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

**Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no
Estado de São Paulo**

Joshua Andrew Halsey

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

**Piracicaba
2012**

Joshua Andrew Halsey
Biólogo

**Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no
Estado de São Paulo**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

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

**Piracicaba
2012**

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

Halsey, Joshua Andrew

Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo / Joshua Andrew Halsey. - - Piracicaba, 2012.
114 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cogumelos 2. Comunidade bacteriana 3. Mata Atlântica 4. Micosfera
5. Microbiologia do solo 6. Pirosequenciamento I. Título

CDD 631.46
H196d

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos os mentores e colegas (todos sabem quem são realmente!) que me ajudaram ao longo deste caminho com todos os seus ganhos, quebra-cabeças e conflitos neste projeto complexo, todos os vocês sabem que realmente não conseguiria sem aquela força! Especialmente agradeço Prof. Dr. Fernando Dini Andreote por me dar a oportunidade de trabalhar com ele, por sua orientação, atenção e confiança. Agradeço também a oportunidade de ter acesso ao tesouro de natureza abundante no Parque Estadual da Serra do Mar, espero que suas belezas fiquem mantidas por sempre, recebendo o respeito e carinho que se merecem.

Em fim, agradeço CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro necessário para completar este projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Objetivos.....	12
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Revisão Bibliográfica	13
2.1.1 Diversidade de microrganismos no solo.....	13
2.1.2 A comunidade bacteriana do solo	14
2.1.3 A comunidade fúngica do solo.....	16
2.1.3.1 Os fungos formadores de cogumelos.....	18
2.1.4 A micosfera.....	20
2.1.5 A dinâmica na micosfera	22
2.1.6 As "highways fúngicas".....	24
2.1.7 Mata Atlântica	25
2.1.8 Relação entre conservação e diversidade de diversos ambientes.....	26
2.1.9 Abordagens moleculares na biodiversidade microbiana	27
2.1.10 O papel de dados sob a diversidade microbiana.....	28
2.1.11 Controle de qualidade e possíveis vieses	29
2.2 Material e Métodos	30
2.2.1 Amostras de solo micosférico e cogumelos em áreas de Mata Atlântica.....	30
2.2.2 Extração de DNA das amostras ambientais	32
2.2.3 Identificação dos corpos de frutificação dos fungos (cogumelos)	33
2.2.4 Análise dos perfis das comunidades bacterianas nos solos micosféricos por meio da técnica de PCR-DGGE	36
2.2.5 Análises estatísticas	38
2.2.6 Sequenciamento de regiões variáveis do gene 16S DNAr por pirosequenciamento	39
2.3 Resultados e discussão.....	41
2.3.1 Identificação dos corpos de frutificação dos fungos (cogumelos)	41
2.3.1.1 A influência de fatores ambientais na qualidade das amostras de cogumelos ..	43
2.3.1.2 As análises de árvores filogenéticas de cogumelos da Mata Atlântica	45
2.3.1.3 Família <i>Marasmiaceae</i>	45
2.3.1.4 Família <i>Lepiotaceae</i>	47

2.3.1.5 Outras famílias fúngicas.....	49
2.3.1.6 A região 18S DNAr como complemento na filogenia de cogumelos	52
2.3.1.7 Dados baseados na buscas BLAST	54
2.3.1.8 Nível trófico inferido	56
2.3.1.9 Saprofitia entre os cogumelos na Mata Atlântica.....	57
2.3.2 Análise dos perfis das comunidades bacterianas nos solos micosféricos por meio da técnica de PCR-DGGE.....	58
2.3.2.1 Comunidades de α - <i>proteobacteria</i> e β - <i>proteobacteria</i> presentes nas micosferas de três parcelas de estudo	61
2.3.3 Análises estatísticas.....	66
2.3.3.1 Comparando os valores de similaridade dentro e entre amostras compostas ...	66
2.3.3.2 Diversidade beta de comunidades bacterianas, de α - <i>proteobacteria</i> e de β - <i>proteobacteria</i>	67
2.3.4 As comunidades bacterianas nos solos micosféricos via pirosequenciamento.....	70
2.3.4.1 Diversidade alfa das comunidades bacterianas.....	70
2.3.4.2 Diversidade beta das comunidades bacterianas	76
2.3.4.3 UTOs com diferenças significativas entre solos micosféricos e controles.....	81
2.3.4.4 Teste <i>paired T</i> para diferenças significativas entre os tratamentos.....	81
2.3.4.5 Teste ANOVA para UTOs significativamente induzidas ou inibidas	83
2.3.4.6 Abundância relativa das UTOs significativas e comparação filogenética	88
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS	111

RESUMO

Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo

A imensa diversidade de micro-organismos no solo leva a uma inevitável riqueza de interações entre espécies. Neste intuito, esse projeto é inovador na identificação dos cogumelos da Mata Atlântica, e na descrição da comunidade bacteriana associada às suas micosferas. Usando corpos de frutificação dos fungos (cogumelos) como indicadores para sistemas ricos em nutrientes, as amostras foram coletadas para investigar as interações entre os fungos (maioria do domínio *Basidiomycota*) e as bactérias presentes no solo em volta das micélios fúngicos (ambiente micosférico). As análises foram feitas com técnicas independentes de cultivo (análise PCR-DGGE, sequenciamento *Sanger* de fragmentos de ITS/18S e pirosequenciamento de *tags* da região V4 de 16S DNAr). As famílias fúngicas *Marasmiaceae* e *Lepiotaceae*, do domínio *Basidiomycota* foram as mais abundantes entre os cogumelos amostrados (13 e 5 cogumelos, respectivamente), e estavam presentes entre todas as três parcelas de estudo. As demais amostras foram alocadas dentro das famílias *Marasmiaceae*, *Lepiotaceae*, *Inocybaceae*, *Lachnocladiaceae*, *Bolbitiaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Hymenogastraceae*, *Mycenaceae* e *Strophariaceae*, além de dois do domínio *Ascomycota*. Baseado na análise de DGGE, é bastante claro que existe uma grande diferença na comunidade bacteriana (de toda a comunidade bacteriana, de α -*proteobacteria* e de β -*proteobacteria*) entre os solos associados ou não com os corpos de frutificação. Os dados de pirosequenciamento indicaram que dentro dos tratamentos as amostras se agruparam baseado nas famílias fúngicas ou no substrato onde os cogumelos ocorrem (solo ou serrapilheira), sendo clara em algumas micosferas as alterações na ocorrência de grupos microbianos. O grupo de UTOs mais induzidas na região da micosfera foi composto dos grupos *Burkholderia*, *Acidobacteria* Gp1, *Comamonadaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Chitinophagaceae*, *Schlesneria*, *Acidobacteria* Gp3 e *Spartobacteria* gênero incertae sedis. Isto indica que existe um processo de seleção para bactérias específicas dependendo das diversas variáveis e fatores ambientais presentes no microhabitat micosfera.

Palavras-chave: Cogumelos; Comunidade bacteriana; Pirosequenciamento; Mata Atlântica; Micosfera

ABSTRACT

Bacterial diversity associated with mushrooms of the Brazilian Atlantic Rainforest in the State of São Paulo

The immense microbial diversity in the soil leads to inevitable richness in inter-species interactions. For this reason, this is a novel project that focuses on identifying mushrooms and the associated bacterial community with their mycospheres in the Brazilian Atlantic Rainforest. Using fungal fruiting bodies (mushrooms) as indicators of nutrient-rich systems, samples were taken to investigate the interactions between fungi (mostly of the domain *Basidiomycota*) and bacteria present in the soil surrounding fungal mycelia (mycosphere environment). The analyses were conducted using culture-independent techniques, where isolating DNA of bacteria and/or mushrooms attempts to provide information on microbial functionality. These culture-independent analyses (PCR-DGGE, Sanger sequencing of ITS/18S fragments, and pyrosequencing of tags from the V4 region of 16S rDNA) generated extensive data on the bacterial diversity selected for in the presence of fungal structures in the soil. The fungal families *Maramiaceae* and *Lepiotaceae*, of the domain *Basidiomycota* were the most abundant among the mushrooms sampled (13 and 5 mushrooms, respectively) and were present in all of the three sampling sites. The rest of the mushrooms were found to be within the families *Marasmiaceae*, *Lepiotaceae*, *Inocybaceae*, *Lachnocladiaceae*, *Bolbitiaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Hymenogastraceae*, *Mycenaceae*, and *Strophariaceae*, in addition to two of the domain *Ascomycota*. Based on DGGE analysis, it is clear that there is a great difference in the bacterial community (entire bacterial community, of α -*proteobacteria* and of β -*proteobacteria*) between all fungal fruiting body-associated and non-associated soils. The pyrosequencing data indicated that within each treatment group, the samples did not separate according to fungal families or substrate where the mushrooms were found (in the soil or among the leaf litter). However, some mycospheres exhibited clearly altered bacterial communities. The group of OTUs most induced in the mycosphere region consisted of *Burkholderia*, *Acidobacteria* Gp1, *Comamonadaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Chitinophagaceae*, *Schlesneria*, *Acidobacteria* Gp3, and *Spartobacteria* genus incertae sedis. This indicates that there is a selection process for specific bacteria depending on a wide range of variable and environmental factors acting in the mycosphere microhabitat.

Keywords: Mushrooms; Bacterial community; Pyrosequencing; Atlantic Rainforest; Mycosphere

1 INTRODUÇÃO

Além da matéria orgânica do solo (MOS) que une as partículas minerais e mantém a estrutura do solo, e os outros componentes químicos e físicos do solo, a vida é abundante neste ambiente, principalmente representada na forma da microbiota. A maioria destes indivíduos vivos microscópicos é composta de bactérias, fungos e arqueias. Todos os microrganismos coexistem e interagem, atuando em vários tipos de transformações essenciais ao funcionamento dos solos. Apesar desta importância ser global, as interações entre bactérias e fungos são o foco deste estudo.

No solo, os microrganismos são altamente envolvidos em processos de ciclagem de nutrientes, resultando na essencialidade de determinados grupos para o crescimento e desenvolvimento das plantas (POOLE et al., 2001; JOHANSSON et al., 2004; UROZ et al., 2007). De acordo com Zavarzin (2008), a ciclagem dos nutrientes começa com a extração de componentes inorgânicos da biomassa pelo processo de mineralização. Portanto, ao longo destes ciclos, os microrganismos estão ativamente envolvidos, pois são os produtores dos principais complexos enzimáticos relacionados com a decomposição da matéria orgânica. É importante lembrar que a estrutura da comunidade microbiana atua nestes ciclos como um todo, no sentido de que cada membro depende dos outros para seu desenvolvimento e sobrevivência.

No entanto, existem processos mais específicos, que ocorrem em determinadas regiões do solo, como a micosfera, ou a rizosfera. Dentor de tais comunidades po ocorrer a ocorrência particular de certos grupos microbianos que estão presentes em menor proporção no solo adjacente. Por esta razão, é importante analisar esta estrutura microbiana na forma de diversidade presente em qualquer ambiente, e tentar entender melhor as funções ambientais baseado nestes dados. O presente projeto tem o objetivo principal de quantificar e avaliar a diversidade das bactérias em solos micosféricos por baixo dos cogumelos da Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

1.1 Objetivos

Desta forma, este estudo segue os objetivos específicos:

- (1) Utilizar amostras de solo micosférico dos cogumelos de três áreas diferentes ocupadas por Mata Atlântica no Estado de São Paulo;
- (2) Extrair DNA destas amostras de solo micosférico (além dos solos controles correspondentes) e dos corpos de frutificação (cogumelos);
- (3) Identificar os cogumelos por meio de análise de sequências das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e *Small-Subunit* (SSU) do DNA ribossomal (DNAr);
- (4) Avaliar a diversidade do gene DNAr 16S de bactérias micosféricas entre os grupos de cogumelo por meio da aplicação da técnica de Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE);
- (5) Determinar a filogenia das bactérias micosféricas entre os grupos de cogumelo por meio de análise de sequências das regiões variáveis do gene DNAr 16S por pirosequenciamento.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Diversidade de microrganismos no solo

É necessário notar quais dos microrganismos estão presentes no solo e quais deles estão envolvidos nas interações alvo deste estudo, consequentemente apresentando uma compreensão mais clara das possíveis funções destes organismos durante esta associação. No solo, a essencialidade da comunidade microbiana não se baseia sobre os grupos taxonômicos que compõem a diversidade microbiana, mas o papel funcional desempenhado por estas comunidades, e quais organismos são atribuídos de determinadas funções. É considerado que, devido a grande diversidade microbiana presente neste ambiente, existe uma grande redundância funcional na maioria dos solos, o que faz com que processos essenciais continuem funcionais mesmo na ocorrência de variações nas condições ambientais (NANNIPIERI et al., 2003; PATERSON et al., 2009). Este aspecto é de crescente importância, pois atividades antrópicas têm alterado significativamente as condições ambientais naturais, afetando diretamente as reservas de biodiversidade do solo. Portanto, o funcionamento deste sistema complexo sob condições naturais devem ser compreendidos para gerar melhores práticas de manejo do solos e evitar a ocorrência as condições restritivas a diversidade microbiana.

