímetro. A soma de bases trocáveis (SB) foi obtida através da soma de Ca, Mg e K, e a saturação por bases (V%) foi mensurada pela razão entre SB e CTC multiplicado por 100.

Os dados químicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc.) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3 Fracionamento da Matéria Orgânica do solo (MOS)

O fracionamento químico da MOS dos solos estudados foi realizado de acordo com a metodologia proposta pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SWIFT, 1996). Uma alíquota de 10 g de solo seco isento de raízes foi peneirada em malha de 2mm. As amostras então foram agitadas por 12 h em 200 mL de uma solução de NaOH 0,1 N e depois centrifugadas por 30 minutos a 14481 g. O sobrenadante foi coletado, centrifugado novamente a 14481 g por 30 minutos. Foi adicionado HCl 6M às amostras até pH 1-2 e então deixadas em repouso por um período de 12-16 h para decantação. A solução isenta de sólidos foi sifonada e centrifugada durante 30 minutos a 14481 g para recuperação dos ácidos fúlvicos. O precipitado contendo ácidos fúlvicos foi colocado para secar a 45 °C e depois as cinzas foram corrigidas com queima em mufla por 4 horas a 600 °C. O precipitado contendo ácidos húmicos foi redissolvido em água e seco em estufa.

Os dados do fracionamento da MOS foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc.) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.4 Carbono da biomassa microbiana do solo

A quantidade de carbono na biomassa microbiana do solo foi determinada pelo método da fumigação-extração (FE) proposto por Vance e colaboradores (1987). As amostras de solo foram peneiradas (peneiras de 2 mm) e dessas amostras, separou-se uma alíquota de 10 g para fumigação, 10 g para controle de cada amostra e 10 g para determinação do peso seco. A umidade do solo foi ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção de água no solo.

A fumigação foi feita em um dessecador na presença de clorofórmio durante 24 h. O material celular liberado pelo rompimento das células microbianas foi recuperado com sulfato de potássio (K_2SO_4) 0,5M logo após a fumigação. Após a adição do extrator na amostra tanto fumigada quanto não-fumigada, 10 mL do filtrado foi separado e adicionou-se 1mL de dicromato de potássio $66,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ($K_2Cr_2O_7 \cdot 7H_2O$) e 10 mL de uma solução de ácido sulfúrico H_2SO_4 e ácido fosfórico H_3PO_4 (2:1 v/v). Colocou-se a solução em banho-maria por 1 h a $90^\circ C$ e depois adicionado 10 mL de água deionizada e feita a titulação. A titulação para a determinação do carbono nos extratos foi feita com sulfato ferroso amoniacal ($FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$) $33,3 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando-se como indicador a difenilamina sulfonato de bário (1%).

O carbono presente na amostra foi determinado pela seguinte equação: $C_{\text{biomassa}} = (C_f - C_{nf})/k_c$, sendo C_f (C da subamostra fumigada, em mg kg^{-1}), C_{nf} (C da subamostra não fumigada, em mg kg^{-1}) e k_c (fator de correção 0,4) (ROSCOE et al., 2006). Os resultados foram expressos em mg C por quilograma de solo seco.

Os dados de carbono da biomassa microbiana foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc.) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.5 Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído utilizando-se o “Fast DNA kit” (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1X TAE-1,0%, depois de

corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por fluorimetria utilizando-se um fluorímetro “Qubit®” (Life Technologies, São Paulo, Brasil)

4.6 Amplificação da região ITS do rDNA através de PCR

A região ITS do rDNA foi amplificada por nested PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os seguintes iniciadores: primeira reação: EF4 (5' AAGGG[G/A]TGTATTTATTAG 3') (SMIT et al., 1999) e ITS4 (5' CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG 3') (WHITE et al., 1990) e para a segunda reação: ITS1-F-GC (5' CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC G CTTGGTCATTTAGAGG AGTAA 3') (GARDES & BRUNS, 1993) e ITS2 (5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3') (ANDERSON et al, 2003). A reação de amplificação do DNA foi feita com 25 ng do DNA metagenômico, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 mM de MgCl₂, 10x buffer [10nM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCl, 0,1 % Triton R X-100], 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP,dTTP) e 1,5 U Taq DNA polymerase (Fermentas). As condições da primeira reação da PCR foram: 94 °C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 94 °C por 5 minutos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minutos e 30 segundos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos. Para a segunda reação da PCR foram usadas as seguintes condições: 94 °C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos . A quantificação dos amplicons resultantes foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão TAE. Como padrão de tamanho do fragmento de DNA foi utilizado o marcador Low DNA Mass Ladder (Life Technologies, São Paulo, Brasil). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o vetor pGEM®-3Zf(+) (200 ng/μL) (Promega, Madison, Winscosin, EUA).

4.7 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

Os amplicons das regiões ITS (aproximadamente 200 ng de cada amostra) foram separados por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

(DGGE). A análise em DGGE foi realizada no aparelho Phor-U2 system (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante variando de 30 a 50% de desnaturação, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida. Os géis foram submetidos à eletroforese por 16 horas a 100 V. Após a eletroforese os géis foram corados com nitrato de prata (0,2%) (BLUM et al., 1987) e digitalizados em Imagequant 300 versão 1.0.0 (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

A similaridade entre as estruturas de comunidades de fungos foi determinada com base na presença ou na ausência de amplicons detectados após DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database (BioRad, Hercules, CA, USA) para determinação da riqueza de amplicons (Sa). Os perfis de bandas após DGGE foram analisados utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários (presença e ausência de bandas) através de uma análise discriminante e de redundância canônica (RDA), juntamente com aos fatores ambientais e frações da MOS. Para tal análise foi utilizado o programa Canoco for Windows 4.5, avaliando-se a significância (valor *p*) dos fatores ambientais na distribuição das amostras por meio do teste de permutação de Monte-Carlo, considerando-se 999 permutações aleatórias.

4.8 Clonagem e sequenciamento da região ITS do rDNA

Para avaliar a diversidade das comunidades de fungos do solo foram selecionadas amostras coletadas sob a projeção da copa das diferentes espécies e nas diferentes épocas para construção de bibliotecas de clones da região ITS. Para isso, o DNA extraído do solo, das quatro repetições de cada amostra, foi amplificado separadamente por PCR e posteriormente os produtos das amplificações foram misturados, formando uma amostra composta.

A região ITS do rDNA de fungos foi amplificada por nested PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os seguintes iniciadores: primeira reação: EF4 (5' AAGGG[G/A]TGTATTTATTAG 3') (SMIT et al., 1999) e ITS4 (5' CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG 3') (WHITE et al., 1990) e para a segunda reação: ITS1-F-GC (5' CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC G CTTGGTCATTTAGAGG AGTAA 3') (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS2 (5'

GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3') (ANDERSON et al, 2003). A reação de amplificação do DNA foi feita com 25 ng do DNA metagenômico, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 mM de $MgCl_2$, 10x buffer [10mM Tris-HCl (pH9.0), 50 mM KCl, 0,1 % Triton R X-100], 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP,dTTP) e 1,5 U Taq DNA polymerase (Fermentas). As condições da primeira reação da PCR foram: 94 °C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 94 °C por 5 minutos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minutos e 30 segundos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos. Para a segunda reação da PCR foram usadas as seguintes condições: 94 °C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, com extensão final de 72 °C por 5 minutos .

Os produtos da segunda reação de PCR foram purificados usando Invisorb Fragment CleanUp (Invitex, Berlin, Alemanha) e ligados em "pGEM-T Easy Vector" (Promega, Madison, WI, USA) a 4 °C durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (200 μ L) por choque térmico (gelo por 30 minutos, banho-maria 42 °C por 30 segundos e gelo por 2 minutos) utilizando-se a reação de ligação obtida. Posteriormente foi adicionado 1 mL de meio CG (Circlegrow, MP Biomedicals, Ohio, USA) e incubado sob agitação (agitador incubador Innova 4300, LabX, Midland, Canadá) a 37 °C por 1 hora a 200 rpm. As células transformadas foram então plaqueadas em ágar CG contendo ampicilina (100 mg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosídeo) e incubadas a 37 °C por 12 horas.

Colônias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas e cultivadas em placas altas de crescimento (96 poços) contendo meio líquido CG com ampicilina (100 mg mL⁻¹) a 37 °C sob agitação (300 rpm) durante 18 horas e seladas com adesivo. O meio foi centrifugado a 2.254 g por 6 minutos a 20 °C. O pélete foi lavado com 240 μ L de solução contendo 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA (pH 8,0) e 50 mM de glicose e agitado em vórtex por 2 minutos para ressuspender o pélete. Em seguida, as suspensões bacterianas foram centrifugadas por 6 minutos a 2.254 g para sedimentação das células. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 80 μ L da mesma solução e as células ressuspensas por agitação. Para uma placa de fundo "U" (96 poços) contendo 1 μ L de RNase em cada poço (10 mg mL⁻¹) foram transferidos 60

μL de cada suspensão de células. Em cada poço da placa foram adicionados 60 μL da solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,2 N). A placa foi selada, homogeneizada por inversão e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação rápida, foram adicionados 60 μL da solução contendo acetato de potássio 3 M e 10% de ácido acético glacial, misturando-se por inversão. A placa foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, e incubada aberta em estufa a 90 °C por 30 minutos. Após esse tempo, a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos. O adesivo foi recolocado e a placa centrifugada a 2.254 g por 4 minutos e 20 °C. Em seguida, transferiu-se 100 μL do sobrenadante para placa de 96 poços Millipore (MSGV N22) fixada sobre uma placa de fundo "V" de 250 μL , e o conjunto centrifugado (sem tampa) a 2.254 g por 4 minutos a 4 °C. Ao filtrado adicionou-se 100 μL de isopropanol gelado e em seguida centrifugou-se a 2.254 g por 45 minutos a 4 °C. O precipitado de DNA foi então lavado com 180 μL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 4000 g por 5 minutos e 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel absorvente e centrifugou-se a 1140 g por 1 minuto a 4 °C. Após secar durante 1 hora a temperatura ambiente, o DNA foi ressolubilizado em 80 μL de água ultrapura esterilizada, durante a noite. As placas foram estocadas a -20 °C para serem posteriormente utilizadas no sequenciamento do DNA.