Neste sentido, é importante definir os habitats específicos dentro do solo, formados pela influência abiótica e/ou pelas interações biológicas, para entender melhor os processos destes microcosmos (micro-climas ou micro-habitats) nas interações entre organismos distintos (ver figura 1). Em todas estas regiões do solo, existem interações constantes entre os fungos e as bactérias, que podem ser utilizadas como modelos que forneçam informações válidas sobre tais interações.

Além das interações diretas com as plantas vivas, os efeitos positivos da presença da comunidade microbiana no solo incluem a quebra de compostos recalcitrantes húmicos de matéria orgânica dissolvida (MOD) de alto peso molecular (APM) e forma compostos de carbonilo de baixo peso molecular (BPM) (GELLER, 1986; MOPPER et al., 1991; JUDD et al., 2007). A decomposição de serrapilheira, e

por sua vez, o acompanhamento do lançamento de nutrientes e a formação de MOS é um aspecto importante na função do ecossistema (SWIFT et al., 1979; KOIDE et al., 2005). Por esta razão, é necessário entender melhor como cada membro dos diferentes níveis tróficos funcionam em relação aos outros, construindo o sistema complexo que consideramos o ambiente natural.

Com base nestas informações, temos que a superfície subaérea da terra é caracterizada por um mosaico de habitats de solo e de organismos, os quais respondem a distintos estímulos, e apresentam uma grande rede de colaborações entre si.

2.1.2 A comunidade bacteriana do solo

As bactérias são microrganismos procarióticos que variam altamente em formas e dimensões. As bactérias heterotróficas realizam várias funções importantes na transformação de matéria orgânica, dentre elas a produção de biomassa bacteriana e a respiração de C orgânico (DEL GIORGIO e COLE, 1998). As bactérias se associam, formando comunidades cooperativas, com interações baseadas na troca de produtos químicos do metabolismo na cadeia alimentar.

Uma vez que o domínio *Bacteria* é altamente diverso, muitas vezes é necessário considerar as bactérias por grupos ou filos individuais para ter uma ideia global da presença de distintas bactérias no ambiente. De acordo com Janssen (2006), o filo mais abundantemente descrito em vários ambientes é o grupo *Proteobacteria*, tido também como o mais abundante na maioria dos seus solos estudados. Dentro do filo *Proteobacteria* existe uma grande diversidade morfológica, fisiológica e metabólica, sendo essas bactérias de grande importância para os ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre (KERSTERS et al., 2006; SPAIN et al., 2009). No entanto, as análises dos padrões de distribuição de espécies comumente indicam que, embora uma fração significativa da biomassa bacteriana seja pertencente à um número relativamente baixo de espécies, a maioria das espécies bacterianas estão presentes em números extremamente baixos (ASHBY et al., 2007; PEDROS-ALIO, 2006; SOGIN et al., 2006; ELSHAHED et al., 2008).

Embora os microrganismos sejam muito versáteis, as bactérias são ainda limitadas devido os possíveis fatores ambientais que as mesmas não são necessariamente adaptadas. Rousk et al. (2010) indicaram que o crescimento

bacteriano é prejudicado na presença de pH baixo durante a colonização de substrato fresco. Mas como mostrado anteriormente, seus aspectos na formação de comunidade ajudam para superar tais barreiras. Uma das maneiras que as bactérias podem estabelecer tais cooperações, é por meio de uma sinalização química, chamada de sinais de *quorum sensing* (QS), que as mesmas usam para se comunicarem entre si ou com outros tipos de organismos (incluindo fungos) (ALEM et al., 2006; BLANKENSHIP e MITCHELL, 2006; SPRAGUE e WINANS, 2006; LEE et al., 2007; LEVEAU e PRESTON, 2007).

Consequentemente, as populações de bactérias quimiotáticas são capazes de detectar e responder às gradientes químicos e direcionar sua migração para concentrações crescentes de compostos que percebem como benéficos para a sua sobrevivência (FORD e HARVEY, 2006). Dessa forma, a habilidade quimiotática, juntamente com a capacidade destes organismos de anexar e formar biofilmes sobre as hifas de fungos, raízes das plantas e outras superfícies, contribui grandemente para o estabelecimento de tais interações, que podem ser exploradas biotecnologicamente, como por exemplo, no controle biológico (JOHANSSON et al., 2004).

Além disso, a capacidade bacteriana de motilidade é outro fator relacionado ao estabelecimento de tais interações. Uma vez reconhecido o sinal químico, estas precisam se mover em ambientes aquosos ou por longas superfícies usando diferentes modos de translocação (HENRICHSEN, 1972; RASHID e KOMBERG, 2000). Assim, o desenvolvimento de diferentes estratégias na aquisição de nutrientes, como a capacidade de locomoção do flagelo, a formação de biofilme, entre outros, é essencial para o sucesso da colonização bacteriana na micosfera (NAZIR et al., 2010). Além disso, as células bacterianas podem acumular certos nutrientes quando eles estão abundantes, e usá-los quando o ambiente é deficiente (TORTORA et al., 2010). Esta capacidade sustenta a ocorrência de micofagia bacteriana, que definimos como um conjunto de comportamentos fenotípicos que permitem que as bactérias obtenham nutrientes a partir de fungos vivos, convertendo assim a biomassa fúngica em biomassa bacteriana (LEVEAU e PRESTON, 2007).

Em resumo, temos que as bactérias se especializam de acordo com suas necessidades, extraíndo do ambiente e de outros organismos aquilo que precisam para seu metabolismo e sobrevivência. Esta íntima interação pode levar ao

desenvolvimento de interações co-evolutivas, que podem ser muito específicos e demorar muito tempo para se desenvolverem.

2.1.3 A comunidade fúngica do solo

Os fungos são microrganismos eucarióticos e constituem o componente maior da biota do solo (em biomassa) em ecossistemas florestais. Os papéis de fungos no solo podem ser separados de forma simplista em grupos de funções como saprófitos, patogênicos e simbioses de plantas (FINLAY, 2007). No entanto, exceções são abundantes uma vez que algumas espécies realizam mais de uma estratégia, tornando as mesmas difíceis de categorizar (STAMETS, 2005). A saprotrofia é certamente um papel importante dos fungos no solo, sendo tais organismos responsáveis em grande parte pela degradação e ciclagem de material vegetal (serrapilheira), degradando compostos como celulose, lignocelulose e hemicelulose (NAZIR et al., 2010). Os órgãos hipógeos da planta, principalmente as raízes, são na verdade o nicho preferido para fungos do solo que vivem na rizosfera como saprófitas (BONFANTE e ANCA, 2009).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), são agrupados no filo *Glomeromycota* (SCHÜßLER et al., 2001), e penetram nas células das raízes para estabelecer uma simbiose intracelular. Têm sido observado que os mesmos alteram quantitativamente a quantidade de exsudatos das raízes, mas também induzem algumas modificações qualitativas da composição dos exsudatos das raízes (BANSAL e MUKERJI, 1994; AZAIZEH et al., 1995; MARSCHNER et al., 1997; SOOD, 2003; LIOUSSANNE et al., 2010). Nos fungos ectomicorrízicos (ECM), que são relacionados com árvores e arbustos, as hifas permanecem no espaço extracelular, induzindo mudanças importantes na morfogênese da raiz, alterando apenas de forma sutil células epidérmicas e/ou corticais das plantas (BONFANTE, 2001; BONFANTE e ANCA, 2009). No entanto, ao contrário dos fungos micorrízicos arbusculares, os fungos ectomicorrízicos muitas vezes não são mutualistas obrigatórias, e comumente estão habitando os solos altamente ricos em matéria orgânica (DICKIE et al., 2002). Tais organismos possuem atividade alta metabólica, dirigida principalmente à exploração de diversas fontes de carbono presentes neste ambiente (BURKE e CAIRNEY, 2002; SOUKUPOVÁ et al., 2008).

Os fungos associados à decomposição da serrapilheira e dos materiais florestais são classificados funcionalmente como fungos *litter-decomposing* (decompositores de serrapilheira), mas outros grupos funcionais, tais como fungos *wood-decomposing* (decompositores de madeira) e fungos micorrízicos foram descritos como importantes na decomposição da lignina na serrapilheira (OSONO, 2007). Os fungos *white-rot* (podridão-branca) são importantes organismos decompositores de madeira em ecossistemas florestais. Sua capacidade de colonizar e decompor os recursos lenhosos pode ser fortemente influenciada pelas bactérias que habitam a madeira, usando compostos que são liberados da madeira devido a ação de enzimas fúngicas (FOLMAN et al., 2008). Os decompositores terciários também são envolvidos, mas são difíceis de categorizar porque o grupo inclui os fungos encontrados na fase final do processo de decomposição e prosperam nos ambientes criados por decompositores primários e secundários ao longo de um período de anos, comumente aparecendo como cogumelos em solos que contêm pouco material decomponível (STAMETS, 2005).

Já tornou-se bastante evidente que as espécies fúngicas (além de algumas bactérias como as actinobactérias) são altamente importantes no processo de "SOM-priming", um processo que envolve a mineralização inicial da MOS e a liberação de nutrientes que foram originalmente associados com as partículas unidas quimicamente no solo (GARCIA-PAUSAS e PATERSON, 2011). Isto tem vantagens para as plantas, que recebem tais nutrientes, e mantém seu papel de atual como principais fornecedoras de carbono lábil no solo. Além disso, esta relação estabelecida entre os fungos e as plantas tem implicações importantes tanto nos sistemas naturais quanto nos sistemas agrícolas.

Semelhante às cepas bacterianas, os fungos apresentam uma grande diversidade de filos onde se hospedam sistematicamente suas diversas famílias. A capacidade de certos fungos se desenvolverem em habitats com maior distribuição espacial de nutrientes e minerais atribui a este grupo parte da translocação de nutrientes, realizando a redistribuição de material internamente por meio de sua rede micelial (BOSWELL et al., 2002). Embora as espécies fúngicas sejam mais versáteis nos padrões de crescimento em geral, a recolonização dos fungos em áreas impactadas é mais lenta do que o re-estabelecimento de comunidades bacterianas (PIETIKÄINEN e FRITZE, 1995; BÁRCENAS-MORENO et al., 2011).

Além disso, dependendo do tipo do fungo, as colônias podem também apresentar formas diferentes. Aqueles que habitam um substrato particular (ou seja, os componentes como a madeira específica ou uma folha individual) são considerados "componente restritos", enquanto que aqueles capazes de se expandir para o sistema inteiro de serrapilheira ou substrato diferente (ou seja, no solo ou entre múltiplas folhas) são considerados "componente não restritos" (OSONO, 2007). Estes últimos são mais interessante no caso das interações bacterianas com fungos, porque eles são menos restritos pelas limitações espaciais. Apesar de todos os fungos e bactérias compartilharem algum tipo de interação, os fungos "componente não restrita" são o foco deste estudo, pois eles podem ser encontrados tanto no solo quanto sobre a serrapilheira presentes em áreas de florestas.

2.1.3.1 Os fungos formadores de cogumelos

Embora exista uma grande diversidade de fungos, neste presente estudo os grupos saprófitas e micorrízicos que produzem corpos de frutificação (cogumelos) são o foco principal. Recentemente, tornou-se evidente que o solo em torno dos feixes de hifas debaixo de cogumelos representam um importante reservatório de compostos carbonados acessíveis, gerando um processo forte de seleção de bactérias específicas do solo, que se tornam dessa maneira, associadas as hifas fúngicas (WARMINK e VAN ELSAS, 2008; WARMINK et al., 2009; BOERSMA et al., 2009; BOERSMA et al., 2010). Por exemplo, no solo por baixo de cogumelos, podem ser observadas densas massas de hifas, que promovem a disponibilidade de nichos diferenciados para a colonização bacteriana. Ao longo de um período, este ambiente apresenta uma alteração química resultante da senescência do corpo de frutificação. Assim, as formas das nutrientes disponíveis mudam, alterando os grupos de bactérias favorecidas pela presença do fungo (NAZIR et al., 2010). Embora seja importante notar que o aparecimento inicial de cogumelos pode ser resultado de um estresse ambiental, causado por exemplo, por um esgotamento de fontes nutricionais, e induzindo os fungos a formarem estruturas de reprodução (DE BOER et al., 2005). Portanto, este estresse gera também um novo ambiente, que por sua vez seleciona bactérias, quer poderiam estar sob condição de forte pressão de seleção no solo, e agora encontra-se sob condições mais favoráveis na área próxima as hifas. Estes assunto ainda é carente de vários estudos, especialmente

porque o nosso entendimento sobre a diversidade de cogumelos, e bactérias selecionadas por tais estruturas, são ainda incipientes.