Para o sequenciamento dos clones utilizou-se uma alíquota de 200-500 ng do DNA plasmidial, 10 pmol do iniciador M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') (LAMBAIS et al., 2006), 1 μL de "DYEmanic ET Terminator" (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), 2 μL de tampão de sequenciamento Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e água ultrapura para um volume final de 10 μL . A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) nas seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 1 minuto a 60 °C. Os produtos de PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95% gelado. As suspensões foram centrifugadas a 2254 g por 45 minutos, e o pélete lavado com etanol 70%, gelado. O pélete foi seco no escuro por no mínimo 2 horas, ressolubilizado em formamida e desnaturado a 96 °C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado

em um sequenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 Análise das sequências da região ITS do rDNA

As sequências foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20) e sequências do vetor. A similaridade com sequências de DNA existentes no banco de dados do GenBank foi determinada pelo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no NCBI (ALTSCHUL et al., 1990). Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para isso, uma matriz de distância evolutiva foi calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do PHYLIP 3.63, a partir do alinhamento feito no Clustal X 2.0 (LARKIN et al., 2007), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1). As sequências com similaridade >97% foram consideradas pertencentes à mesma UTO.

A estimativa de riqueza de UTOs, pelos métodos não-paramétricos ACE-1 (CHAO; LEE, 1992) e o Chao1 (CHAO, 1984), dos índices de diversidade de Shannon, recíproco do índice de Simpson e a cobertura de amostragem foram realizadas com o programa SPADE (CHAO; SHEN, 2003). A comparação das bibliotecas de clones da região ITS foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SCHLOSS et al., 2004), após o alinhamento das sequências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do solo

Para melhor entender a evolução da comunidade microbiana nos ecossistemas é necessário correlacionar a influência de fatores bióticos e abióticos à estrutura das comunidades e à diversidade microbiana (FAORO et al., 2010). Em nosso estudo, com exceção de H+Al, K, Na, P e CTC, os demais atributos químicos do solo apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as amostras ($p \leq 0.05$) (Tabela 4). As propriedades químicas dos solos estudados tanto na época de baixa (primeira coleta) quanto na de alta pluviosidade (segunda coleta) estão apresentadas na tabela 3.

Os valores dos atributos pH, MO (matéria orgânica), Al, Ca, V% (índice de saturação por bases) e C apresentaram diferenças significativas entre as espécies coletadas sendo que os maiores valores encontrados para pH, MO, Ca, V% e C foram relacionados às amostras coletadas sob a copa dos indivíduos de *O. dispersa* e os maiores valores para Al relacionados à espécie *O. teleiandra*.

As concentrações de Mg e S, por sua vez, apresentaram diferenças significativas em relação às épocas de amostragem, sendo os maiores valores observados na época de baixa pluviosidade (Tabelas 3 e 4). Por outro lado, a SB (soma de bases) e concentração de N no solo apresentaram diferenças significativas tanto em relação às espécies quanto às épocas coletadas. Os maiores valores para esses dois atributos foram observados nos solos sob a copa de *O. dispersa* e também na época de baixa pluviosidade.

Os solos apresentaram pH variando entre 3,46 e 3,74. As variações de pH observadas podem estar ligadas a diversos processos biológicos relacionados as diferentes espécies vegetais como a absorção de nutrientes pelas raízes das plantas, a fixação biológica do nitrogênio, e a decomposição de matéria orgânica (SERRALTA et al., 2006). Mudanças no pH do solo sob condições naturais alteram a distribuição de espécies de fungos (CABELLO; ARAMBARRI, 2002). Christensen (1969) há algum tempo já havia observado que o teor de cálcio no solo e o pH são fatores que regulam a

composição da comunidade fúngica, favorecendo o aparecimento de determinadas espécies de fungos, como por exemplo, *Trichoderma* spp.

Os teores de matéria orgânica no solo variaram de 46,27 e 76,26 g dm⁻³ para a época de baixa pluviosidade e 40,92 e 59,52 g dm⁻³ para a época de alta pluviosidade. As variações na MOS podem estar ligadas ao acúmulo diferencial de serapilheira das diferentes plantas no solo, assim como diferentes dinâmicas das microbiotas associadas (DINAKARAN; KRISHAYYA, 2010)

Nitrogênio (N) e enxofre (S) foram encontrados em quantidades muito baixas no solo, variando de 0,23 a 0,51% para o nitrogênio e 0,06 a 0,07% para o enxofre, não sendo detectados na época de alta pluviosidade. Em relação ao carbono, este foi encontrado em maior quantidade em relação a N e S (variou de 3,08 a 5,54%). Tanto para N quanto para C, os maiores valores foram encontrados no solo sob a copa de *O. dispersa* e os maiores valores de S encontrados em amostras coletadas na época de baixa pluviosidade. O fato de serem detectados apenas traços de S no solo na época de alta pluviosidade, sugere a ocorrência de lixiviação deste nutriente nessa época do ano.

O solo das parcelas permanentes do PECB é principalmente do tipo Cambissolo Háplico TB Distrófico Húmbrico. Os solos Cambissolos são caracterizados pela presença de argila com maior capacidade de retenção de cátions, o que explica os altos valores de CTC, variando de 173,52 a 233,27 mmolc.dm⁻³ (RESENDE et al., 2002).

Os solos coletados sob a copa de *O. dispersa* apresentaram textura argilosa (Tabela 2). Nesses solos também foram encontrados os maiores teores de N e de MO. Segundo Zech et al. (1997) os teores mais elevados de matéria orgânica em solos mais argilosos se devem a formação de complexos argilominerais, o que confere proteção a esses compostos contra decomposição. A elevada estabilidade química de algumas frações orgânicas é devido à alta recalcitrância das substâncias que as compõem e da baixa velocidade das transformações que elas sofrem. Adicionalmente, a maior fração do N do solo se encontra ligada à MO.

Tabela 3 - Análises químicas das amostras de solo coletadas sob a copa de 4 espécies arbóreas no PECB – época de baixa pluviosidade (BP) e alta pluviosidade (AP)

	<i>Ocotea dispersa</i>		<i>Ocotea teleiandra</i>		<i>Mollinedia schottiana</i>		<i>Tabebuia serratifolia</i>	
	BP	AP	BP	AP	BP	AP	BP	AP
pH (CaCl₂)	3,74 ^a	3,72 ^a	3,46 ^b	3,56 ^b	3,50 ^{ab}	3,60 ^{ab}	3,59 ^{ab}	3,67 ^{ab}
H+Al (mmolc.dm⁻³)	172,50 ^a	153,25 ^a	225,75 ^a	191,25 ^a	171,0 ^a	160,75 ^a	164,75 ^a	140,0 ^a
K (mmolc.dm⁻³)	2,59 ^a	2,38 ^a	1,99 ^a	1,88 ^a	2,80 ^a	1,94 ^a	2,55 ^a	2,09 ^a
Na (mmolc.dm⁻³)	1,35 ^a	1,30 ^a	1,28 ^a	1,28 ^a	1,28 ^a	1,25 ^a	1,23 ^a	1,25 ^a
MO (g.dm⁻³)	76,26 ^a	59,52 ^a	61,15 ^{ab}	54,64 ^{ab}	56,96 ^{ab}	46,27 ^{ab}	46,27 ^b	40,92 ^b
Al (mmolc.dm⁻³)	18,70 ^b	18,55 ^b	29,45 ^a	29,90 ^a	21,73 ^b	18,13 ^b	20,40 ^b	20,83 ^b
P(mg.dm⁻³)	15,96 ^a	12,31 ^a	13,08 ^a	11,35 ^a	12,31 ^a	7,88 ^a	10,19 ^a	12,88 ^a
Ca (mmolc.dm⁻³)	6,25 ^a	4,50 ^a	2,50 ^{ab}	1,75 ^{ab}	2,75 ^b	2,0 ^b	3,25 ^b	1,75 ^b
Mg (mmolc.dm⁻³)	3,0 ^a	1,50 ^b	1,75 ^a	1,50 ^b	2,75 ^a	1,75 ^b	1,75 ^a	1,25 ^b
CTC (mmolc.dm⁻³)	185,69 ^a	162,93 ^a	233,27 ^a	197,65 ^a	180,58 ^a	167,69 ^a	173,52 ^a	146,34 ^a
SB[*]	13,19 ^{a*}	9,68 ^a	7,52 ^{b*}	6,40 ^b	9,58 ^{ab*}	6,94 ^{ab}	8,77 ^{ab*}	6,34 ^{ab}
V (%)	7,64 ^a	6,04 ^a	3,21 ^b	3,22 ^b	5,43 ^{ab}	4,25 ^{ab}	5,51 ^{ab}	4,87 ^{ab}
N %[*]	0,51 ^{a*}	0,44 ^a	0,41 ^{ab*}	0,34 ^{ab}	0,44 ^{ab*}	0,24 ^{ab}	0,36 ^{b*}	0,23 ^b
C %	5,54 ^a	5,52 ^a	4,69 ^{ab}	4,55 ^{ab}	4,34 ^b	3,22 ^b	3,86 ^b	3,08 ^b
S %	0,06 ^a	< LD ^b	0,07 ^a	< LD ^b	0,07 ^a	< LD ^b	0,06 ^a	< LD ^b
C/N	10,90 ^a	12,75 ^b	11,37 ^a	13,45 ^b	10,20 ^a	13,20 ^b	10,63 ^a	12,67 ^b

Os valores correspondem à média de 4 repetições

SB – soma de bases trocáveis (Ca, Mg, K, H+Al).

V – índice de saturação por bases

Letras iguais dentro da mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05)

< LD – abaixo do limite de detecção

*diferiram entre espécies e entre época

Tabela 4 – Valores de p para Teste de F para os atributos químicos do solo

	Espécies	Épocas
pH	0.0159*	0.239
H+Al	0.0596	0.1713
K	0.543	0.142
Na	0.811	0.846
MO	0.0261*	0.1059
Al	0.00029*	0.7556
P	0.8018	0.536
Ca	0.0161*	0.1726
Mg	0.2829	0.1829
CTC	0.8522	0.6407
SB	0.04212*	0.0466*
V	0.0153*	0.317
N	0.044*	0.0103*
C	0.0043*	0.285
S	0.964	0.0*
C/N	0.959	0.0003*

* apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey $p \leq 0.05$)

5.2 Fracionamento da Matéria Orgânica do solo (MOS)

A MOS foi fracionada em humina, ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). As concentrações de humina e AF não apresentaram diferenças significativas tanto em relação a espécies quanto em relação a épocas. Por outro lado, as concentrações de AH apresentaram diferenças significativas em relação às espécies, mas não em relação a épocas, já que é uma fração estável e não seria esperada uma variação sazonal (Tabela 5).