Nem todos os fungos são capazes de produzir cogumelos, sendo esta característica típica do domínio *Basidiomycota*, que se reproduzem sexualmente por meio do processo de plasmogamia, formando um corpo de frutificação quando duas linhagens compatíveis se encontram; ou assexuadamente, quando um fragmento das hifas fúngicas se libera do micélio vegetativo (TORTORA et al., 2010). Apenas cerca de 10% dos fungos são capazes de formar cogumelos (HAWKSWORTH, 2001), e apenas cerca de 10% das espécies de cogumelos existentes já foram identificadas (STAMETS, 2005). Isto faz a identificação de cogumelos encontrados em áreas pouco exploradas, como florestas, bastante difícil, tanto quando as comparações são baseadas em características fenotípicas, como na comparação de sequências de DNA, pois em ambas situações as características do novo cogumelo são comparadas com a pouca informação que já está disponível. Curiosamente, segundo Stamets (2005), mesmo após o estabelecimento do fungo na forma de hifa, pode passar até décadas antes que se forme um novo cogumelo, o que limita ainda mais o entendimento completo da taxonomia deste grupo. Isto indica que algumas espécies fúngicas podem estar presentes por muito tempo no solo, atuando de forma significativa sobre o ambiente, mas sem apresentar a formação de corpos de frutificação.

Do ponto de vista físico, os micélios fúngicos melhoram a agregação do solo, atuando de forma mais intensa sobre a estrutura do solo do que o efeito rizosférico (SCHREINER e BETHLENFALVAY, 1995; FREY-FLETT et al., 2004). O desenvolvimento de fungos poderia ser a causa primordial para o aumento de pH no solo, devido a degradação dos ácidos carboxílicos ou do processo de amonificação. Nazir et al. (2010) propuseram recentemente que o crescimento das hifas fúngicas alivia a pressão de baixo pH na sobrevivência e crescimento de bactérias nos solos ácidos. Além disso, como as gerações dos micélios passam por ciclos no mesmo habitat, a profundidade e umidade do solo aumentam, aumentando também a capacidade de absorção do ambiente e a diversidade dos seus membros da comunidade microbiana (STAMETS, 2005).

2.1.4 A micosfera

Como já foi comentado anteriormente, no solo muitos fungos e bactérias ocupam o mesmo habitat, assim formando a interface chamada fungo-bactéria numa região chamada de "micosfera" (JOHANSSON et al., 2004). Os estudos tradicionais já revelaram a presença de células bacterianas nesta relação, por exemplo, na superfície das hifas, esporos de fungos e em associação micorrízica com corpos de frutificação (DE BOER et al., 2005). A constante ocorrência de bactérias nas áreas de solo em volta das hifas fúngicas podem demonstrar a importância dessa interação nos solos (NAZIR et al., 2010). Assim, a atividade hidrolítica das enzimas extracelulares fúngicas no material rico em lignoceluloses resulta na produção de açúcares solúveis em água e compostos fenólicos (CESPEDES et al., 1997; LANG et al., 2000; TORNBERG et al., 2003; DE BOER et al., 2005). Estes solutos orgânicos compreendem as próprias fontes de carbono e energia para os fungos, mas também servem como substratos de crescimento excelentes para outros microrganismos como bactérias. De acordo com Dabire et al. (2007), os compostos orgânicos produzidos por micélios podem gerar microsítios para a colonização e o crescimento microbiano (JOHANSSON et al., 2004). Corrobora com tais resultados a observação de que a micosfera suporta diferentes atividades bacterianas não encontradas no solo adjacente (ANDRADE et al., 1998; MANSFELD-GIESE et al., 2002; MARSHNER e TIMONEN, 2005; DABIRE et al., 2007).

Alguns micélios foram encontrados formando densos conglomerados (mats) de hifas fúngicas ectomicorrízicas em ecossistemas florestais, onde estima-se que tais complexos possam cobrir até 40% da superfície do solo (KLUBER et al., 2010). No entanto, tornou-se importante especificar de forma mais detalhada as zonas da micosfera, com a finalidade de realizar estudos comparativos desta natureza. Embora a terminologia possa ser interpretada de várias maneiras por uma questão de simplicidade, o presente estudo refere-se a "micosfera" como o ambiente específico, formado pela interface do ambiente diretamente adjacente as hifas de corpos de frutificação fúngicos (cogumelos), que podem ser encontrados tanto diretamente no solo quanto entre o cogumelo e a serrapilheira (ver figura 1). Estudos relevantes ao micosfera já descobriram a que existem comunidades bacterianas induzidas nesta região (KLUBER et al., 2011), incluindo a seleção de *Sphingomonadaceae* (BOERSMA et al., 2009) e bactérias semelhantes a *Variovorax*

Figura 1 - O corpo de frutificação de fungo ou cogumelo (a) utilizado como indicador do micro-ambiente micosfera no solo (b) e entre a serapilheira (c) em volta dos micélios fúngicos. O crescimento fúngico não-restrito pode colonizar as folhas na forma de biofilme (d) e/ou pode estabelecer o micro-ambiente micorrizosfera (e) pelos micélios formando as micorrizas específicas associadas com as raízes das plantas. Note que a rizosfera (f) é um micro-ambiente separado, sem a presença de micélio fúngico e que o solo *bulk* (g) representa o solo em geral, sem contato imediato com as raízes das plantas ou os micélios fúngicos

paradoxus (BOERSMA et al., 2010). Estes estudos indicam o possível envolvimento de mecanismos de secreção tipo III neste tipo de interação (WARMINK et al., 2008), e a diferença desta seleção entre diversos cogumelos (WARMINK et al., 2009). Adicionalmente, muitas revisões reúnem informações pertinentes a estas interações (LEVEAU e PRESTON, 2007; NAZIR et al., 2010; VAN ELSAS e BOERSMA, 2011). Assim a micosfera construída pelas hifas fúngicas fornece um ambiente altamente específico que pode suportar condições benéficas (ou também antagônicas) para os microorganismos especializados. A próxima seção revela a dinâmica que ocorre neste ambiente.

2.1.5 A dinâmica na micosfera

Existem várias características que tornam a vida microbiana em associação mais eficientes, sendo a maioria delas responsável pela possibilidade do microrganismo utilizar determinados recursos em associação, os quais ele não seria apto a utilizar se vivendo na forma isolada. Por exemplo, sabe-se que os fungos têm a capacidade de translocação de nutrientes (JENNINGS, 1987), e que as hifas fúngicas são melhor adaptadas do que bactérias para atravessar locais pobres em nutrientes no solo (DE BOER et al., 2005). Dessa forma, pode-se sugerir que bactérias que se associam a fungos tem maior capacidade de dispersão no ambiente. No entanto, o ambiente micosférico pode ser também hostil, principalmente pela presença de organismos capazes de competir de forma bastante efetiva pelos nutrientes liberados das hifas fúngicas, como a indução de organismos produtores de substâncias antagônicas devido a liberação transiente de açúcares pelas hifas de fungos (DEL GIORGIO e COLE, 1998).

Assim, para as bactérias realizarem a interação com os fungos elas seriam obrigadas à suportar as condições de sobrevivência do solo micosférico. Essas condições podem promover o crescimento bacteriano pela disponibilidade de nutrientes, mas podem também ser adversas, por exemplo, devido a liberação nesta área, de compostos antibacterianos (DE BOER et al., 2005). Segundo Leveau e Preston (2007) os organismos biotróficos extracelulares não matam as hifas fúngicas mas vivem na proximidade, comumente realizando a colonização das superfícies destas hifas e utilizando-se dos nutrientes exsudados. Tais organismos são capazes

Figura 2 - Mecanismos de transporte: a, o anexo e a formação de biofilmes perto da ponta apical do micélio fúngico pode promover o transporte bacteriano; b, as bactérias incapazes à motilidade (sem flagelos) podem ser transportadas passivamente no filme de água exsudada pelo micélio. **Mecanismos de comunicação e defesa:** c, a comunicação bacteriana por compostos específicos; d, a defesa fúngica contra as bactérias antagonistas. **Mecanismos de biotrofia:** e, a necrotrofia extracelular com ataque bacteriano e entrada da célula do fungo; f, a biotrofia extracelular, a exsudação induzida sem matar a célula do fungo; g, a biotrofia endocelular, a ingressão e consequente transmissão vertical; h, a utilização passiva do efluxo de conteúdo dos micélios; i, a utilização passiva de água exsudada dos micélios fúngicos

Adaptado de Leveau e Preston, 2007 e Nazir, 2009.

de tolerar ou suprimir a produção de metabólitos antibacterianos por células fúngicas, e podem ser capazes também de modular o metabolismo fúngico para promover a liberação de nutrientes (LEVEAU e PRESTON, 2007). Contrariamente, as bactérias não biotróficas secretam substâncias químicas, tais como a fosfolipase C e Fenazinas, que podem resultar na morte das hifas fúngicas (KERR et al., 1999; HOGAN et al., 2002; GIBSON et al., 2009; PELEG et al., 2010). Tais dinâmicas na micosfera estão apresentadas na figura 2.

Existem estudos na literatura sobre o assunto (JOHANSSON et al., 2004; DE BOER et al., 2005; entre outros), mas muito pouco é entendido ainda sobre as interações entre fungos e bactérias no solo (NAZIR et al., 2010). Por exemplo, foi descrito que a bactéria *P. fluorescens* BBc6R8 é capaz aumentar a micorrização por meio da melhoria da viabilidade dos fungos, especialmente quando este se desenvolve sob condições desfavoráveis (BRULE et al., 2001; NAZIR et al., 2010), o que deu a tais bactérias a denominação de "*mycorrhizal helper bacteria*" (MHB) (GARBAYE, 1994). Essas implicações permitiram o desenvolvimento de aplicações em áreas de solo natural e agrícola. De acordo com Artursson et al. (2006), o aumento do conhecimento nesta área pode ser usado para projetar inoculantes melhores para a manutenção da produção agrícola e na geração de sistemas sustentáveis de cultivo.

2.1.6 As "*highways* fúngicas"

Conforme comentando anteriormente, a quimiotaxia bacteriana pode ter implicações importantes, como por exemplo o que foi demonstrado por Kohlmeier et al. (2005), indicando que as bactérias podem se mover ao longo da superfície das hifas fúngicas ("*highways* fúngicas") pela motilidade flagelar. A motilidade bacteriana aparentemente requer um filme líquido contínuo sobre as hifas porque os movimentos não ocorrem nas hifas hidrofóbicas (GRUBE e BERG, 2009). Sua colonização nas hifas pode também envolver a formação de biofilme como um segundo mecanismo de migração na ponta da hifa fúngica em vez de motilidade, como foi revelado por análises mais detalhadas de uma cepa bacteriana *Burkholderia terrae* (GRUBE e BERG, 2009). Um aumento das bactérias que abrigam o sistema de secreção do tipo III (TTSS) também tem sido observado na micosfera do fungo ectomicorrízico *Laccaria proxima* (WARMINK e VAN ELSAS,

2009), sugerindo que os TTSSs são envolvidos nas interações de tais bactérias com os fungos.

A capacidade das bactérias do solo migrarem via hifas fúngicas representa um mecanismo que pode proporcionar um grande impulso à sua competência ecológica (NAZIR et al., 2010), pois lhes permitem alcançar novos micro-habitats que conferem novas oportunidades ecológicas (WARMINK et al., 2010). Há espécies bacterianas encontradas induzindo a extensão das hifas fúngicas como resposta fisiológica (KOBAYASHI et al., 2009), o que pode servir para beneficiar os fungos, mas consequentemente auxiliando a dispersão e multiplicação das bactérias micosféricas. Entre os outros aspectos, também é conhecido que os fungos micorrízicos arbusculares influenciam os agregados do solo através da exsudação de glicoproteínas, como glomalina (ZHU e MILLER, 2003; ARTURSSON et al., 2006), possivelmente facilitando o transporte de bactérias nas proximidades. No entanto, as interações entre fungos e bactérias na interface de fungo-bactéria pode variar de acordo com a fisiologia microbiana e das condições ambientais do solo.

2.1.7 Mata Atlântica

O bioma Mata Atlântica é um dos ecossistemas mais antigos e ricos do mundo, composto de ecossistemas distintos e caracterizados principalmente pelas condições locais de clima e topografia, mas também um dos mais ameaçados pela ação antrópica (MYERS et al., 2000; GONÇALVES e BRANDÃO, 2008). Esse bioma é encontrado principalmente no território brasileiro, mas também em partes da Argentina, Paraguai e em menor medida, no Uruguai (MATA ATLÂNTICA, 2010). A Mata Atlântica do Brasil se estende da costa do Rio Grande do Sul ao Ceará (DUBOIS, 2008). Portanto, devido à variação geográfica bastante ampla, a Mata Atlântica incorpora uma grande variedade de habitats que permitem a determinação de zonas distintas, onde ocorrem espécies altamente especializadas às condições predominantes na área. Por esta razão, este bioma é considerado um dos "*hot spots*" mais importantes no mundo (MYERS et al., 2000; LAURANCE, 2008), e está entre aquelas áreas de maior riqueza e diversidade florística (PRATA et al., 2011)

No início da colonização do Brasil, a Mata Atlântica ocupava 1.233.875 quilômetros quadrados de floresta nativa (MATA ATLÂNTICA, 2010). No entanto com a expansão humana moderna, o desmatamento rápido levou à fragmentação

deste bioma. Atualmente, resta apenas 99.944 Km², ou 7% do seu tamanho original (MATA ATLÂNTICA, 2010). Por isso, é cada vez mais importante usar as florestas existentes disponíveis para aprender sobre a estrutura e o funcionamento deste bioma de forma sustentável (*CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL* et al., 2000; GONÇALVES e BRANDÃO, 2008).

A importância deste bioma é exibida pela sua imensa reserva biológica, considerada uma das mais produtivas do mundo. Embora os solos da Mata Atlântica sejam ricos em matéria orgânica, vários elementos são relativamente indisponíveis, por exemplo, o nitrogênio (MIRANDA et al., 2007; GAMA-RODRIGUES et al., 2008). Daí a importância do papel da comunidade microbiana é aparente, influenciando na disponibilidade desses elementos na cadeia alimentar, fazendo com que a fauna e a flora, altamente dependentes neste ecossistema, possam se desenvolver (TONHASCA, 2005). Apenas como alguns exemplos dessa fonte valiosa de dados sobre a biodiversidade, nos estudos da Mata Atlântica recentes têm investigados as espécies de insetos (GONÇALVES e BRANDÃO, 2008), árvores (PRATA et al., 2011), bactérias/arquéias (LAMBAIS et al., 2006; LIMA, 2011) e fungos (ROSA e CAPELARI, 2009). No entanto, é importante aproveitar desta diversidade rica e ao mesmo tempo considerar as implicações de conservação sob esses recursos.

2.1.8 Relação entre conservação e diversidade microbiana

Como comunidades microbianas são afetadas pelas variações temporais, o equilíbrio das populações pode variar drasticamente com as mudanças ambientais. Por exemplo, o processo de desmatamento local provoca um aumento nos fungos saprófitos e um declínio em cogumelos micorrízicos (STAMETS, 2005). Então a ocorrência de fungos na Mata Atlântica e a distribuição de fungos ligninolíticos têm sido estudadas sazonalmente e anualmente.

Além disso, a quantidade e a qualidade da entrada de serrapilheira, como um resultado da composição de espécies vegetais, influenciam a estrutura, composição e distribuição espacial da comunidade microbiana decompositora (DE SANTO et al., 2002; HE et al., 2009). Estudos sobre toda a comunidade e estudos sobre os táxons individuais revelaram que, com altos níveis de resolução taxonômica, há um grau de endemismo procarionte aparente entre grandes escalas geográficas (FULTHORPE et al., 1998; CHO e TIEDJE, 2000; WAWRIK et al., 2007; FULTHORPE et al., 2008).

Isto é evidente no caso de simbiose entre fungos micorrízicos e as plantas hospedeiras, além do grupo MHB.

No entanto, a matéria vegetal morta também serve como um importante determinante das comunidades microbianas, porque constitui substrato para o desenvolvimento microbiano, selecionando as espécies com habilidades para obter energia deste recurso. Anteriormente, foi descrito que as diferenças entre as diversas serapilheiras ou tipos de solo são muitas vezes maior em magnitude sobre a estrutura da comunidade microbiana, do que os efeitos relacionados a outras variáveis, como por exemplo, a umidade (LUNDQUIST et al., 1999; MCLEAN e HUHTA, 2000; WILKINSON et al., 2002; FIERER et al., 2002). Por esta razão, é importante reconhecer as qualidades potenciais diferentes entre as áreas individuais de estudo (ou seja, parcelas), que podem ter influência diferencial na comunidade microbiana, revelando a seleção de diferentes fatores em cada uma das áreas estudadas.

2.1.9 Abordagens moleculares na biodiversidade da diversos ambientes

Segundo Grube e Berg (2009), a investigação das interações entre os fungos e bactérias é um campo emergente de pesquisa que envolve a aplicação de ferramentas de ecologia microbiana moderna, e só usando técnicas modernas baseadas em DNA/RNA e microscópicas somos agora capazes de analisar a abundância, composição e estrutura das comunidades microbianas. No entanto, até agora houve uma lacuna no conhecimento entre a ecologia de determinadas espécies de cogumelos tropicais e a comunidade bacteriana associada presente, aplicando as técnicas de alto rendimento no estudo de tais comunidades microbianas.

Especialmente com o advento de métodos de análise de DNA ribossomal que agora facilita a caracterização dessas comunidades não cultiváveis, há possibilidade de analisar toda a extensão da diversidade microbiana em grandes escalas espaciais (FIERER e ROBERT, 2006). As análises independentes de cultivo do gene RNAr 16S/18S são rotineiramente utilizadas para avaliar a diversidade microbiana em diversos habitats ambientais, onde existe a possibilidade de sequenciamento de DNA ambiental. Por exemplo, o sequenciamento Sanger de sequências de DNA foi utilizado para determinar a diversidade filogenética, por exemplo de fungos ECM

formadoras de densos conglomerados nos solos de Douglas-fir em uma floresta experimental (DUNHAM et al., 2007; KLUBER et al., 2010). Por meio do sequenciamento da região ITS dos fungos ECM e dicas das raiz, Dunham et al. (2007) observaram a diversidade dos fungos ECM formadoras de densos conglomerados a ser muito maior do que acreditava no passado. O processo de sequenciamento tem permitido mais oportunidades para identificar as espécies e/ou géneros específicos presentes no ambiente.

Além disso é o uso de outras técnicas moleculares como DGGE para analisar a diversidade destes micro-habitats baseando-se nos genes DNAr 16S (HEAD et al., 2004). Assigbetse et al. (2005) observaram que a microbiota total do solo foi significativamente diferente entre os tratamentos com a presença de fungos e sem como revelado por análise de DNA pela técnica DGGE. Os resultados da técnica DGGE fornecem informações valiosas sobre os papéis ou funções de espécies bacterianas na comunidade bacteriana.

No entanto, embora as diferenças podem ser observadas deste modo, a técnica DGGE é dependente da localização e da intensidade de diferentes perfis de bandas (representando a presença ou ausência das comunidades microbianas). As bandas nos géis de DGGE, por sua vez, podem representar múltiplas espécies ou, em contraste, as mesmas espécies podem ser representados por múltiplas bandas (DOWD et al., 2008; NÜBEL et al., 1997; CLEARY et al., 2012). Assim, tornou necessário para comparações mais detalhadas da estrutura da comunidade, que é a distribuição do número total de indivíduos entre as espécies na comunidade (BEGON et al., 1996), essencial para correlacionar a abundância relativa de um grupo taxonômico com uma atividade específica (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005). A análise de pirosequenciamento fornece uma estimativa muito mais em profundidade (maior resolução) e uma estimativa precisa da diversidade microbiana do que outros métodos moleculares como DGGE (DOWD et al., 2008; NAKAYAMA, 2010; CLEARY et al., 2012).

2.1.10 O papel de dados sob a diversidade microbiana

O pirosequenciamento de fragmentos amplificados pelo *polymerase chain reaction* (PCR) que metam as regiões variáveis no gene RNAr 16S rapidamente tornou um método poderoso para analisar a composição e estrutura das

comunidades microbianas. Em Roesch et al. (2007) o pirosequenciamento foi utilizado para determinar a profundidade da diversidade microbiana e estimar a abundância dos filos em cada solo (FULTHORPE et al., 2008). Os dados resultantes são úteis para ilustrar os filos proeminentes presentes e assim oferecer explicações possíveis de funcionalidade ecológica entre solos. Além disso, a natureza de high-throughput (alto rendimento) e baixo custo de pirosequenciamento oferece novas oportunidades para estudar as dinâmicas das comunidades microbianas no tempo e no espaço ou em variações nas condições ambientais (HOLLISTER et al., 2010). Embora muito valioso na informação e útil para este tipo de conhecimento, tal técnica produz um número tão alto de sequências, que programas computacionais específicos são necessários para se realizar tais análises.

Como o âmbito de ensaios microbianos expande com o crescimento paralelo na capacidade de sequenciamento, um significativo efeito gargalo tem sido observado na análise dos dados (SCHLOSS, 2009). Segundo Schloss (2009), os sistemas mais utilizados para o alinhamento das sequências geradas na qualidade e velocidade do trabalho realizado. O alinhamento múltiplo das sequências (AMS) é fundamental para a geração de filogenias e o cálculo das distâncias genéticas significativas que podem ser usados para atribuir as unidades taxonômicas operacionais definidas (UTOs) (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; SCHLOSS, 2009). A distribuição de abundância de sequências entre as UTOs fornece os parâmetros necessários para estimar a riqueza, equitabilidade e a diversidade ecológica de comunidades individuais, bem como a riqueza das UTOs compartilhadas entre as comunidades (SCHLOSS, 2008). Além disso, os bancos de dados que são usados para comparação pode também ser composto de dados de baixa qualidade ou não representar adequadamente as espécies particulares de interesse. Assim, há muitas escolhas importantes a serem feitas em relação a como tratar os seus dados, tomando cuidado de evitar viés e manter a qualidade quando comparando entre as sequências disponíveis como referência.

2.1.11 Controle de qualidade e possíveis vieses

Como com qualquer análise molecular, é importante considerar os possíveis vieses envolvidos, portanto sempre tentando alcançar o melhor controle sobre a qualidade da análise realizada. No entanto, os estudos recentes têm indicado que a

abordagem pirosequenciamento fornece uma melhor resolução filogenética quando baseado nas regiões específicas do RNAr 16S, ou seja, as regiões V4, V5+V6 e V7+V6, que proporcionam resultados semelhantes aos sequências completas (ver YOUSSEF et al., 2009). Assim, é muito importante verificar as atribuições taxonômicas imprecisas com o uso de análises de construção das árvores filogenéticas, especialmente ao nível subfilo.

Mesmo assim, como comentado anteriormente sobre o caso de fungos, existem algumas inconsistências nas identificações porque nem todas as espécies são contabilizadas nos bancos de dados atuais e nem todas foram descritas na natureza. Cai et al. (2009) descobriram que a análise filogenética usando dados de sequências de ITS é uma ferramenta útil para apenas dar uma identificação preliminar das espécies de fungo *Colletotrichum* ou colocá-los em complexos de espécies. Para aliviar os obstáculos envolvidos na identificação correta, Nilsson et al. (2005) desenvolveram um projeto (*emerencia*) para monitorar automaticamente pelo menos as sequências de ITS não identificadas no GenBank, indicando que há esforços para melhorar a consciência dos problemas atuais (ver www.emerencia.org/).

Em contraste a abordagens unicamente baseados em sequências, devido a algumas complicações adicionais na identificação de cogumelos específicos, as ocorrências dos erros de identificação mesmo à nível morfológica têm sido relatados. Por exemplo, embora o cogumelo *Agaricus blazei* Murrill tenha sido originalmente descrito em Piedade, São Paulo (DIAS et al., 2004), este foi classificado incorretamente com base em dados filogenéticos da época de 1945 e desde então, foi renomeado para *Agaricus brasiliensis* (WASSER et al., 2002; STAMETS, 2005). Assim, ilustrando que com a expansão do conhecimento, a atualização e eficiência da informação é importante para avançar os campos da ciência com precisão.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostras de solo micoférico e cogumelos em áreas de Mata Atlântica

Os experimentos foram realizados no Departamento de Ciências do Solo da ESALQ/USP, Piracicaba/SP. Durante o presente estudo dos solos micoféricos de cogumelos da Mata Atlântica, três áreas distintas em altitude foram amostradas. Est-

Figura 3 - Mostrando os núcleos Santa Virgínia e Picinguaba no município de Ubatuba, São Paulo, Brasil na escala de região. A mapa (direito) indica as três parcelas específicas de estudo na área de estudo no Parque Estadual da Serra do Mar

as parcelas são distribuídas em dois grupos no interior do Parque Estadual da Serra do Mar: Picinguaba (23°34'S e 45°02'W) e Santa Virgínia (23°17'S e 45°11'W). De Picinguaba, uma área localiza-se na costa (0-5 m acima do nível do mar) e o outro local é área de restinga (altitude de 50-100 m), sendo que as amostras de Santa Virgínia foram obtidas a partir de uma região mais montanhosa (altitude 900-1000 m). A primeira amostragem foi em setembro de 2010 e a segunda em março de 2011, com o intuito de comparar os efeitos das chuvas sazonais.