O solo sob a copa de *O. dispersa* apresentou maior porcentagem de AH do que o solo sob a copa de *T. serratifolia*, tanto na época de BP quanto na de AP. Como mostrado anteriormente, o solo sob a copa de *O. dispersa* também apresentou maior porcentagem de N. Kuwatsuka e colaboradores (1978) sugerem que os AH apresentam maior teor de N do que as demais frações e que esse enriquecimento relativo de N nessa fração indica o primeiro estágio da humificação da MOS do solo. A maior

porcentagem de N em solos sob a copa de *O. dispersa* pode estar associada a essa concentração de AH.

Tabela 5 - Concentrações de humina, ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH) no solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas, em duas épocas de amostragem (alta - AP e baixa - BP pluviosidade)

	Humina %	AF %	AH %	AH/AF	EA/Humina*
	BP	BP	BP	BP	BP
OD	39,05 ^a	61,78 ^a	66,95 ^a	1,08 ^a	3,47 ^{a*}
OT	49,24 ^a	49,36 ^a	56,51 ^{ab}	1,14 ^a	2,67 ^{a*}
MS	39,02 ^a	49,06 ^a	44,74 ^{ab}	0,91 ^a	2,41 ^{a*}
TS	48,18 ^a	57,83 ^a	34,89 ^b	0,60 ^a	2,24 ^{a*}
	AP	AP	AP	AP	AP
OD	46,71 ^a	34,42 ^a	52,80 ^a	1,53 ^a	1,99 ^a
OT	51,36 ^a	62,77 ^a	45,45 ^{ab}	0,72 ^a	2,10 ^a
MS	39,50 ^a	36,80 ^a	31,77 ^{ab}	0,86 ^a	1,91 ^a
TS	50,75 ^a	43,08 ^a	30,73 ^b	0,71 ^a	1,55 ^a

Letras iguais dentro da mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

*apresenta diferenças significativas em relação a épocas

OD- *Ocotea dispersa*; **OT**- *Ocotea teleiandra*; **MS**- *Mollinedia schottiana*; **TS**- *Tabebuia serratifolia*

Tabela 6 - Valores de p para Teste de F para as concentrações de humina, ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH)

	Espécies	Época
Humina	0.2339	0.4775
AF	0.5909	0.1257
AH	0.0227*	0.1404
AH/AF	0.0852	0.3488
EA/Humina	0.4761	0.0303*

* apresentam diferenças significativas (Teste de Tukey $p \leq 0.05$)

A maior quantidade de N no solo pode ser um indicador do processo de evolução dos AH, sugerindo a ocorrência de transformações químicas mais intensas nesses solos (CANELLAS et al., 2001). Os AH são compostos estáveis, ou seja, de difícil degradação. Eles interagem com o meio circundante interferindo nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, agindo como um sinalizador natural do processo de humificação (MIRANDA et al., 2007). Altas concentrações de AH têm sido

relacionadas a solos férteis, com alto conteúdo de bases trocáveis (CANELLAS et al., 2003).

A razão AH/AF é utilizada como um indicador da qualidade do húmus nos solos em geral, e pode indicar a mobilidade do carbono no solo (BENITES et al., 2003). Em solos com altos valores de AH/AF pode estar ocorrendo perda seletiva da fração mais solúvel da MOS (AF) (BENITES et al., 2003). Nos solos estudados, não houve diferença significativa entre as relações AH/AF. Porém, a maioria dos valores foram próximos a 1, indicando um maior grau de humificação da MOS (Tabela 5). Segundo Canellas (1999), a relação AH/AF próxima a 1,0 caracteriza material de qualidade ótima, que permitiria o desenvolvimento de propriedades físicas e químicas favoráveis ao crescimento de plantas. Um alto grau de humificação pode estar relacionado a altos teores de bases trocáveis no solo, que por sua vez, contribui para o processo de humificação através da intensificação das reações de síntese e condensação química e microbiana.

A razão EA/Humina corresponde à relação entre o extrato alcalino (ácidos húmicos mais ácidos fúlvicos) e a humina. Esse índice indica a iluviação da matéria orgânica, ou seja, o deslocamento dessa matéria orgânica ao longo do perfil do solo. Nos solos estudados não houve diferença significativa entre a razão EA/Hum nos solos sob a copa das diferentes espécies arbóreas estudadas. Mas, houve diferença significativa em relação às diferentes épocas de amostragem (Tabela 5). Os valores dessa relação para a época de baixa pluviosidade foram maiores do que para a época de alta pluviosidade. Os maiores valores da relação EA/Hum das amostras coletadas na época de baixa pluviosidade sugerem a predominância das frações AH e AF, menos estáveis, em relação à fração humina. Entretanto, os menores valores encontrados nas amostras coletadas durante o período de alta pluviosidade podem indicar a predominância da fração humina, mais estável, o que já era esperado, pois as frações AF e AH são menos estáveis e podem ser deslocadas mais facilmente pela água ao longo do perfil de solo (GOMES et al., 1998; USSIRI, JOHNSON, 2003).

5.3 Carbono na Biomassa Microbiana do Solo (CBM)

Na Figura 4 são apresentados os dados de carbono na biomassa microbiana nos solos sob a copa das espécies arbóreas avaliadas e nas épocas de baixa e alta pluviosidade (BP e AP). Não houve diferença significativa no CBM entre as amostras dentro de cada época, mas houve diferença entre as épocas (teste de Tukey, $p < 0.05$) (Figura 5)

A concentração de CBM foi maior na época de baixa pluviosidade ($0,608 \text{ mg C g}^{-1}$) do que na época de alta pluviosidade ($0,368 \text{ mg C g}^{-1}$) (Tukey, $p < 0,05$) (Figura 5). Um fato que pode ter influenciado a quantidade de carbono na BMS é que na época de alta pluviosidade os solos apresentavam maior teor de umidade, que aliado à alta concentração de argilas pode ter criado uma condição anaeróbia, desfavorável à produção de biomassa microbiana (SIX et al., 2006). Essas condições estão também associadas a uma lenta decomposição da matéria orgânica, provocando seu acúmulo (RESENDE et al., 2002).

Foram observadas diferenças na CBM sob as diferentes copas das plantas e nas duas épocas (Figura 4). O maior CBM foi observado na época de baixa pluviosidade.

Muitos autores analisaram o CBM em florestas nativas (RILLIG et al., 2001; LI et al., 2004; MABUHAY et al., 2006; KARA; BOLAT, 2008) e verificaram que os fungos tem influência direta na matéria orgânica e agregação do solo (RILLIG et al., 2001). Em um estudo na região sul do Brasil onde avaliaram a biomassa microbiana do solo em 4 áreas no município de Lages, Santa Catarina (área de campo nativo, campo nativo submetido à queima tradicional, mata natural com *Araucaria angustifolia* e reflorestamento com monocultivo de *Pinus taeda* com 8 anos), Baretta e colaboradores (2005) observaram que os valores de CBM para campo nativo, campo nativo queimado e monocultivo de pinus não diferiram estatisticamente entre si, comparando os valores para o ecossistema de mata natural, que foram os maiores observados.

Figura 4 - C na biomassa microbiana (mg g⁻¹ solo seco) do solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas do PECB, em amostras coletadas nas épocas de baixa pluviosidade e alta pluviosidade. 1-4 (**OD** – *Ocotea dispersa*), 5-8 (**OT** – *Ocotea teleiandra*), 9-12 (**MS** – *Mollinedia schottiana*) e 13-16 (**TS** – *Tabebuia serratifolia*). Os dados correspondem à média de 2 repetições. As barras representam o desvio padrão da média

Figura 5 - Carbono na biomassa microbiana do solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas, amostrado no período de baixa e alta pluviosidade (BP e AP, respectivamente). Os dados são médias de 16 repetições. Médias acompanhadas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$)

Gama Rodrigues e colaboradores (2008) também obtiveram resultados semelhantes aos trabalhos anteriores em um estudo em áreas nativas que foram substituídas por plantações de eucalipto em sítios florestais na região sudeste do Brasil. Nessas áreas avaliaram as alterações do carbono e do nitrogênio da biomassa microbiana e observaram que os maiores valores de C e N da BMS foram da floresta nativa, em comparação com as áreas de 7 anos de plantação de eucalipto. Portanto a BMS pode ser considerada um bioindicador dos níveis de matéria orgânica e qualidade do solo e de forma geral as áreas mais conservadas, com vegetação nativa, apresentam maiores valores de BMS quando comparadas com áreas agrícolas.

O solo sob a copa de *M. schottiana* e *O. dispersa* apresentaram maior CBM na época de baixa pluviosidade ($p < 0,05$) (Figura 6), enquanto que no solo sob a copa das

demais espécies arbóreas avaliadas, essas diferenças não foram significativas ($p < 0,05$). Os maiores valores de CBM foram observados no solo sob a copa de *O. dispersa* na época de baixa pluviosidade, sendo que as amostras relacionadas com essa espécie foram as que também apresentaram a maior quantidade de MO no solo e maiores teores de argila. Esse maior teor de MO sugere uma maior disponibilidade de nutrientes para a biomassa microbiana (RESENDE et al., 2002), e os maiores teores de argila também poderiam contribuir para a maior retenção de nutrientes, favorecendo o crescimento microbiano (GAMA-RODRIGUES; GAMA-RODRIGUES, 2008).

Figura 6 - Comparação de médias da quantidade de carbono na biomassa (mg C g^{-1}) no solo nas amostras coletadas nas duas épocas BP e AP sob a copa das espécies: **OD** – *O. dispersa*, **OT** – *O. teleiandra*, **MS** – *M. schottiana* e **TS** – *T. serratifolia*

Quanto às amostras coletadas sob as plantas da mesma espécie OD1 e OD2, pode-se observar pouca variação entre os valores de carbono da biomassa no solo. Provavelmente isso se deve à proximidade dessas plantas dentro da mata (subparcelas F5 e F7 respectivamente) e à qualidade dos resíduos vegetais e exsudados liberados pelas mesmas, uma vez que esses componentes podem ter forte influência no crescimento da comunidade microbiana do solo (MYERS et al., 2001). Por outro lado, quando avaliadas as mesmas espécies em diferentes locais, o solo coletado sob a copa das plantas como TS1 e TS3 apresentaram diferenças significativas em relação ao C-biomassa nas duas estações. Isso ocorre devido a variações espaciais, do solo, diferenças no relevo, fatores nutricionais, quantidade e qualidade da matéria orgânica presente (AGNELLI et al., 2004).

Os valores referentes à relação C/N foram significativamente maiores na época de alta pluviosidade (Tabela 3), sugerindo um favorecimento da comunidade fúngica nesta época. Fungos precisam de uma quantidade relativamente menor de nitrogênio para crescer e se reproduzir. Quando um solo apresenta alta relação de C/N, a comunidade fúngica é favorecida enquanto que quando a relação C/N é baixa há o favorecimento da comunidade bacteriana (SIX et al., 2006, JIANG et al., 2009).