Em cada parcela, as amostras de corpos de frutificação (cogumelos) foram retiradas por inteiro (figura 4), incluindo o solo superficial (4 cm de profundidade) que adere bem aos corpos de frutificação dos fungos (BOERSMA et al., 2009), gerando amostras de aproximadamente 50g. Próximo a cada cogumelo coletado (aproximadamente 1m distante), foram também coletadas amostras do solo controle, livres da influência das hifas oriundas dos cogumelos. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório sob refrigeração (4 °C). No total foram obtidas 65 amostras, distribuídas nas três áreas e durante as duas coletas, sendo todos os cogumelos amostrados em distâncias de aproximadamente 50 a 100 m.

Após isso, o material foi levado ao laboratório, onde foram processados segundo Boersma e colaboradores (2009). Os corpos de frutificação foram removidos, e a porção inserida no solos foi cuidadosamente usada na remoção do solos aderido as hifas. Esta fração foi bastante pequena, sendo estes "solos micosféricos" representados por vezes por menos de 0.05g. Posteriormente, estas amostras, juntamente com amostras dos solos controle, foram submetidas a extração do DNA de todos os solos micosféricos, solos controles e dos cogumelos.

2.2.2 Extração de DNA das amostras ambientais

O isolamento de DNA ambiental dos corpos de frutificação (encontrado na micosfera) foi realizado segundo Warmink e van Elsas (2008). De cada amostra de solo, o DNA foi extraído pelo *MoBio PowerSoil® DNA Isolation kit* (MoBio, EUA) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante.

Os protocolos de extração de DNA dos cogumelos foram avaliados e utilizados quando necessário durante o desenvolvimento do projeto e foram realizados segundo Basilio de Azevedo (2008). Após a extração, a integridade e a

qualidade do DNA obtido foram verificadas em alíquotas de 5 µL submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA), seguida coloração em *Sybr Green* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e visualização em luz ultravioleta. Como padrão molecular, foi utilizado 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo eletroforético de 80V por aproximadamente 40 minutos. A aquisição da imagem do gel foi feita utilizando-se o densitômetro *StormTM* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisada pelo *software* Image Quant TL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C em tubos Eppendorf de 1,5 mL até serem submetidas a extração de DNA e posterior reação em *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

2.2.3 Identificação dos corpos de frutificação dos fungos (cogumelos)

A identificação dos fungos e os procedimentos foram realizados segundo Warmink et al. (2009). Os corpos de frutificação selecionados a partir do DNA micossférico foram sequenciados para identificação dos fungos, através de caracterização molecular por meio do sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e *Small-Subunit* (SSU) do DNA ribossomal (DNAr) (ver Anexo A). Além disso, outras técnicas de identificação e/ou bancos de dados morfológicos foram avaliados e usados ocasionalmente, especialmente em casos em que a morfologia mostrou-se bastante similar entre os cogumelos coletados e os presentes nos bancos de dados.

O DNA extraído dos corpos de frutificação foram utilizados para a amplificação da região ITS do DNAr em reação de amplificação com os *primers* ITS1 (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (PREWITT et al., 2008), sendo o tamanho do fragmento esperado de 900 pb. As reações de ITS foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada *primer*, em solução tampão para DNA polimerase *Taq* contendo 1 U DNA polimerase *Taq*[®] (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 µL de DNA molde (5 a 10 ng). As condições de amplificação da PCR foram de desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C; seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C; seguidos de uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

O produto de amplificação foi utilizado como DNA molde para a segunda reação de amplificação (*nested PCR*) com os *primers* ITS1 e ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'), e ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') e ITS4 para as regiões específicas ITS1 e ITS2, respectivamente, sendo para cada o tamanho do fragmento esperado de 450 pb. As reações foram feitas num volume de 50 µL, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde, e com 0,5 µL de formamida (1%) e poucas alterações às reações, conforme descrito anteriormente para a reação de amplificação da região de ITS.

Adicionalmente, o DNA extraído dos corpos de frutificação de fungos foram utilizados para a amplificação da região SSU (18S DNAr) do DNAr em reação de amplificação com os *primers* NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') e NS8 (5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3') (WHITE, 1990), sendo o tamanho do fragmento esperado de 2000 pb. As condições de amplificação da PCR para 18S foram de desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C; seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 53°C, 2 minutos a 72°C; seguidos de uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

O produto de amplificação foi utilizado como DNA molde para a segunda reação de amplificação (*nested PCR*) com os *primers* NS1 e NS4 (5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG-3') para a metade da região SSU, sendo o tamanho do fragmento esperado de 1000 pb. As reações foram feitas num volume de 50 µL, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde, e com 0,5 µL de formamida (1%) e poucas alterações às reações, conforme descrito anteriormente para a reação de amplificação da região SSU.

A concentração dos amplicons obtidos pelas todas as reações foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X.

Após, os amplicons foram purificados com isopropanol e etanol 70%, em seguida, ressuspensos em água Milli-Q® para o sequenciamento da região ITS1, com tamanhos esperados de 450 pb. Sendo que após a primeira coleta das amostras, não houve disponibilidade de kit de purificação. No entanto, após a segunda coleta os amplicons foram purificados utilizando o *ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em preparação por sequenciamento das regiões ITS (total), ITS2, 18S (total) e 18S (metade) com tamanhos esperados de 900, 450, 2000 e 1000 pb, respectivamente. Como anteriormente descrito, a concentração dos amplicons purificados obtidos foi determinada por eletroforese em

gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X. Estas amostras foram enviadas para o sequenciamento, serviço tercerizado realizado no Laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP em São Paulo, Brasil (<http://genoma.ib.usp.br>).

As sequências foram processadas (editadas e alinhadas) automaticamente usando o programa *Phred-Phrap* (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998). Usando o programa *Fungal ITS pipeline* (NILSSON et al., 2009), com o seu banco de dados atualizado compilado sequências de região ITS de fungos do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e incorporando os algoritmos BLAST NCBI, HMMER (EDDY, 1998) e alinhamento MAFFT (KATO et al., 2009), as sequências de região ITS (total e ITS2) dos corpos de frutificação de fungos isolados foram comparadas. Quinze das melhores sequências conhecidas deste banco de dados de sequências de ITS foram encontradas por amostra, gerando uma lista resultante com duas colunas mostrando *matches* de busca BLAST das regiões ITS total e ITS2, respectivamente. No entanto, foram realizadas buscas BLAST no site de NCBI para as sequências de 18S DNAr. As taxons de referência para todas as sequências das regiões de ITS e 18S foram atribuídos de acordo com os melhores *matches* de sequências conhecidas do BLAST (ver tabelas 1 e 2).

Baseado nos resultados gerados pelo *Fungal ITS pipeline*, as 3.365 sequências mais similares da região ITS foram utilizadas para construção de uma árvore filogenética. Primeiro, estas sequências foram alinhadas pelo MAFFT (função *FFT-NS-i*) e a partir deste alinhamento robusto foi construída uma árvore filogenética utilizando a função *ARB Neighbour Joining* (matriz de distância) no programa *ARB* (LUDWIG et al., 2004). Após, as famílias de interesse (figura 5) foram agrupadas, e utilizando a função *Filter by base frequency* no *ARB* foram filtradas e removidas as sequências sem afiliação filogenética. Estas 1.202 sequências resultantes estabeleceram a árvore filogenética da região ITS utilizada para visualizar a alocação das sequências de ITS (total, ITS1 e/ou ITS2) das amostras de cogumelos, utilizando as funções *ARB Aligner* e *ARB Parsimony*. Após, cada família foi analisada separadamente, mantendo-se apenas os ramos associados com cada amostra de cogumelo e um representante do *outgroup* (ver figuras 6-9).

De forma semelhante, no programa *ARB*, as sequências de 18S DNAr (total e/ou parcial) das amostras de cogumelos foram comparadas com um banco de

dados de sequências de SSU (*SILVA Release 108*) (PRUESSE et al., 2007). Este banco de dados de referência é composto apenas sequências alinhadas de RNA ribossomal do 16S DNAr e 18S DNAr de alta qualidade com um comprimento mínimo de 1200 bases, que dão origem a uma árvore filogenética guia, totalmente classificada, que permite uma navegação rápida (www.arb-silva.de). Primeiro, desta árvore filogenética foram removidas as sequências de *Bacteria* e *Archaea* (16S) e outras de *Eukarya*, deixando apenas as 2.755 sequências alinhadas de *Basidiomycota*. Neste caso, como cada sequência de 18S DNAr das amostras de cogumelos apresentou grande variação em tamanho e localização na região SSU, foi necessário utilizar a função *Filter by base frequency*, para isolar apenas os pares de base representativos para cada amostra. Esta árvore filogenética foi utilizada para visualizar a colocação das sequências de 18S DNAr das amostras de cogumelos, utilizando as funções *ARB Aligner* e *ARB Parsimony* (aplicando filtros próprios para cada amostra). Após, apenas os ramos imediatamente associados com cada amostra de cogumelo foram mantidos para construir uma árvore filogenética menor com valores *bootstrap*. Cada amostra foi removida e adicionada novamente nesta árvore menor aplicando o filtro próprio por amostra (ver figura 10).

Embora tenha sido possível identificar alguns corpos de frutificação de fungos em nível de gênero pelas buscas BLAST e/ou via visualização nas árvores filogenéticas, por razões de simplicidade, a afiliação dos cogumelos é apresentada neste documento em grupos ordenados ao nível de família.

2.2.4 Análise dos perfis das comunidades bacterianas nos solos micoféricos por meio da técnica de PCR-DGGE

As análises das estruturas das comunidades de bactérias nos solos micoféricos dos cogumelos nas áreas estudadas foram realizadas por PCR-DGGE (PCR - Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante). O DNA ambiental do solo micoférico e solo controle correspondente extraído foi utilizado para a amplificação da região V6 do gene 16S DNAr de *Bacteria* em reação de amplificação com os *primers* U968_LGC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TA-3') e 1378R (5'-CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG-3') (HEUER et al., 1997), sendo o tamanho do fragmento esperado de 410 pb. As reações foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 2,5 mM de

MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µL de formamida (1%), 0,4 mM de cada *primer*, em solução tampão para DNA polimerase *Taq* contendo 1 U DNA polimerase *Taq* (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 1 µL de DNA molde (5 a 10 ng), sendo completado o volume com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação da PCR foram de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C; seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minutos a 72°C; seguidos de uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Em seguida, as análises de DGGE foram realizadas no sistema Ingeny PhorU2 (Ingeny, Goes, Holanda) e tampão TAE 0,5X. Há dois meios disponíveis para utilização nos laboratórios da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba: o Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Solos na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) e o Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), fornecidos pelos pesquisadores responsáveis Professor Fernando Dini Andreote e Professora Marli de Fátima Fiori, respectivamente. Quantidades iguais de amplicons de *Bacteria* (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel com 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) contendo um gradiente de 30% a 55% de formamida e uréia, onde 100% de desnaturação apresentam 7M de uréia e 80% de formamida (HEUER et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 90V e 60°C constantes durante 15 horas. Após a eletroforese os géis foram corados com *Sybr Green* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) diluído em água deionizada esterilizada (1:10.000) e a aquisição das imagens foi feita por densitometria usando o densitômetro a laser *StormTM 845* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Para a análise dos grupos de α-proteobactérias (Alfa) e β-proteobactérias (Beta) presentes dentro do filo *Proteobacteria*, primeiramente uma PCR táxon específica foi realizada contendo 1 µL da amostra de DNA extraído (5 a 10 ng) em 25 ciclos de amplificação com os *primers* seletivos para os grupos α-proteobactérias e β-proteobactérias. As reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o *primer* 1492R (5'-CCG CAT ACG CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT-3'). Para tais reações, os *primers* AlphaU (5'-CGC ACA AGC CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT-3') e Beta-2 (5'-CGC ACA AGC GGT GGA TGA-3') foram utilizados, respectivamente (GOMES et al., 2001). As reações grupo específicas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente para os *primers* utilizados.

O produto de amplificação grupo específico foi utilizado como DNA molde para a segunda reação de amplificação (*nested* PCR) com os *primers* para DGGE. As reações foram feitas num volume de 50 μ L, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 200 nM de cada *primer* universal U968 $\perp$ GC e 1378R, conforme descrito anteriormente para a PCR-DGGE de *Bacteria* e a concentração dos amplicons obtidos foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. A análise de DGGE foi realizado de maneira similar com gradiente igual de desnaturação. Estes géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90V e 60°C constantes por 15 horas.

Cada análise de DGGE foi composta de um gel representante para cada parcela (Restinga, Santa Virgínia e Picinguaba) e cada gene amplificado (16S DNAr, α -*proteobacteria* e β -*proteobacteria*). Todas as amostras coletadas (indicando as comunidades das bactérias) a partir de cada parcela foram usadas em cada gel para minimizar o erro possível entre as áreas.

2.2.5 Análises estatísticas

Os perfis de amplicons gerados por análises de DGGE foram analisados pelo *software* Image Quant TL. Para avaliar as comunidades bacterianas de cada amostra, as posições relativas de cada banda detectada foram selecionadas para a construção de matrizes binárias. A partir dessas matrizes convertidas para presença e ausência das bandas individuais (CLEGG et al., 2003; FU et al., 2010) representantes de comunidades bacterianas geradas pelo programa, a análise *nMDS* (*non-Metric Multidimensional Scaling*) foi efetuada pelo programa *PAST* (HAMMER et al., 2001; LIMA, 2011) com base no método de similaridade *Jaccard* para os grupos *Bacteria*, α -*proteobactéria* e β -*proteobactéria* (figura 14). Esta metodologia é considerada um método de ordenação robusto a situações não lineares, frequentemente resumindo a variância dos dados em menos eixos do que outras técnicas indiretas de ordenação. O agrupamento (*clustering*) foi realizado utilizando o método do grupo de par não pesado com média matemática (UPGMA). Para as análises de DGGE, a intensidade das bandas não foi incluída nos cálculos como um fator devido a inconsistências em quantidades de DNA entre as amostras das três parcelas diferentes estudadas e entre os dois períodos de coleta para as amostras usadas, além das inconsistências em coloração com SYBR.

Também utilizando as matrizes de similaridade *Jaccard* das faixas de cada gel, foi possível comparar as amostras segundo cada amostra composta (solo micosférico e solo controle correspondente). Isto foi realizado de acordo Kropf (2004), tratando cada amostra composta como uma repetição de tratamento e comparando as coeficientes de similaridade médias dentro e entre as outras amostras compostas. Apesar de mostrar correlações interessantes (tabela 6), este método não gera valores significativos porque apenas duas amostras compõem cada repetição, faltando o número mínimo de amostras para resultar em significância. Também quando definindo essas repetições como grupos maiores (ou seja, micosfera contra controle), os valores médias não são significativos (dados não mostrados).

2.2.6 Sequenciamento de regiões variáveis do gene 16S DNAr por pirosequenciamento

Esta técnica se baseia na identificação dos grupos bacterianos presentes em solos micosféricos em interação com estruturas fúngicas por meio do sequenciamento de regiões específicas do gene codificador para o RNA funcional da sub-unidade 16S do ribossomo. Nesta análise foram avaliados apenas oito pares de amostras (oito amostras de solo micosférico e oito de solo controle correspondente), sendo estes representantes das famílias de fungos mais abundantes, e obtidas das três parcelas de Mata atlântica estudadas. A escolha destas dezesseis amostras (total) foi baseada nos resultados da análise de PCR-DGGE, e consequentemente nas análises de *nMDS*.

Para tanto, o DNA extraído das amostras foi amplificado com *primers* flanqueadores da região V4 do gene de 16S DNAr, usando os *primers* 520F (5'-AYT GGG YDT AAA GNG-3') e uma mistura de *primers* reversos 802R (5'-TAC CRG GGT HTC TAA TCC-3', 5'-TAC CAG AGT ATC TAA TTC-3', 5'-CTA CDS RGG TMT CTA ATC-3', 5'-TAC NVG GGT ATC TAA TCC-3'), visando amostrar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro da amostra a ser analisada, como descrito no *Ribosomal Data Project (RDP)*. Em tais *primers* foram adicionados adaptadores A e B, conforme o manual do fabricante do equipamento (Roche, EUA). Adicionalmente, o *primer forward* usado para cada amostra recebeu uma *tag* de identificação composta de 8 bases, que serviu para identificar a origem de cada uma

das sequências obtidas. As *tags* e os *primers* usados em cada amostra são apresentados no Anexo B. O sequenciamento das amostras por pirosequenciamento foi feito através de terceirização do serviço com utilização de recursos já previstos no orçamento do presente projeto (Macrogen Inc., Seoul, Coréia do Sul).

O processo de pirosequenciamento produziu um total de sequências de 216.269. A análise inicial destes dados de sequências foi realizado utilizando o pacote *QIIME* (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO et al., 2010), onde foi feita uma triagem inicial que as separou, através de suas *tags* de identificação, em grupos de sequências oriundas de cada amostra. Com *QIIME*, os argumentos padrão foram utilizados na função *split_libraries.py* com a exceção de um tamanho mínimo de sequência de 150 pb (usamos 200 pb), e depois foi realizado a remoção dos *primers forward* e *reverse* usando o argumento "*truncate only*". Neste processo as sequências de baixa qualidade foram removidas. Assim, as sequências resultantes foram alinhadas e separadas em *datasets* para cada uma das dezesseis amostras compostas: 64.470 de todos os solos micosféricos e 65.521 de todos os solos controles correspondentes. Logo, estes foram submetidos ao seleção das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) determinadas num valor de 97% similaridade, pelo método "*uclust*" na função *pick_otus.py* e a afiliação taxonômica das UTOs pelo método "*rdp*" (COLE et al., 2009) na função *assign_taxonomy.py*. Esses valores de *cutoff* (identidade para as mesmas espécies de >97% e identidade para os mesmos gêneros de >95%) são também um melhor ajuste da taxonomia com base no sequenciamento da região 16S DNAr (SCHLOSS et al., 2009). Com estes dados foram construídos gráficos de abundância relativa dos grupos de bactérias presentes em cada solo micosférico em relação do solo controle correspondente das diferentes áreas estudadas.

Essas UTOs foram utilizadas para obter informações da diversidade alfa pelos índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon). O índice de Chao1 usa o número de UTOs com uma ou duas sequências para estimar o número de espécies faltantes, pois de acordo com o autor esta informação está presente nestas UTOs (CHAO, 1984). O índice de diversidade de Shannon, H' (MÖHLENHOFF et al., 2001). é útil como um método eficaz para estimar a diversidade de comunidades microbianas, ou seja, quanto maior o índice de Shannon, quanto maior a diversidades da comunidade microbiana (JUN e WENFENG, 2009; FU et al., 2010). Neste sentido, é interessante comparar a alfa diversidade de cada amostra e

também comparar a presença de filos específicos dentro de cada amostra composta (ver tabela 7 e figuras 16 e 17). Além disso, utilizando a função *beta_significance.py* no programa *QIIME*, comparamos a significância da diversidade beta dentro cada amostra composta.

Além disso, para avaliar melhor a riqueza e similaridade da comunidade bacteriana entre as amostras (diversidade beta), foi primeiro necessário gerar matrizes de distância (*Phylyp Distance Matrix*) para usar como arquivo de entrada para as análises subsequentes. Utilizando a função *beta_diversity.py*, foi possível gerar gráficos de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Para estimar o valor máximo verdadeiro em qualquer nível filogenético é necessário modelar e extrapolar a curva de rarefação, ou a utilização de métodos não paramétricos para estimar a riqueza verdadeira das UTOs, considerando a estrutura da população (ROESCH et al., 2007). Assim, usando a função *make_rarefaction_plots.py*, foram obtidas as curvas de rarefação para descrever o efeito de percentagem de similaridade no número de UTOs identificadas. Essas informações também são utilizadas para comparar a diversidade alfa entre todas as amostras ou pelo tratamento (ver figuras 15a e b, respectivamente).

Usando a função *otu_category_significance.py* foi possível também isolar as UTOs significativas entre todos os pares de amostras compostas com o teste *paired T* ($p < 0,05$) (ver figura 21). Semelhantemente, utilizando a mesma função, isolamos as UTOs significativamente induzidas/inibidas com o teste ANOVA ($p < 0,05$), dependendo do substrato e do tratamento (ver figuras 22 e 23, respectivamente). Baseado nos dados das mesmas UTOs e utilizando as funções *make_otu_heatmap.py* e *make_phylogeny.py*, foi gerado um mapa de intensidade (heatmap) da distribuição, e uma árvore filogenética (ver figura 24).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Identificação dos corpos de frutificação dos fungos (cogumelos)

Os cogumelos encontrados na Mata Atlântica foram identificados de acordo com as técnicas baseadas em sequenciamento de DNA (ver Seção 2.2.3 nos mét-

Figura 4 - Todos os cogumelos amostrados das três parcelas de estudo: cogumelos 28 (a); 4 (b); 1 (c); 29 (d); 31 e 32 (e); 3 (f); 2 (g); 13 (h); 26 e 27 (i); 30 (j); 33 (k); 15 e 16 (l); 9 (m); 11 (n); 8 e 10 (o); 5, 6 e 7 (p); 12 (q); 17 (r); 23 (s); 20, 21 e 22 (t); 14 (u); 17 e 18 (v); 24 (x) e 25 (y)

odos). O DNA foi extraído com sucesso a partir de todas as amostras de corpos de frutificação fúngicos. Em seguida, todas as amostras de DNA foram submetidos a análises das sequências das regiões SSU (18S) e ITS. Entre os 33 cogumelos encontrados nas duas coletas (13 da primeira e 20 da segunda), 30 eram do domínio *Basidiomycota* e dois do domínio *Ascomycota* (figura 4). Como visto na figura 4, as seguintes famílias do domínio *Basidiomycota* foram determinadas baseado na incorporação das sequências nas árvores filogenéticas: *Marasmiaceae*, *Lepiotaceae*, *Inocybaceae*, *Lachnocladiaceae*, *Bolbitiaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Hymenogastraceae*, *Mycenaceae* e *Strophariaceae*. Nota-se que a família *Hymenogastraceae* é ligeiramente controversa na literatura, onde o gênero *Naucoria* também é conhecido pelo nome de *Alnicola*, que se afilia a família *Cortinariaceae* (ROCHET et al., 2011). Em relação aos cogumelos afiliados a *Ascomycota*, as famílias encontradas não foram corroboradas baseadas nas buscas BLAST, onde os cogumelos 18 e 19 (morfologicamente iguais) geraram resultados como uncultured *Malassezia* e uncultured *Ascomycota*. Como o gênero *Malassezia* não representa um tipo de fungo capaz em criar um corpo de frutificação, não somos capazes em confiar nestes resultados.

Considerando as três parcelas de estudo (Restinga, Santa Virgínia e Picinguaba), Santa Virgínia exibiu a população de espécies de cogumelos mais diversificada, com 12 cogumelos associados a sete famílias. A parcela Restinga também proporcionou um ambiente para uma diversidade de cogumelos relativamente alta, com 12 cogumelos distribuídos em cinco famílias. É interessante notar que a parcela Picinguaba teve a maioria dos representantes da família *Marasmiaceae*, e todas as amostras foram encontradas entre a serrapilheira. Nesta parcela, os espécimes desta família foram agrupados por semelhança morfológica, ou seja, todos os cogumelos 5-7 e 20-22 são inferidos a ser a mesma espécie baseado na sua morfologia particular e homogênea.

2.3.1.1 A influência de fatores ambientais na qualidade das amostras de cogumelos

Infelizmente, um total de cinco cogumelos não puderam ser identificados devido à baixa qualidade baixo do DNA, o que resultou na ausência de amplificação das regiões alvo. Isto pode ser devido ao fato de que as amostras particulares (por

Figura 5 - Árvore filogenética indicando as famílias identificadas a ser relacionadas entre os cogumelos amostrados. Agrupamento foi realizado no programa *ARB* (LUDWIG et al., 2004) usando *ARB Neighbour Joining* com base em sequências de ITS (total, ITS1 e/ou ITS2). As sequências de referência foram extraídas a partir do banco de dados de NCBI. Note que os números por baixo de cada nome indica a quantidade de representantes achados neste estudo

exemplo, cogumelos 24, 25 e 33) foram infestadas com larvas de insetos durante a coleta. De acordo com Stamets (2005), os insetos são atraídos pelo cheiro dos cogumelos e usam os mesmos como um lar para suas larvas, que depois crescem e levam os esporos embora quando saem do ninho. Portanto, talvez certas enzimas utilizadas pelos insetos para degradar os cogumelos pode ter também interferido no processo de extração de DNA, ou mesmo nas reações de PCR. No entanto, a idade das amostras de cogumelos podem variar bastante, o que pode gerar um processo natural de degradação do DNA devido a um processo de senescência.