5.4 Estrutura de comunidades e diversidade de fungos

5.4.1 Análises das estruturas das comunidades de fungos com base em PCR-DGGE

Os perfis dos amplicons após PCR-DGGE da região ITS mostraram diferenças na estrutura das comunidades fúngicas das amostras de solo sob a copa das diferentes espécies de árvores analisadas, nas duas épocas amostradas (Figura 7A).

Nos solos coletados tanto na época de baixa quanto de alta pluviosidade, a análise discriminante canônica baseada no perfil de bandas após DGGE mostrou estruturas das comunidades fúngicas são distintas nos diferentes solos amostrados. Quando comparados os perfis de bandas das amostras coletadas sob a copa das diferentes espécies de plantas, pode-se observar que as comunidades de fungos no

solo sob a copa de plantas da mesma espécie são mais similares entre si do que em relação às comunidades de fungos no solo de plantas de espécies diferentes (Figura 7B). Isto mostra que, por mais distantes geograficamente que estejam essas comunidades de fungos, elas são afetadas pela espécie vegetal, seja pelos exsudatos liberados pelas raízes ou pela composição química da serapilheira (LUMLEY et al., 2001; DE BELLIS et al., 2007).

O metabolismo microbiano no solo é influenciado pela disponibilidade e tipo de substratos orgânicos e é plausível que, em ecossistemas que diferem floristicamente, ocorra a produção de compostos orgânicos quimicamente distintos os quais podem nutrir e promover o crescimento microbiano de maneira diferencial (MYERS et al., 2001).

No geral, as estruturas das comunidades de fungos no solo sob a copa de árvores da mesma espécie apresentaram maior similaridade entre si do que em relação a espécies de árvores diferentes (Figura 7). Houve também um claro efeito da época de amostragem na estrutura das comunidades de fungos no solo sob a copa das árvores amostradas (Figura 7). Na análise discriminante, o FATOR 1 explica 83,3% da variação encontrada entre as espécies e o FATOR 2 explica 14,8% da variação restante, não explicada pelo FATOR 1. Segundo Buée e colaboradores (2009), a época de coleta e as condições climáticas do local no momento podem influenciar a comunidade fúngica, podendo subestimar a real riqueza de alguns grupos de fungos.

Figura 7 - Estrutura das comunidades fúngicas nos diferentes solos amostrados durante a época de alta e baixa pluviosidade. A) Imagem do perfil de amplicons após DGGE; letras em vermelho: época de baixa pluviosidade; letras em azul: época de alta pluviosidade B) Análise discriminante das amostras analisadas: círculo (baixa pluviosidade); quadrado (alta pluviosidade). A mesma cor corresponde à mesma espécie. **OD** – *O. dispersa*, **OT** – *O. teleiandra*, **MS** – *M. schottiana* e **TS** – *T. serratifolia*; 1 e 2 correspondem as épocas de baixa pluviosidade e alta pluviosidade, respectivamente

Resultados semelhantes foram observados por Christensen et al. (1981). Os autores compararam 33 comunidades fúngicas de diferentes ambientes e observaram uma alta correspondência entre a composição das comunidades fúngicas e o tipo de vegetação presente nos diferentes locais. Nielsen e colaboradores (2010) estudaram vegetações em diferentes locais na Escócia e observaram que diferenças na composição da comunidade de fungos do solo entre os habitats estavam fortemente relacionadas com a espécie arbórea *Calluna vulgaris*. McLean e Hutha (2002), estudando comunidades de fungos em solos coletados sob abeto, videoeiro e campos arados na Finlândia observaram também que as comunidades fúngicas estavam intimamente relacionadas à qualidade e o tipo de serapilheira. Estas observações são semelhantes às nossas, já que amostras de solo coletadas em pontos distantes do mesmo parque, sob indivíduos diferentes, mas pertencentes à mesma espécie arbórea, apresentaram estruturas de comunidades de fungos semelhantes.

Relação entre a pluviosidade e a comunidade de diferentes organismos do solo em diferentes habitats também foi observada por Nielsen e colaboradores (2010). Segundo esse estudo, variações na comunidade de fungos e arqueias estão intimamente relacionadas a mudanças climáticas e a vegetação, enquanto que variações na comunidade bacteriana estão mais relacionadas a variações nas propriedades do solo. Esses resultados sugerem que os grupos de microrganismos podem responder de forma diferenciada às mudanças no habitat. Nossos resultados, com base em PCR-DGGE, mostraram que a pluviosidade também exerceu grande influência nas comunidades de fungos do solo no PECB. A pluviosidade pode estar associada a alterações de atributos do solo como a umidade, aeração e disponibilidade de nutrientes.

As plantas também exercem grande influência na estrutura das comunidades microbianas dos solos devido à deposição de restos vegetais, e exsudação radicular (NANNIPIERI et al., 2003), podendo influenciar a composição da matéria orgânica do solo, a qual, por sua vez, pode influenciar a comunidade fúngica (GILLEVET et al., 2009; NIELSEN et al., 2010; CHAPMAN; NEWMAN, 2010).

Portanto, a vegetação pode afetar a comunidade de fungos do solo de várias maneiras: diretamente por meio da qualidade da serapilheira como fonte de nutrientes

para os fungos, bem como através das substâncias presentes nos exsudatos radiculares, e indiretamente por meio de mudanças nas propriedades físicas e químicas do solo. Chapman e Newman (2010), estudando a diversidade e a estrutura da comunidade microbiana do solo e sua interação com diferentes tipos de liteira provenientes de quatro tipos de coníferas na região de São Francisco (Califórnia, EUA) observaram também que a mistura desses diferentes tipos de liteira exerce grande influência na biomassa microbiana decompositora e na composição da comunidade microbiana do solo.

As árvores suprem os resíduos orgânicos que formam a serapilheira, e modificam o ambiente na superfície do solo, criando condições ideais para o crescimento microbiano (GÖMÖRYOVÁ et al., 2009). Há evidências mostrando a associação entre grupos de fungos do solo e o tipo de vegetação (CHRISTENSEN, 1969; LODGE, 1997; MYERS et al., 2001). Exsudatos das raízes, na forma de aminoácidos, açúcares e metabólitos secundários, diferem em quantidade e estrutura química entre diferentes espécies de plantas (MYERS et al., 2001), o que pode favorecer o crescimento de grupos específicos de fungos, saprófitas ou simbiontes. Alterações na composição da serapilheira e/ou na composição dos exsudatos radiculares poderiam explicar a relação observada entre a comunidade fúngica e as diferentes espécies de plantas (DE BELLIS et al., 2007; NIELSEN et al., 2010)

A análise de RDA realizada com os dados do perfil de amplicons após DGGE e fatores ambientais, mostrou que as variáveis S, pluviosidade, N, Ca, SB, MO, C, V% e a espécie de árvore TS foram as mais significativas para explicar a distribuição dos dados (Tabela 7). Os dois primeiros eixos explicam 40,8% da variabilidade dos dados, sendo 26,9% explicados pelo primeiro eixo e 13,9% pelo segundo (Figura 8).

Os atributos N, Ca, SB, MO, C e V% tiveram forte relação com as estruturas das comunidades de fungos nas amostras coletadas na época de baixa pluviosidade. Já, aparentemente, características associadas à alta pluviosidade estão associadas à estrutura das comunidades de fungos em outras épocas do ano. Diferenças na comunidade microbiana associada a fatores químicos do solo têm sido relatados em alguns estudos (DE BELLIS et al., 2007). Embora estudos relatem que a temperatura e o regime de chuvas de um local sejam fatores determinantes da estrutura das

comunidades microbianas do solo e seus processos bioquímicos (MUMMEY et al., 2010), não é fácil estabelecer uma relação entre as comunidades de fungos e os fatores ambientais determinantes, já que estes fatores são inúmeros e estão correlacionados. Nossas análises mostraram que a comunidade de fungos relacionou-se com determinados atributos químicos do solo como N, Ca, SB, MO, C e V% que por sua vez estão estritamente relacionados à espécie vegetal sob a copa da qual a amostra foi coletada, pluviosidade e temperatura.

Na RDA relacionando o fracionamento da matéria orgânica do solo e a estrutura das comunidades de fungos determinada por PCR- DGGE, dentre as variáveis testadas (frações humina, AF e AH) e pluviosidade, a variável AH e a pluviosidade foram escolhidas pelo teste de permutação de Monte Carlo como sendo as mais significativas na distribuição dos dados (Tabela 8). Os dois primeiros eixos do gráfico explicam 75,8% da variabilidade dos dados, sendo 64,0% explicados pelo primeiro eixo e 21,8% pelo segundo (Figura 10). A fração AH está relacionada com as amostras coletadas na época de baixa pluviosidade (Figura 10). Essa fração da MOS é mais recalcitrante do que a fração AF, e portanto persiste maior tempo no solo. Provavelmente na época de alta pluviosidade, a AH pode ter sido lixiviada, o que explicaria a maior relação com as amostras coletadas na época de baixa pluviosidade.

A fase inicial da biodegradação microbiana da MOS é feita principalmente por bactérias e se caracteriza pela perda rápida dos compostos orgânicos decomponíveis (açúcares, proteínas, amido, celulose). Na fase seguinte há a participação de outros micro-organismos que degradam produtos orgânicos intermediários e protoplasma microbiano, com a produção de nova biomassa e liberação de CO₂. Ao final da decomposição da MOS há a degradação gradual de compostos mais resistentes por actinomicetos e fungos (GUERRA et al., 2008).

A fração humina corresponde a fração insolúvel da MOS e possui a menor capacidade de reação no solo dentre as frações da MOS. Em seguida está a fração AH, a qual apresenta menor capacidade de reação no solo do que a fração AF e é portanto mais recalcitrante do que esta. Provavelmente a maior influência da AH na estrutura da comunidade de fungos das amostras avaliadas (Figura 10) se deve a especialidade desses micro-organismos em degradar substâncias mais recalcitrantes. No caso, a

fração AF pode não ter influenciado na estrutura das comunidades de fungos por já sido lixiviada daquele ambiente na época de alta pluviosidade, ou ter sido degradada por atividade de outros micro-organismos (GOMES et al., 1998; USSIRI, JOHNSON, 2003).