Todos estes fatores podem ter influenciado a qualidade global durante o processo de sequenciamento. Mesmo entre as sequências com maior qualidade, houve algumas sequências de ITS e/ou 18S que eram curtas de comprimento e, portanto, levaram menor cobertura em buscas BLAST. A apresentação geral de cada amostra de cogumelo, a sua localização, seu substrato e sua orientação familiar fúngica inferida estão em figura 4. Além disso, as melhores sequências de cada amostra de cogumelo são apresentadas com os resultados das sequências de referência (ver tabelas 1 e 2). No entanto, essas sequências com a cobertura melhor permitirão as análises de árvores filogenéticas mais aprofundadas que são apresentadas na seção seguinte.

2.3.1.2 As análises de árvores filogenéticas de cogumelos da Mata Atlântica

2.3.1.3 Família *Marasmiaceae*

A família *Marasmiaceae* teve o maior número de representantes total (13 cogumelos) e estava presente entre todas as três parcelas de estudo. Do mesmo modo, a família *Marasmiaceae* foi a mais abundante (44,7% do número total) entre corpos de frutificação em um estudo de uma floresta do Mediterrâneo (RICHARD et al., 2004), o que indica a adaptação de fungos deste grupo ao ambiente florestal. Como pode ser visto na figura 5, cada amostra de cogumelo agrupou com gêneros diferentes dentro da família *Marasmiaceae*. Os cogumelos 1, 5-7 e 20-22 se mostraram mais próximos ao gênero *Marasmius*, enquanto que os cogumelos 2, 13 e 16 ficaram alocados no gênero *Gymnopus*. As *Marasmius* spp. estão entre o grupo de decompositor mais poderoso da serrapilheira, participando do metabolismo de lig-

Figura 6 - Árvore filogenética da relação entre os cogumelos identificados a ser relacionados da família *Marasmiaceae*, incluindo os gêneros *Marasmius* e *Gymnopus*. Agrupamento foi realizado no programa ARB (LUDWIG et al., 2004) usando ARB Neighbour Joining com base em sequências de ITS (total, ITS1 e/ou ITS2). *Bootstrapping* teve 1000 repetições. As sequências de referência foram extraídas a partir do banco de dados de NCBI

nina (OSONO e TAKEDA, 2002; STEFFEN et al., 2007). O cogumelo 25 foi alocado fora do agrupamento dos demais, porém ainda relacionado com a família *Marasmiaceae* quando comparado com o *outgroup* (*Ascomycota*), podendo se tratar de um grupo ainda não descrito, ou de algum problema relacionado ao menor tamanho de sequência desta amostra..

Em geral, é interessante notar que embora esta família seja conhecida por ser saprófita, nem todos os cogumelos encontrados estavam entre a serrapilheira. Isto pode indicar que algumas espécies saprófitas são capazes de degradar outros tipos de compostos derivados de lignina que estão em maior concentração em alguns solos. Por exemplo, os cogumelos 13 e 16 foram encontrados ocupando o solo na parcela Restinga e nas árvores filogenéticas agruparam com *Gymnopus collybioides*, que é uma espécie encontrada em floresta de montana neotropical na Costa Rica (MATA et al., 2004). Considerando que, no mesmo gênero, o cogumelo 2 encontrado na serrapilheira apresentou uma maior similaridade com *Gymnopus omphalodes*, descrito na floresta amazônica do Brasil (MATA et al., 2007), podemos sugerir esta ocupação dos dois nichos por membros componentes de tal gênero.

Alternativamente, as sequências com qualidade inferior e com comprimento curto para as amostras de cogumelos 1 e 20-22 levaram resultados mistos que não seguem o padrão principal observado para o cogumelo 1, encontrado no solo, e os cogumelos 20-22, que apresentaram a morfologia semelhante e foram todos encontrados na serrapilheira. É interessante notar que as sequências de usadas como referência nesta parte da árvore filogenética foram encontradas em florestas tropicais do Japão, Tailândia e Coreia, o que estabelece o gênero *Marasmius* como um dos principais componentes da micota tropical, sendo encontrados em abundância em florestas de clima úmida como a Mata Atlântica (PUCCINELLI e CAPELARI, 2006, 2007, 2009).

2.3.1.4 Família *Lepiotaceae*

A família *Lepiotaceae* foi a segunda mais abundante entre os cogumelos identificados (5) e também esteve presente nas três parcelas de estudo. De acordo com a árvore filogenética da figura 7a, os cogumelos 8, 10, 23 e 33 foram bem agrupados nesta família, sendo mais semelhante entre si do que em comparação

Figura 7 - Árvores filogenéticas da relação entre os cogumelos identificados a ser relacionados das famílias *Leptotaceae* (a) e *Entolomataceae* (b). Agrupamento foi realizado no programa ARB (LUDWIG et al., 2004) usando ARB *Neighbour Joining* com base em sequências de ITS (total, ITS1 e/ou ITS2). *Bootstrapping* teve 1000 repetições. As sequências de referência foram extraídas a partir do banco de dados de NCBI

com as sequências de referência. O cogumelo 24, embora tenha apresentando evidência inicial de fazer parte da família *Lepiotaceae*, mostrou uma alta distância na similaridade. Isto pode indicar que este organismos seja relacionado a família, mas não necessariamente no interior da mesma. As sequências de referência neste árvore filogenética são membros do tribo *Leucocoprini* (*Basidiomycotina: Agaricales: Lepiotaceae*) (HERVEY et al., 1997; CHAPELA et al., 1994), um grupo grande ainda pouco conhecido de cogumelos tropicais, predominantemente saprófitos.

Além disso, como já foi mencionado anteriormente sobre insetos usando cogumelos como plataformas para incubar e alimentar suas larvas, parece que os cogumelos desta família estão relacionadas com simbioses de formigas *Cyphomyrmex minutus*. As formigas e cupins têm relações particulares com espécies de cogumelos. Por exemplo, o gênero de cogumelo *Termitomyces* inclui diversas espécies de cogumelos associados com colônias de cupins terrestres, especialmente nos trópicos (STAMETS, 2005). As formigas e cupins constroem os seus ninhos com matéria orgânica e cultivam os micélios fúngicos. Quando abandonados, a partir destes ninhos ricos em micélios brotam cogumelos. Talvez este seja um caso semelhante, onde tais cogumelos da família *Lepiotaceae* são remanescentes de mutualismos semelhantes com determinadas espécies de formigas que ocorrem nas áreas de estudo. É interessante notar que, em geral, a proporção relativa de indivíduos dentro e fora da simbiose pode ser o fermento de fungos cultivados por espécies no grupo *Cyphomyrmex rimosus* (VO et al., 2009). Talvez isso indique que estes tipos de fungo podem crescer em forma de levedura (sob condições controladas pelas espécies de insetos), mas, em seguida, estes podem também ser de vida livre sob as condições ideais, eventualmente formando os corpos de frutificação.

2.3.1.5 Outras famílias fúngicas

Com base nas análises filogenéticas, algumas outras famílias foram identificadas porém em menor número, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Hymenogastraceae*, *Mycenaceae* e *Strophariaceae*. As filogenias do indivíduos alocados em tais famílias são apresentadas nas figuras 7b, 8a, 8b, 9a e 9b. É interessante notar que todas as amostras destes grupos apresentam elevadas com as sequências mais similares presentes nos bancos de dados usados neste estudo.

Figura 8 - Árvore filogenéticas da relação entre os cogumelos identificados a ser relacionados das famílias *Hygrophoraceae* (a) e *Hymenogastraceae* (b). Agrupamento foi realizado no programa *ARB* (LUDWIG et al., 2004) usando *ARB Neighbour Joining* com base em sequências de ITS (total, ITS1 e/ou ITS2). *Bootstrapping* teve 1000 repetições. As sequências de referência foram extraídas a partir do banco de dados de NCBI

Figura 9 - Árvore filogenéticas da relação entre os cogumelos identificados a ser relacionados das famílias *Mycenaceae* (a) e *Strophariaceae* (b). Agrupamento foi realizado no programa ARB (LUDWIG et al., 2004) usando ARB *Neighbour Joining* com base em sequências de ITS (total, ITS1 e/ou ITS2). *Bootstrapping* teve 1000 repetições. As sequências de referência foram extraídas a partir do banco de dados de NCBI

Talvez isto seja devido ao fato de que as amostras deste estudo tenha sido obtidas de uma área ainda pouco explorada neste contexto, o que pode ter levado ao acesso de grupos ainda não conhecidos, ou os quais não tenham ainda disponibilizadas suas sequências das regiões utilizadas. Com base nisso, pode-se sugerir uma maior similaridade das sequências obtidas com aquelas oriundas de ambientes similares. Dentro desta proposta, temos que de todas as árvores filogenéticas, apenas a referente ao cogumelo 4 (família *Hymenogastraceae*) incluiu sequências de referência obtidas em clima tropical, oriunda de florestas do México (AY280979-AY280997), mas mesmo assim parece que houve maior similaridade da sequência obtida no presente estudo com as sequências oriundas de zonas temperadas, como Alemanha e França.

É interessante notar que o cogumelo 9 foi alocado dentro da família *Hygrophoraceae*, que contém os gêneros *Hygrophorous* e *Hygrocybe*, que nas florestas temperadas são conhecidos como fungos ectomicorrízicos ou saprófitos, respectivamente (MOLINA et al., 2001). Assim sendo, observando a filogenia do cogumelo encontrado neste estudo, torna-se difícil atribuir uma função ao mesmo. Por conseguinte, devido à distância elevada na similaridade, é difícil categorizar este cogumelo em qualquer um dos dois gêneros. No entanto, a aparência cerosa deste cogumelo corrobora com as observações anteriores que seguem os padrões de representantes dessa família fúngica na ilha caribenha de Dominica (TOOMEY, 2009).

2.3.1.6 A região 18S DNAr como complemento na filogenia de cogumelos

Este tipo de análise foi feita para apenas nove amostras, com o intuito de confirmar as observações feitas com base nos resultados de sequenciamento da região ITS. Dessa forma, cada cogumelo foi agrupado com as sequências disponíveis em sua família (figura 10), dando maior suporte a nossa inferência filogenética de tais organismos.

É interessante notar que a diferença na qualidade das sequências pode ser observado entre os cogumelos 8 e 10, onde eles são exatamente os mesmos morfologicamente, mas a sequência de cogumelo 8 teve muito melhor qualidade e por esta razão ficou mais perto em distância para as amostras de referência. Os cogumelos 5 e 7 foram também igual morfologicamente e, assim, apresentou um

Figura 10 - Árvore filogenética da relação entre os cogumelos identificados a ser relacionados das famílias *Lepiotaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Bolbitiaceae* e *Marasmiaceae*. Agrupamento foi realizado no programa *ARB* (LUDWIG et al., 2004) usando *ARB Neighbour Joining* com base em sequências de 18S. *Bootstrapping* teve 1000 repetições. As sequências de referência foram incluídas em uma árvore filogenética de sequências de SSU (*SILVA Release 108*) (PRUESSE et al., 2007)

cluster mais conciso, ainda próximo ao cogumelo 13. Isso pode indicar também que a natureza tropical das amostras ainda torna as mesmas diferentes das amostras de referência que são de outras regiões do mundo que são mais temperado na natureza, como observado para a análise baseada na região ITS.

2.3.1.7 Dados baseados na buscas BLAST

Tabela 1. Identificação dos corpos de frutificação (cogumelos) amostrados pelo sequenciamento das regiões ITS total, ITS1 e ITS2 baseado nas buscas BLAST melhores.