Fungos formam hifas que auxiliam na formação dos agregados do solo. Geralmente são mais eficientes na assimilação e estoque de nutrientes do que bactérias devido à estrutura química de sua parede celular (SIX et al., 2006). A parede celular dos fungos é constituída de polímeros de quitina e é muito resistente a degradação por isso resistem mais tempo no solo do que bactérias. Já as membranas que envolvem as bactérias são formadas de fosfolipídios, são ricas em energia e muito menos recalcitrantes. Essas membranas são de fácil e rápida degradação e servem como fonte de alimento para vários micro-organismos (SIX et al., 2006).

Tabela 7 - Valores p dos fatores ambientais do PECB obtidos no teste de permutação de Monte Carlo

Código	Variável ambiental	Valor p^*
Pluviosi	Pluviosidade	0.001*
S	Enxofre	0.001*
sp4	<i>Tabebuia serratifolia</i>	0.002*
N	Nitrogênio	0.006*
Ca	Cálcio	0.011*
SB	Soma de Bases trocáveis	0.019*
MO	Matéria Orgânica	0.022*
C	Carbono	0.03*
sp1	<i>Ocotea dispersa</i>	0.026*
V%	Porcentagem de saturação por bases	0.037*
Mg	Magnésio	0.054
H+Al	Acidez potencial	0.081
CTC	Capacidade de troca catiônica total	0.076
pH	pH	0.118
sp2	<i>Ocotea teleiandra</i>	0.104
Al	Alumínio	0.183
K	Potássio	0.35
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio	0.344
sp3	<i>Mollinedia schottiana</i>	0.33
Na	Sódio	0.898
P	Fósforo	0.912

*Os valores foram considerados significativos ($p < 0,05$).

Figura 8 - RDA das amostras de solo e variáveis ambientais significativas, segundo o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). **AP** (época de alta pluviosidade), **BP** (época de baixa pluviosidade). As setas vermelhas representam as variáveis ambientais e os triângulos vermelhos as nominais ou espécies arbóreas: **OD** – *Ocotea dispersa*, **OT** – *Ocotea teleiandra*, **MS** – *Mollinedia schottiana* e **TS** – *Tabebuia serratifolia*

Tabela 8 - Valores p dos fatores de fracionamento da MOS do PECB obtidos no teste de permutação de Monte Carlo

Código	Variável ambiental	Valor p^*
Pluvio	Pluviosidade	0.001*
sp4	<i>Tabebuia serratifolia</i>	0.006*
sp1	<i>Ocotea dispersa</i>	0.023*
AH	Ácidos húmicos	0.043*
sp2	<i>Ocotea teleiandra</i>	0.115
AH/AF	Relação ác húmicos/ác fúlvicos	0.383
sp3	<i>Mollinedia schottiana</i>	0.329
AF	Ácidos fúlvicos	0.395
Hum	Humina	0.972

*Os valores foram considerados significativos ($p < 0,05$).

Figura 9 - RDA das amostras de solo e variável significativa do fracionamento da MOS, segundo o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). **AP** (época de alta pluviosidade), **BP** (época de baixa pluviosidade). As setas vermelhas representam a variável significativa e a pluviosidade e os triângulos vermelhos as nominais ou espécies arbóreas: **OD** – *Ocotea dispersa*, **OT** – *Ocotea teleiandra*, **MS** – *Mollinedia schottiana* e **TS** – *Tabebuia serratifolia*

5.4.2 Sequenciamento de clones da região ITS do rDNA

Foram feitas quatro bibliotecas a fim de avaliar a influência das quatro espécies vegetais estudadas (OD, OT, MS e TS) sobre a estrutura das comunidades fúngicas do solo sob a copa das mesmas. Foram considerados válidos para cada biblioteca 115, 118, 95 e 95 clones, respectivamente.

Abaixo encontram-se a frequência dos grupos fúngicos nos diferentes solos coletados (Tabela 9 e Figura 11), e as informações disponíveis no *GenBank* do NCBI sobre as sequências correspondentes (Tabela 10). Em nosso estudo houve uma alta incidência de fungos não-cultiváveis e não-classificados (cerca de 25%). Segundo Buée e colaboradores (2009) uma grande quantidade de sequências de fungos não classificadas se deve provavelmente ao alto número de erros de anotação taxonômica e erros em atribuições taxonômicas no depósito de sequências da região ITS do rDNA em bancos de dados internacionais de sequências de DNA. Essas são as maiores limitações na pesquisa sobre diversidade de fungos em geral. Por essas razões, pesquisadores sugerem o uso de bancos de dados de região ITS do rDNA mais acurados para a obtenção de informações taxonômicas mais pertinentes (BUÉE et al., 2009).

Os dados obtidos indicaram a presença de fungos dos filos Basidiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota, em ordem de abundância, além de fungos não cultiváveis (Figura 11). De um total de 423 sequências analisadas, 63% corresponderam a basidiomicetos, 6% zigomicetos, 5% ascomicetos, 0,5% glomeromicetos, 0,5% chytridiomicetos e 25% das sequências analisadas foram correspondentes a fungos não-cultiváveis.

Tabela 9 - Frequência dos grupos de fungos de OD – *Ocotea dispersa*, MS – *Mollinedia schottiana*, TS – *Tabebuia serratifolia* e OT – *Ocotea teleiandra*

Espécies	(Continua)							
	OD		MS		TS		OT	
	% Total	Nº clones	% Total	Nº clones	% Total	Nº clones	% Total	Nº clones
<i>Ceratobasidium cornigerum</i>	0.87	1	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Cladosporium musae</i>	1.74	2	0.00	0	0.00	0	0.85	1
<i>Crucellisporium</i> sp	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	13.9	16	28.4	27	27.4	26	36.4	43
<i>Datronia mollis</i>	0.00	0	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
<i>Ganoderma applanatum</i>	0.00	0	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Ganoderma</i> sp	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Gymnopilus pyrrhum</i>	0.00	0	0.00	0	4.21	4	0.00	0
<i>Hyphodontia nothofagi</i>	0.00	0	3.16	3	0.00	0	0.00	0
<i>Leptodontium</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Leucoagaricus croceovelutinus</i>	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
<i>Metarhizium guizhouense</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Mortierella elongata</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Mortierella</i> sp	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
<i>Mycena chlorophos</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Mycocrepus smithi</i> (simbionte)	3.48	4	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Mycocrepodiscus</i> sp.	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
Sebacinales (fungo micorrízico)	0.87	1	1.05	1	0.00	0	2.54	3
<i>Myrmicocrypta cf.buenzlii</i> (simbionte)	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
<i>Onychocola sclerotica</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Parapleurotheciopsis inaequiseptata</i>	0.00	0	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Penicillium aculeatum</i>	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.85	1
<i>Penicillium purpurogenum</i>	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.85	1
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.85	1

Tabela 9 - Frequência dos grupos de fungos de OD – *Ocotea dispersa*, MS – *Mollinedia schottiana*, TS – *Tabebuia serratifolia* e OT – *Ocotea teleiandra*

Espécies	OD		MS		TS		OT	
	% Total	Nº clones	% Total	Nº clones	% Total	Nº clones	% Total	Nº clones
<i>Physisporinus vitreus</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Rhizoctonia</i>	2.61	3	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Rhizophydium</i>	0.87	1	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Sarcodon atroviridis</i>	0.00	0	3.16	3	0.00	0	0.85	1
<i>Schizophyllum commune</i>	0.00	0	2.11	2	0.00	0	0.00	0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.00	0	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Sesquicillium microsporum</i>	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.85	1
<i>Tremella mycophaga</i>	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
<i>Tremellales</i> sp	0.00	0	0.00	0	1.05	1	0.00	0
<i>Trichosporon coprophilum</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
<i>Trichosporon laibachii</i>	0.87	1	3.16	3	0.00	0	0.00	0
<i>Trichosporon sporotrichoides</i>	10.4	12	3.16	3	5.26	5	3.39	4
<i>Trichosporum lignicola</i>	0.00	0	11.6	11	0.00	0	4.24	5
<i>Trichosporon mucoides</i>	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.85	1
<i>Tricosporum wieringae</i>	9.57	11	1.05	1	16.84	16	5.08	6
<i>Triscosporalles</i> sp	0.00	0	1.05	1	1.05	1	0.00	0
Uncultured Basidiomycetes	1.74	2	0.00	0	1.05	1	0.85	1
Uncultured <i>Cryptococcus</i>	8.70	10	7.37	7	6.32	6	4.24	5
Uncultured fungus	28.7	33	26.3	25	26.3	25	25.4	30
Uncultured Glomeromycota	0.00	0	1.05	1	0.00	0	0.00	0
Uncultured Ascomycota	0.00	0	0.00	0	0.00	0	1.69	2
Uncultured Hypocreales	0.00	0	0.00	0	2.11	2	0.00	0
Uncultured <i>Scutellospora</i>	0.87	1	0.00	0	0.00	0	0.00	0
Uncultured Mortierellales	7.83	9	0.00	0	2.11	2	10.2	12
Total		115		95		95		118

ND, não detectado

Tabela 10 - Informações disponíveis no *GenBank* do NCBI sobre as sequências correspondentes aos grupos de fungos detectados no solo sob a copa de OD – *Ocotea dispersa*, MS – *Mollinedia schottiana*, TS – *Tabebuia serratifolia* e OT – *Ocotea teleiandra*

(Continua)

Código	Espécie	FILO	ORDEM	Acesso <i>GenBank</i>
TSPECB34	<i>Ceratobasidium cornigerum</i>	Basidiomycota	Cantharellales	EU273525.1
OTPECB42	<i>Cladosporium musae</i>	Ascomycota	Capnodiales	AF393718.2
MSPECB10	<i>Crucellisporium</i> sp	Ascomycota	ND	GU291797.1
MSPECB8	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Basidiomycota	Tremellales	FN428938.1
TSPECB13	<i>Datronia mollis</i>	Basidiomycota	Polyporales	AF516557.1
MSPECB26	<i>Eurotium amstelodami</i>	Ascomycota	Eurotiales	AM159632.1
TSPECB15	<i>Ganoderma applanatum</i>	Basidiomycota	Polyporales	AJ608709.1
ODPECB64	<i>Ganoderma</i> sp	Basidiomycota	Polyporales	AF255141.1
TSPECB5	<i>Gymnopilus pyrrhum</i>	Basidiomycota	Agaricales	AF501569.1
MSPECB34	<i>Hyphodontia nothofagi</i>	Basidiomycota	Corticiales	GQ411524.1
ODPECB25	<i>Leptodontium</i> sp.	Ascomycota	ND	GU062199.1
MSPECB6	<i>Leucoagaricus croceovelutinus</i>	Basidiomycota	Agaricales	GQ329061.1
ODPECB16	<i>Metarhizium guizhouense</i>	Ascomycota	Hypocreales	HM055445.1
ODPECB21	<i>Mortierella elongata</i>	Zygomycota	Mortierellales	AB542112.1
MSPECB12	<i>Mortierella</i> sp	Zygomycota	Mortierellales	AB542110.1
ODPECB29	<i>Mycena chlorophos</i>	Basidiomycota	Agaricales	AB512312.1
MSPECB36	<i>Mycocephalus smithi</i> (simbionte)	Basidiomycota	Agaricales	AF079714.1
MSPECB20	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	Ascomycota	Magnaporthales	FJ478407.1
ODPECB48	Sebacinales (fungo micorrízico)	Basidiomycota	Sebacinales	EU880595.1
MSPECB36	<i>Myrmicocrypta cf. buenzi</i> (simbionte)	Basidiomycota	Agaricales	AF079714.1
ODPECB69	<i>Onychocola sclerotica</i>	Ascomycota	Onygenales	AY123785.2
TSPECB20	<i>Parapleurotheciopsis inaequiseptata</i>	Ascomycota	Xylariales	EU040235.1
OTPECB46	<i>Penicillium aculeatum</i>	Ascomycota	Eurotiales	GU566285.1
OTPECB7	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Ascomycota	Eurotiales	FN868483.1
OTPECB18	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	Ascomycota	Xylariales	GU722595.1
ODPECB58	<i>Physisporinus vitreus</i>	Basidiomycota	Polyporales	FM202496.1
ODPECB24	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Basidiomycota	Cantharellales	AJ242899.1
TSPECB14	<i>Rhizophydium</i> sp.	Chytridiomycota	Rhizophydiales	AY349121.1
MSPECB25	<i>Sarcodon atroviridis</i>	Basidiomycota	Thelephorales	EU293831.1
MSPECB21	<i>Schizophyllum commune</i>	Basidiomycota	Agaricales	AM159635.1
TSPECB36	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ascomycota	Helotiales	GU229808.1
OTPECB45	<i>Sesquicillium microsporum</i>	Ascomycota	Hypocreales	GU219471.1
MSPECB28	<i>Tremella mycophaga</i>	Basidiomycota	Tremellales	AF042431.1
TSPECB11	<i>Tremellales</i> sp	Basidiomycota	Tremellales	EF060790.1
ODPECB75	<i>Trichosporon coprophilum</i>	Basidiomycota	Tremellales	AB180199.1
MSPECB33	<i>Trichosporon laibachii</i>	Basidiomycota	Tremellales	EU863532.1

Tabela 10 - Informações disponíveis no *GenBank* do NCBI sobre as sequências correspondentes aos grupos de fungos detectados no solo sob a copa de OD – *Ocotea dispersa*, MS – *Mollinedia schottiana*, TS – *Tabebuia serratifolia* e OT – *Ocotea teleiandra*

(Conclusão)

Código	Espécie	FILO	ORDEM	Acesso <i>GenBank</i>
MSPECB29	<i>Trichosporon sporotrichoides</i>	Basidiomycota	Tremellales	AF444470.1
OTPECB8	<i>Trichosporum lignicola</i>	Basidiomycota	Tremellales	AF444482.1
OTPECB51	<i>Trichosporon mucoides</i>	Basidiomycota	Tremellales	AM159634.1
OTPECB21	<i>Tricosporum wieringae</i>	Basidiomycota	Tremellales	AY315667.1
MSPECB11	<i>Trichosporon albes</i> sp	Basidiomycota	Tremellales	EF060847.1
ODPECB31	Uncultured Basidiomycota	Basidiomycota	ND	EU490014.1
ODPECB39	Uncultured <i>Cryptococcus</i>	Basidiomycota	Tremellales	FJ816723.1
MSPECB13	Uncultured fungus	ND	ND	GU366719.1
MSPECB23	Uncultured Glomeromycota	Glomeromycota	ND	GU998151.1
OTPECB22	Uncultured Ascomycota	Ascomycota	ND	GQ240932.1
TSPECB19	Uncultured Hypocreales	Ascomycota	Hypocreales	GU056005.1
ODPECB32	Uncultured <i>Scutellospora</i>	Glomeromycota	Diversisporales	AM114018.1
OTPECB44	Uncultured Mortierellales	Zygomycota	Mortierellales	FN689674.1

ND, não determinado

Figura 10 - Frequência (%) dos filos do domínio Fungi no solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas. **OD** – *Ocotea dispersa*, **OT** – *Ocotea teleiandra*, **MS** – *Mollinedia schottiana* e **TS** – *Tabebuia serratifolia*

Sequências representando fungos pertencentes ao filo Basidiomycota foram detectadas em maioria nas quatro bibliotecas analisadas (67% em MS, 59% em OT, 66% em TS e 57% em OD). Os representantes mais abundantes desse filo foram *Cryptococcus podzolicus* e *Trichosporon sporotrichoides*. Essa alta incidência de fungos desse filo também foi observada por Bueé e colaboradores (2009) ao avaliarem a diversidade de fungos em solos de diferentes florestas na França. O'Brien e colaboradores (2005), estudando comunidades de fungos do solo de florestas temperadas através de clonagem da região ITS e SSU rRNA, observaram também uma alta incidência de sequências de fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota da ordem Tremellales. Esse grupo de fungos também já foi relatado predominando em solos de tundra no Ártico (WALLENSTEIN et al., 2007).

Cryptococcus podzolicus é uma espécie de levedura que ocorre comumente na superfície de raízes e na rizosfera (BUÉE et al., 2009; HONG et al., 2006). Essa espécie também já foi encontrada em abundância em solos orgânicos de floresta e em serapilheira (GOLUBTSOVA et al., 2006). Espécies de *Trichosporon sp.* foram relatadas em solos agrícolas (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003), em solos de florestas tropicais (CURLEVSKI et al., 2010a) e de regiões temperadas (WUCZKOWSKI et al., 2003)

Outro grupo importante identificado foi o Filo Zygomycota, especialmente a ordem Mortierellales, gênero *Mortierella*, presente em todas as bibliotecas (Tabela 9). Esse gênero é considerado muito comum em solos tropicais e temperados e já foi reportado na rizosfera de *Araucaria bidwillii* em solos da Austrália (DE BELLIS et al., 2007; SATISH et al., 2007; BUÉE et al., 2009; CURLEVSKI et al., 2010a, 2010b). Fungos dessa ordem foram considerados fortes competidores primários ou secundários na colonização de substratos ricos em carboidratos e podem contribuir para a solubilização do fósforo não-lábil nos solos (OSORIO e HABTE, 2001; KWASNA et al., 2006; CURLEVSKI et al., 2010a).

Curlevski e colaboradores (2010a), estudando as comunidades fúngicas no solo de uma floresta tropical nativa australiana e de monoculturas adjacentes de *Araucaria bidwillii*, *A. cunninghamii* e *Agathis robusta* através de T-RFLP, biblioteca de clones e análises de sequências, também observaram representantes do Filo Zygomycota e da

ordem Mortierellales. Neste mesmo trabalho, observaram também representantes de outros Filos, exceto Glomeromycota. Mas, ao contrário dos nossos resultados, o filo detectado com maior frequência foi Ascomycota. Apesar de serem estudos realizados em solos de florestas tropicais, essa diferença na composição da comunidade fúngica provavelmente se deve a diferenças nas condições edáficas e na composição da flora nos diferentes locais. Satish e colaboradores (2007) ao analisarem a diversidade de fungos no solo, através de métodos dependentes de cultivo, em duas estações úmidas consecutivas em florestas de Mudumalai no sul da Índia, também observaram representantes de *Mortierella* nas amostras.

Representantes do filo Ascomycota são muito comuns em solos de clima tropical e temperado, até mesmo em solos da região Antártica (ARENZ et al., 2006; BASTIAS et al., 2006; SATISH et al., 2007; BUÉE et al., 2009). Curlevski e colaboradores (2010b) verificaram que na rizosfera de *A. bidwilli* a maioria das sequências, apresentando similaridade com sequências em bancos de dados, correspondiam a representantes do filo Ascomycota.

Alguns representantes do filo Chytridiomycota também foram encontrados em nossos estudos. Em um estudo feito em solos, água e serapilheira em um fragmento de Mata Atlântica na região de Cubatão, litoral sul do estado de São Paulo, através de técnicas de cultivo, foi observado um grande número de fungos pertencentes a esse filo, além de representantes do filo Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (SHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006). Chytridiomicetos são fungos saprófitas, encontrados em água e solo, podem estar associados à decomposição da matéria orgânica do solo, pois são capazes de crescer em substratos ricos em celulose e outros tipos de carboidratos (PIRES-ZOTTARELLI; GOMES, 2007; GLEANSON et al., 2010)

As sequências de clones da região ITS do rDNA consideradas válidas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais, considerando-se dissimilaridade de 3% para a definição de UTO, utilizando-se o programa DOTUR. A riqueza de UTOs foi estimada utilizando-se estimadores não-paramétricos (CHAO 1) e índices de diversidade (SHANNON e SIMPSON) calculados. Foram definidas 76 UTOs para a biblioteca de OD, 52 UTOs para OT, enquanto que para as bibliotecas de TS e MS

foram definidas 45 e 39 UTOs, respectivamente. Das UTOs obtidas, 48, 38, 35 e 43 foram consideradas UTOs únicas no solo sob a copa das respectivas espécies arbóreas. Entre as espécies OD e OT foram encontradas apenas 13 UTOs comuns, entre OD e TS, 11 UTOs comuns, entre OD e MS, apenas 10, entre OT e TS, 11, OT e MS, 13 e entre TS e MS foram encontradas apenas 8 UTOs comuns (Figura 13).

A estimativa de riqueza de UTOs entre as amostras foi significativamente diferente. Com base no índice de Shannon, o solo sob a copa de *Ocotea dispersa* apresentou maior diversidade do que os demais solos (Tabela 11). Pode-se observar a mesma relação utilizando-se a recíproca do índice de Simpson (Tabela 11). As de curvas de rarefação também mostram que o solo sob a copa de OD possui maior diversidade de fungos, se comparado aos demais solos (Figura 12).

Os dados também mostraram que na comparação múltipla entre as bibliotecas de clones, as comunidades de fungos do solo coletado sob as quatro diferentes espécies arbóreas foram significativamente diferentes, utilizando-se LIBSHUFF ($P < 0,01$) (Tabela 12).

Figura 11 - Curva de rarefação indicando o número estimado de UTOs em bibliotecas de clones da região rDNA ITS de fungos nos solos coletados sob a copa das espécies arbóreas **OD** (*Ocotea dispersa*), **OT** (*Ocotea teleiandra*), **MS** (*Mollinedia schottiana*) e **TS** (*Tabebuia serratifolia*)

Figura 12 - Diagrama de Venn com a distribuição do número de UTOs do domínio Fungi dos solos coletados sob a copa de **OD** (*Ocotea dispersa*), **OT** (*Ocotea teleiandra*), **MS** (*Mollinedia schottiana*) e **TS** (*Tabebuia serratifolia*)

Tabela 11 - Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir da análise de sequências de clones da região rDNA ITS de amostras de solo coletadas sob a copa de diferentes espécies arbóreas (OD, OT, TS, MS)

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de riqueza de UTOs		Índice de Diversidade		ECA ^e
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,03							
OD	118	76	236,4 (157,7; 390,6)	279,1 (163,9; 545,0)	4,125(4,001; 4,250)	48,35 (63,1; 39,22)	0,517
OT	118	52	207,4 (112,8; 449,0)	188,9 (101,1; 434,0)	3,238 (2,985; 3,492)	10,09 (27,89; 6,15)	0,686
MS	93	39	114,0 (67,0; 239,6)	101,5 (59,7; 228,1)	3,088 (2,844; 3,332)	11,04 (26,89; 6,95)	0,731
TS	95	45	150,0 (85,2; 319,4)	135,0 (76,0; 306,4)	3,430 (3,247; 3,613)	21,13 (31,88; 15,80)	0,684

Para a definição de UTOs utilizou-se D = 0,03.

^aNúmero de sequências.

^bNúmero de UTOs determinado pelo DOTUR.

^cEstimador de máxima semelhança.

^dRecíproco do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança).

^eEstimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança

Tabela 12 - Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de clones da região rDNA ITS das comunidades de fungos de amostras de solo coletadas sob a copa de diferentes espécies arbóreas (OD, OT, TS, MS)

Homólogo	Heterólogo			
	OT	OD	MS	TS
OT	-	0,0000	0,0000	0,0000
OD	0,415	-	0,0369	0,0002
MS	0,0436	0,0613	-	0,000
TS	0,0209	0,0001	0,0000	-

Valores mínimos para diferença significativa: 0,0008 e 0,0043 para 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A estrutura da comunidade fúngica no solo sob a copa de árvores, avaliada por PCR-DGGE, apresentou relação com as espécies arbóreas e a pluviosidade local.
- ✓ A fração ácido húmico (AH) apresentou maior relação com os solos coletados na época de baixa pluviosidade e foi mais abundante em solos coletados sob a copa da espécie *Ocotea dispersa*.
- ✓ Fungos do filo Basidiomycota foram os mais predominantes nesses solos sendo as espécies *Cryptococcus podzolicus* e *Trichosporon sporotrichoides* os mais abundantes. O segundo filo mais abundante foi o Zygomycota (ordem Mortierellales, gênero *Mortierella*), o qual é muito comum nos solos em geral, são colonizadores de substratos ricos em carboidratos e podem contribuir para a solubilização do fósforo não-lábil nos solos
- ✓ Os solos coletados sob a copa da espécie arbórea *Ocotea dispersa* foram os que apresentaram o maior teor de matéria orgânica, maior teor de nitrogênio, maior porcentagem de carbono e maior teor de cálcio. Esses solos também apresentaram maior diversidade de fungos, com base no sequenciamento de clones da região ITS do rDNA

REFERÊNCIAS

- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 859–868, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPAMAN, D.L. A basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1121-1132, 2003.
- ARENZ, B.E.; HELD, B.W.; JURGENS, J.A.; FARRELL, R.L.; BLANCHETTE, R.A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 3057-3064, 2006
- BARETTA, D.; SANTOS, J.C.P.; FIGUEIREDO, S.R.; KLAUBERG-FILHO, O. Efeito do monocultivo de *Pinus* e da queima do campo nativo em atributos biológicos do solo no planalto sul catarinense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 715-724, 2005.
- BASTIAS, B.A.; HUANG, Z.Q.; BLUMFIELD, T.; XU, Z.; CAIRNEY, J.W.G. Influence of repeated prescribed burning on the soil fungal community in an eastern Australian wet sclerophyll forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 3492-3501, 2006.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 1-5.
- BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2003. 7 p. (Comunicado Técnico, 16).
- BERTTUCCI, L.; ROQUEMBERT, M. F. Microfungi from a tropical rain forest litter and soil: a preliminary study. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 61, p. 111-118, 1995.
- BERTTUCCI, L.; MALVAREZ, I.; DUPONT, I.; BURY, E.; ROQUEBERT, M.-F. Paraná river delta wetlands soil microfungi. **Pedobiologia**, Jena, v. 46, p. 606-623, 2002.

BILLS, G. F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M.; THORN, G. Saprobiic soil fungi. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (ed.) **Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods**. Elsevier, Amsterdam. p. 271-302, 2004.

BIODIVERSITY HOTSPOTS. 2008. Disponível em: <<http://www.biodiversityhotspots.org>>. Acesso: 06 jul. 2010.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, 448 RNA and DNA in polyacrilamde gels. **Electrophoresis**, Weinhein, v. 8, p. 93–99, 1987.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, London, v. 232, p. 147-154, 2001.

BUEÉ, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.H.; UROZ, S.; MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, Malden, v. 184, p. 449-456, 2009.

CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed Celtis tala and Scutia buxifolia forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 157, p. 115-125, 2002.

CANELLAS, L.P. **Avaliação de características físico-químicas de ácidos húmicos**., 1999, 164 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica

CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A.; RUMJANEK, V.M.; MORAES, A.A. GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.36, n.12, p.1529-1538, 2001.

CANELLAS, L. P. VELLOSO, A.C.X.; MARCIANO, C.R.; RAMALHO, J.F.G.P.; RUMJANEK, V.M.; REZENDE, C.E.; SANTOS, G.A. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 935-944, 2003.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/>>. Acesso em: 10 jul. 2010

CHAO, A. Nonparametric estimation of number of classes in population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oslo, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHAO, A., SHEN, T.J. **Program SPADE (Species Prediction and Diversity Estimation)**- program and user's guide. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>. 2003-2008. Acesso em: 12 set. 2010.

CHAPMAN, S.K.; NEWMAN, G.S. Biodiversity at the plant–soil interface: microbial abundance and community structure respond to litter mixing. **Oecologia**, New York, v. 162, p. 763-769, 2010.

CHRISTENSEN, M. Soil microfungi of dry to mesic conifer-hardwood forests in northern Wisconsin. **Ecology**, Auckland, v. 50, p. 9–27, 1969.

_____. Species diversity and dominance in fungal communities. In: WICKLOW, D.T.; CARROLL, G.C. (Ed.) **The fungal Community—rDNA: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 201–232.

_____. A view of fungal ecology. **Mycologia**, Dordrecht, v. 81, p. 1–19, 1989.

CRASWELL, E.T.; LEFROY, R.D.B. The role and function of organic matter in tropical soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 61, p. 7-18, 2001.

CURLEVSKI N.J.A.; XU Z.H.; ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W. G. Converting Australian tropical rainforest to native Araucariaceae plantations alters soil fungal communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 14–20, 2010a.

_____. Diversity of soil and rhizosphere fungi under *Araucaria bidwillii* (Bunya pine) at an Australian tropical montane rainforest site. **Fungal Diversity**, New York, v. 40, p. 12–22, 2010b.

DEACON L.J.; PRYCE-MILLER E.J.; FRANKLAND J.C.; BAINBRIDGE B.W.; MOORE P.D.; ROBINSON C.H. Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38 p. 7–20, 2006.

DE BELLIS, T.; KERNAGHAN, G.; WIDDEN, P. Plant community influences on soil microfungi assemblages in boreal mixed-wood forests. **Mycologia**, Dordrecht, v. 99, n. 3, p. 356–367, 2007.

DINAKARAN, J.; KRISHNAYYA, N.S.R. Variations in soil organic carbon and litter decomposition across different tropical vegetal covers. **Current Science**, Bangalore, v. 99, n. 8, p. 1051-1060.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.1, p. 3–11, 2000.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p.186-94, 1998.

FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 4744-4749, 2010.

FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 77, p. 4420-4424, 1980.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INPE, Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2000-2005. **Fundação SOS Mata Atlântica/ Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, São Paulo, 2008. 156 p.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; DE BARROS, N.F.; VIANA, A.P.; SANTOS, G.A. Alterações na biomassa e na atividade microbiana da serrapilheira e do solo, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa por plantações de eucalipto, em diferentes sítios da região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1489-1499, 2008.

GAMA-RODRIGUES, E. F.; GAMA RODRIGUES, A. C. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A., da SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo. Ecossistemas tropicais e subtropicais** (2 Ed). Porto Alegre, Genesis, 2008. p. 159-182.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. **Molecular Ecology**, Malden, v. 2, p. 113-118, 1993.

GILLEVET, P.M.; SIKAROODI, M.; TORZILLI, A.P. Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing. **Fungal Ecology**, Oxford, v. 2, p. 160-167, 2009.

GLEASON, F. H., MARANO, A. V., DIGBY, A. L., AL-SHUGAIRAN, N.; LILJE, O.; STECIOW, M. M.; BARRERA, M. D.; INABAAND S.; NAKAGIRI A. Patterns of utilization of different carbon sources by Chytridiomycota. **Hydrobiologia**, Dorbrecht, v. 659, n.1, p. 55-64, 2010.

GOLUBTSOVA, Y.V.; GLUSHAKOVA, A.M.; CHERNOV, I.Y. The seasonal dynamics of yeast communities in the rhizosphere of soddy-podzolic soils. **Eurasian Soil Science**, New York, v. 40, p. 978–983, 2006.

GOMES, J.B.V.; RESENDE, M.; DE RESENDE, S.B.; MENDONÇA, E.S. Solos de três áreas de restinga. II. Dinâmica das substâncias húmicas, ferro e alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 1921-1932, 1998.

GOMES, N.C.M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N.G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 3758-3766, 2003.

GÖMÖRYOVÁ, E.; HRIVNÁK, R.; JANISOVÁ, M.; UJHÁZY, K.; GÖMÖRY, D. Changes of the functional diversity of soil microbial community during the colonization of abandoned grassland by a forest. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 191-199, 2009.

GUERRA, J.G.M.; SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CAMARGO, F.A.O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 1-5.

HATTORI, T.; MITSUI, H.; HAGA, H.; WAKAO, N.; SHIKANO, S.; GORLACH, K.; KASAHARA, Y.; EL-BELTAGY, A.; HATTORI, R. Advances in soil microbial ecology and biodiversity. **Antonie Van Leeuwenhoek International. Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 71, p. 21-28, 1997.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Oxford, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, D.L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 25-36, 2000.

HIBBERT, D. S.; OHMAN, A.; KIRK P. M. Fungal ecology catches fire. **New Phytologist**, Malden, v.184, p. 279-282, 2009.

HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 703-711, 1988.

HONG, S.G.; LEE, K.H.; KWAK, J.; BAE, K.S. Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 674-679, 2006.

HOUSTON, A.P.C.; VISSER, S.; LAUTENSCHLAGER, R.A. Microbial processes and fungal community structure in soils from clear-cut and unharvested areas of two mixedwood forests. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 76, p. 630–640, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros 2007**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm>. Acesso: 10 mar. 2010.

JESUS, E.D.; MARSH, T.L.; TIEDJE, J.M.; MOREIRA, F.M.D. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME JOURNAL**, New York, v. 3, p. 1004–1011. 2009

JIN-PING, J.; YOU-CAI, X.; HONG-MEI, J.; DE-YOU, Y.; YA-JIE, S.; FENG-MIN, L. Soil microbial activity during secondary vegetation succession in semiarid abandoned lands of loess plateau. **Pedosphere**, Nijjing, v. 19, n.6, p. 735-747, 2009

KARA, O.; BOLAT, I. The Effect of different land uses on soil microbial biomass carbon and nitrogen in Bartın province. **Turkish Journal of Agriculture and Floresty**, Ankara, v. 32, p. 281-288, 2008.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, p. 75-86, 1995.

KENNEDY, N.; CLIPSON, N. Fingerprinting the fungal community. **Mycologist**, New York, v. 17, n. 2, p. 158-164, 2003.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 211–236, 2002.

KIM, J.S.; JOO, J.B.; WEON, H.Y.; KANG, C.S.; LEE, S.K.; YAHNG, C.S. FAME analysis to monitor impact of organic matter on soil bacterial populations. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.12, p.382-388, 2002.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIROMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, London, v. 58, p. 169-188, 2004.

KUWATSUKA, S.; TSUTSUKI, K.; KUMADA, K. Chemical studies on soil humic acids. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 24, p. 337-347, 1978.

KWASNA, H.; WARD, E.; BATEMAN, G.L. Phylogenetic relationships among Zygomycetes from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. **Mycological Research**, Malden, v. 110, p. 501-510, 2006

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL TORRADO, P.; ALLEONI,

L.R.R.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEJON, D.P.H.; CHAUSSOD, R.; RANGER, J.; RANJARD, L. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 614-625, 2005.

LI, Q.; ALLEN, H.L.; WOLLUM, G.H. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 571-579, 2004.

LIM, Y. W.; KIM, B. K.; KIM, C.; JUM, H.S.; KIM, B-S.; LEE, J-H.; CHUN, J. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, n. 3, p. 284-289, 2010.

LODGE, D.J. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 6, p. 681-688, 1997.

LUMLEY, T.C.; GIGNAC, L.D.; CURRAH, R.S. Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. **Canadian Journal of Botany**, Ontario, v. 79, p. 76–92, 2001.

MABUHAY, J.A.; NAKAGOSHI, N.; ISAGI, Y. Soil microbial biomass, abundance and diversity in a Japanese red pine forest: first year after fire. **Canadian Journal of Forest Research**, New Westminster, v. 11, p. 165–173, 2006.

McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.4554-4559, 2001.

MCLEAN, M.A.; HUHTA, V. Microfungal community structure in anthropogenic birch stands in central Finland. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 35, p. 1–12, 2002.

METZGER, J.P. Conservation issues in Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**, Barking, v. 142, p. 1138-1140, 2009.

MIRANDA, M. L. **Diversidade de Oomycota do Parque Estadual da Serra da Cantareira, estado de São Paulo**. 2007, 116 p. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Instituto de Botânica, São Paulo, São Paulo.

MIRANDA, C.C.; CANELLAS, L.P.; TRINDADE NASCIMENTO, M. Caracterização da matéria orgânica do solo em fragmentos de mata atlântica e em plantios abandonados de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 905-916, 2007.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

MORI, S.A.; BOOM, B.M.; FRANCE, G.T. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest species. **Brittonia**, New York, v. 33, n. 2, p. 233-245, 1981.

MUMMEY, D.L.; CLARKE, J.T.; COLE, C.A.; O'CONNOR, B.G.; GANNON, J.E.; RAMSEY, P.W. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1138-1147, 2010.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal Of General And Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. da; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

MYERS, R.T.; ZAK, D.R.; WHITE, D.C.; PEACOCK, A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 65, p. 359–367, 2001.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003.

NIELSEN, U.N.; OSLER, G.H.R.; CAMPBELL, C.D.; BURSLEM, D.F.R.P.; WAL, R. van der. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the

composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **Journal of Biogeography**, Malden, v. 37, p. 1317-1328, 2010.

O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1499–1504, 2000.

OSORIO, N.W.; HABTE, M. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. **Arid Land Research and Management**, Philadelphia, v.15, p.263-274, 2001.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Malden, v.3, p.236-251, 2000

PERSIANI, A.M.; CASADO, M.A. Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest. **Mycologia**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 206-214, 1998.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O.; Brussaard, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, 2006. p. 184-205.

PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; GOMES, A.L. Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da “Reserva Biológica de Paranapiacaba”, Santo André, SP, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 309-329, 2007.

PITTL, E.; INNEREBNER, G.; WANEK, W.; INSAM, H. Microbial communities of arboreal and ground soils the Esquinas rainforest, Costa Rica. **Plant Soil**, v. 329, p. 65-74, 2010

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

RANKIN-DE-MERONA, J.M.; ACKERLY, D.D. Estudos populacionais de árvores em florestas fragmentadas e as implicações para conservação in situ das mesmas na Floresta Tropical da Amazônia Central. **Revista IPEF**, Piracicaba, v. 35, p.47-59, 1987.

REIS, A.S.; FANTINI, A.C.; REIS, M.S.; GERRA, M.P.; DOEBELI, G. Aspectos sobre a conservação de biodiversidade e o manejo da floresta tropical Atlântica. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, p. 169-173, 1992.

RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S. B., CORRÊA, G. F. **Pedologia: Base para distinção de ambientes**. (4. Ed.) Viçosa, MG, NEPUT, 2002. 338p.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Barking, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, London, v. 233, p.167-177, 2001.

RODRIGUES, R.R. **Relatório Científico I – Projeto Parcelas Permanentes LERF/LCB, 2002**. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/publi/banco/index?show+63442863>>. Acesso em: 20 abr. 2010.

_____. **Relatório Científico do Projeto “Diversidade, Dinâmica e Conservação de Florestas do Estado de São Paulo: 40ha de parcelas permanentes”**. Piracicaba: ESALQ, 2004. 327 p.

_____. **Diversidade, dinâmica e conservação em florestas do estado de São Paulo: 40ha de parcelas permanentes**. Piracicaba: ESALQ; Depto. Ciências Biológicas, 2005. 327 p. (Relatório Científico, 3).

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. (Ed.). **Genética e melhoramento de micro-organismos**. São Paulo: USP, 2002. p. 97-129.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; SANTOS, J.C.F.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2006. p. 163-198.

SANTOS, R.D.; LEMOS, R.C.; SANTOS, H.G.; KER, J.C.; ANJOS, L.H.C. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 5. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. 100 p.

SATISH, N.; SULTANA, S.; NANJUNDIAH, V. Diversity of soil fungi in a tropical deciduous forest in Mudumalai, southern Índia. **Current Science**, Bangalore, v. 93, p. 669-677, 2007.

SERRALTA, J.; FERRER, J.; BORRÁS, L.; SECO, A. Effect of pH on biological phosphorus uptake. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 95, p. 875- 882, 2006.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

_____. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational, taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I.; TRUFEM, S.B.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; GRANDI, R.P.; SANTOS, M.L.; GIUSTRA, K.C. Microscopic fungi of the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 244-252, 2006.

SIX, J.; FREY, S.D.; THIET, R.K.; BATTEN, K.M., Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 555–569, 2006.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **Jounal of Basic Microbiology**, Weinheim. v. 43, p. 430–436, 2003.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soilbacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4742–475, 2001.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; Van ELSAS, J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing cloned pcr-amplified genes encoding 18S r RNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, 1999.

SMIT, E., P. LEEFLANG, S. GOMMANS, J. VAN DEN BROEK, S. VAN MIL, AND K. WERNARS. . Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2284-2291 2001.

STEENWERTH, L. K.; JACKSON, L. E.; CALDERÓN, F. J.; STROMBERG, M. R.; SCOW, K. M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1599-1611, 2002.

STANDING, D.; KILLHAM, K. The soil environment. (2007) In: VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J., TREVORS, J.T. (2 Ed). **Modern Soil Microbiology**. CRC: Taylor & Francis Group LLC, 2007. p. 1-22.

SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D.L. (Ed.). **Methods of Soil Analysis**. Madison: SSSA, 1996. pt. 3, p.1011-1069. (Book Series, 5).

TABARELLI, M.; PINTO, L.P., SILVA, J.M.C., HIROTA, M.M.; BEDE, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, SÃO PAULO, v. 1, p.132–138, 2005.

TAKETANI, R. G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of Archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and *amoA* genes. **Microbial Ecology**, Columbus, v. 59, p. 737-743, 2010.

THORN, G. The fungi in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVES, D.S.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 63–127, 1997.

THORN, R.G.; REDDY, C.A.; HARRIS, D.; PAUL, E.A. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4288-4292, 1996.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Micro-organismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

TREVORS, J. T.; VAN ELSAS, J. D. **Nucleic acids in the environment: methods and applications**. Heidelberg: Springer, 1995. 256 p.

USSIRI, D.A., JOHNSON C.E. Characterization of organic matter in a northern hardwood forest soil by ¹³C NMR and chemical methods. **Geoderma**, Amsterdam, v. 111, p.123-149, 2003.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.J.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.3243-3250, 2002.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; WOLTERS, A.K.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing

gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 133-151, 2000.

VERGHESE, G. Soil microflora of plantations and natural rain forest of West Malaysia. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Dordrecht, v. 48, p. 43-61, 1972.

WALLENSTEIN, M.D.; MCMAHON, S.; SCHIMEL, J. Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 428–435, 2007.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.6578-6583, 1998.

WUCZKOWSKI, M.; STERFLINGER, K.; KRAUS, G.F.; KLUG, B.; PRILLINGER, H. Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). **Austrian Journal of Agricultural Research**, Vienna, v. 54, p. 109–117, 2003.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T.M.; MILTNER, A. & SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v.79, p. 117-161, 1997.