Cogumelo	Fragmento	Tamanho (pb)	Número de acesso	Nome da sequência de referência	Família	Cobertura	Identidade	Nível trófico**
1	ITS	468	DQ449973	<i>Gymnopus exulptus</i>	Marasmiaceae	320/371	86%	S
2	ITS	800	DQ450010	<i>Gymnopus omphalodes</i>	Marasmiaceae	560/604	92%	S
3	ITS	745	JF907824	<i>Conocybe bulbifera</i>	Bolbitiaceae	311/351	88%	S
4	ITS2	356	HQ714774	<i>Alnicola geraniolens</i>	Hymenogastraceae	143/143	100%	M
5	ITS	908	AY916733	<i>Marasmius</i> sp MCA1506	Marasmiaceae	536/605	88%	S
6	ITS	893	AY916733	<i>Marasmius</i> sp MCA1506	Marasmiaceae	706/823	85%	S
7	ITS	900	AY916725	<i>Marasmius</i> sp MCA1511	Marasmiaceae	305/340	89%	S
8	ITS	916	AF079745	<i>Leptotaceae</i> sp PA302	Leptotaceae	665/717	92%	S
9	ITS	697	EU784320	<i>Hygrocybe insipida</i>	Hygrocybaceae	171/177	96%	S/M
10	ITS	775	AF079745	<i>Leptotaceae</i> sp PA302	Leptotaceae	554/586	94%	S
11	ITS	670	EU523574	<i>Nolanea</i> sp PBM 2635	Entolomataceae	556/607	91%	M
12	ITS	775	GQ892999	<i>Inocybe</i> sp DED8021	Inocybaceae	172/181	95%	M
13	ITS	937	AF505772	<i>Gymnopus collybioides</i>	Marasmiaceae	745/771	96%	S
14	ITS	772	GQ892999	<i>Inocybe</i> sp DED8021	Inocybaceae	172/181	95%	M
15*	-	-	-	-	-	-	-	-
16	ITS	842	AF505772	<i>Gymnopus collybioides</i>	Marasmiaceae	527/557	94%	S
17*	-	-	-	-	-	-	-	-
18	ITS2	485	EU915339	uncultured <i>Malassezia</i>	-	197/230	85%	-
19	ITS2	434	AY969659	uncultured <i>Ascomycota</i>	-	229/268	85%	-
20	ITS2	451	JN580838	<i>Inocybe lapponica</i>	Inocybaceae	63/66	95%	S
21	ITS2	405	JN580838	<i>Inocybe cicatricata</i>	Inocybaceae	110/112	98%	S
22	ITS2	965	JF419494	uncultured <i>Tuber</i>	-	133/136	97%	S
23	ITS2	364	EF527344	<i>Leptotaceae</i> sp PA607	Leptotaceae	346/359	96%	S
24	ITS1	332	EF527344	<i>Leptotaceae</i> sp PA607	Leptotaceae	318/330	96%	S
25	ITS1	403	EU935520	<i>Marasmius</i> sp NW2008t	Marasmiaceae	136/149	91%	S
26	ITS2	359	AF506391	<i>Dichostereum granulosum</i>	Lachnocladiaceae	239/269	88%	S
27*	-	-	-	-	-	-	-	-
28	ITS1	331	AY818350	<i>Stropharia ambigua</i>	Strophariaceae	288/313	92%	S
29	ITS2	501	HQ533009	<i>Rhodocollybia</i> sp PDD 95837	Marasmiaceae	141/149	94%	S
30	ITS	701	HQ533024	<i>Mycena</i> sp PDD 95743	Mycenaceae	276/303	91%	S
31*	-	-	-	-	-	-	-	-
32*	-	-	-	-	-	-	-	-
33	ITS2	366	EF527344	<i>Leptotaceae</i> sp PA607	Leptotaceae	332/344	96%	S

*Estas amostras foram incapazes a ser identificadas devido à qualidade baixa de DNA elou comprimento de sequência insuficiente. Note também que há controvérsias desenvolvidas com *Alnicola geraniolens* (gênero *Alnicola*) entre a ser considerada parte das famílias Cortinariaceae e Hymenogastraceae.

**Nível trófico inferido baseado no substrato e história das determinadas famílias fúngicas na literature. S = saprofítica e M = micorrizica.

Como visto na tabela 1, existe uma ampla faixa de valores de cobertura e identidade para as sequências de ITS por amostra. Isto é devido à variação na qualidade e comprimento das sequências. Mas ao mesmo tempo, o algoritmo utilizado no *Fungal ITS Pipeline* permitiu buscas BLAST mais focadas, baseadas na região específica de ITS. Por isso, esta tabela serve como uma ferramenta importante para ter uma ideia geral de quais famílias fúngicas estão representadas nas amostras analisadas. O nível trófico é inferido a partir da colocação das amostras em solo ou na serrapilheira, e com base no suporte de tal inferência pela literatura. Assim, no caso da família *Inocybaceae*, quando um cogumelo foi encontrado entre a serrapilheira, foi inferido que este tem característica saprófita (cogumelos 20, 21 e 22). No entanto, como pode ser visto na figura 6, estas sequências se mantêm dentro da família *Marasmiaceae*, de modo torna-se mais de uma questão de melhor colocação entre as sequências de referência. No caso para a família *Hygrophoraceae*, dois gêneros (*Hygrophorous* e *Hygrocybe*) representam ambos os níveis tróficos e, portanto, não foi possível determinar qual é a característica predominante para cogumelo 9.

Tabela 2 - Identificação dos corpos de frutificação (cogumelos) amostrados por sequenciamento da região SSU (18S) baseado nas buscas BLAST melhores*

Cogumelo	Fragmento	Tamanho (pb)	Número de acesso	Nome da sequência de referência	Família	Cobertura	Identidade	Nível trófico**
3	18S (1/2)	1018	DQ437683.1	<i>Conocybe lactea</i> isolate	<i>Bolbitiaceae</i>	885/955	93%	S
5	18S (1/2)	1013	DQ457644.1	<i>Marasmius oreades</i> isolate	<i>Marasmiaceae</i>	906/947	96%	S
7	18S	1026	DQ457644.1	<i>Marasmius oreades</i> isolate	<i>Marasmiaceae</i>	864/918	94%	S
8	18S	1048	U09536.1	<i>Basidiomycete</i> symbiont of <i>Cyphomyrmex</i> <i>rimosa</i>	-	835/909	92%	S
9	18S (1/2)	1011	DQ444859.1	<i>Hygrocybe miniata</i> f. <i>longipes</i>	<i>Hygrophoraceae</i>	852/934	91%	S/M
10	18S (1/2)	941	U09536.1	<i>Basidiomycete</i> symbiont of <i>Cyphomyrmex</i> <i>rimosa</i>	-	689/829	83%	S
11	18S (1/2)	944	DQ457622.1	<i>Inocephalus</i> sp. GD-b	<i>Entolomataceae</i>	868/928	94%	M
12	18S	1026	AF287832.1	<i>Entoloma strictius</i>	<i>Entolomataceae</i>	681/821	83%	M
13	18S	995	NG013179.1	<i>Marasmius alliaceus</i> voucher TENN:55620	<i>Marasmiaceae</i>	908/959	95%	S

*Indicado como (1/2) significa que a amplificação PCR utilizada foi *nested* e gerou a primeira metade da região SSU.

**Nível trófico inferido baseado no substrato e história das determinadas famílias fúngicas na literatura. S = saprofítica e M = micorrízica.

Por outro lado, a tabela 2 indica, em geral, os valores de cobertura muito mais elevados para as sequências de 18S. Como as sequências não redundantes encontradas no banco de dados de SILVA são filtradas por alta qualidade e sequências com comprimento mais longo. Esta informação leva os valores de identidade mais precisos e pode ser usada para corroborar com as buscas BLAST anteriores das sequências de ITS.

2.3.1.8 Nível trófico inferido

Como mencionado anteriormente, pode ser difícil definir o nível trófico fúngico e até a identidade específica do mesmo. No entanto, baseado no tipo de substrato (serrapilheira ou solo) e na evidência histórica das famílias fúngicas determinadas, o nível trófico para cada amostra pode ser inferido. Entre as 33 amostras de cogumelos, 13 estavam presentes na serrapilheira e 20 estavam presentes no solo. Também deve ser notado que nem todos os basidiomicetos colonizando a serrapilheira são saprófitos ou ligninolíticos, mas a diferença entre os tipos de serrapilheira sugere que a colonização de serrapilheira por basidiomicetos possivelmente está relacionada com os teores de lignina das mesmas (OSONO, 2007). A ocorrência de corpos de frutificação de alguns basidiomicetos ligninolíticos está relacionada com espécies de árvores e tipo de floresta. Apesar de muitos fungos ectomicorrízicos terem demonstrados alguma capacidade saprófita, esses simbiossiontes não seriam plenamente capazes de recolonizar o solo antes do restabelecimento de seus hospedeiros vegetais (BÁRCENAS-MORENO et al., 2011). Portanto, no nível da parcela dentro da mesma região pode haver uma grande diversidade de macro-fungos como cogumelos dependendo nos fatores ecológicos particulares.

Uma vez que o bioma Mata Atlântica, em geral, vem sofrendo uma redução em tal tamanho total desde o início da colonização europeia no Brasil, esse desmatamento também pode ter causado uma fragmentação da comunidade de cogumelos presentes neste bioma. De acordo com Stamets (2005), o equilíbrio das populações podem variar drasticamente com a mudança ambiental, onde o desmatamento provoca um aumento em saprófitas e um declínio em cogumelos micorrízicos. Isto corrobora os resultados deste estudo, onde a maioria dos exemplares coletados dos três locais diferentes foram inferidos a ser saprófitos. Foi observado que dos 33 cogumelos encontrados, 23 foram classificados como saprófitos, quatro micorrízicos, um saprófito ou micorrízico e cinco indeterminados. Assim, o nível trófico saprófito parece que merece mais atenção para entender melhor as dinâmicas desenvolvidas.

2.3.1.9 Saprofitia entre os cogumelos na Mata Atlântica

O estabelecimento de plantas hospedeiras parece a ser fundamental para o desenvolvimento dos fungos da comunidade saprófita nos estágios iniciais da sucessão primária. Por exemplo, em cronossequências promovidas pelo degelo glacial no Alasca, a ocorrência de corpos de frutificação de *Clitocybe*, *Collybia*, *Mycena* e *Marasmius* spp. foi associada com a presença de árvores hospedeiras que forneceram o substrato para a colonização (SPRAGUE e LAWRENCE 1858a, b, 1960; OSONO, 2007). Isso também pode ocorrer em regiões de Mata Atlântica, onde as parcelas determinadas dentro da mesma região podem ser compostas de diferentes espécies de plantas. Assim sendo, os cogumelos da família *Mycenaceae* podem ter sua ocorrência em áreas de maior degradação de matéria orgânica do solo, e maior disponibilidade de lignina sob a cama, mais do que a maioria dos outros basidiomicetos. Além disso, representantes desta família pode ser menos eficazes na perda global de massa ou em quebra de material recalcitrante do que os das família *Marasmiaceae* e *Clitocybe* spp., dependendo do substrato (OSONO e TAKEDA, 2002; OSONO et al., 2003; STEFFEN et al., 2007). Consequentemente, a presença de alguns fungos podem influenciar indiretamente a atividade de decomposição de outros fungos através da modificação da qualidade da serrapilheira.

No entanto, há evidências de uma análise de gradiente de corpos de frutificação na Dinamarca, onde se observa que a estrutura da comunidade de basidiomicetos torna-se cada vez mais diversificada nos estágios finais de deterioração, talvez refletindo a variedade de micro-habitats, gerando diferentes padrões de ocupação de espécies (BODDY, 2001). Assim, uma mudança de composição da floresta pode afetar como e onde determinados componentes bioquímicos são atacados durante o processo de decomposição, sugerindo a possibilidade de alterações, tanto na expressão dos genes quanto na atividade da enzima no solo da floresta. Uma vez que mesmo as espécies e gêneros dentro da mesma família de fungos pode variar durante diversos estágios de colonização em decomposição, a comunidade bacteriana associada a estes fungos pode ser responsiva a tais alterações, o que deve ser considerado quando deseja-se inferir sobre a funcionalidade de comunidades microbianas neste sistema.

2.3.2 Análise dos perfis das comunidades bacterianas nos solos micosféricos por meio da técnica de PCR-DGGE

Usando o *primer* universal de bactérias, foi possível visualizar os perfis das comunidades bacterianas em todas as 33 amostras compostas por meio da técnica de DGGE. Embora esta seja uma técnica de baixa resolução, é uma etapa importante para ter uma noção da diversidade alfa (diversidade presente dentro de uma amostra) e também diversidade beta (diversidade entre as amostras) que ocorrem em um conjunto de amostras.

O número total de bandas DGGE variou entre os três parcelas de estudo e também variou entre cada solo micosférico e solo de controle correspondente (figura 11a-c, tabela 3). De acordo com Assigbetse et al. (2005), que observaram um menor número de bandas no solo sob tratamento ectomicorrízico, os fungos significativamente influenciaram a estrutura da comunidade bacteriana no solo, reduzindo a sua diversidade. Um padrão semelhante foi observado aqui, onde em média, havia menos bandas no solo micosférico em comparação com os solos controles correspondentes em todas as parcelas. No entanto, quando se considera apenas a similaridade (baseado na posição relativa de cada banda) entre cada solo micosférico e controle correspondente, é bastante claro que existe uma grande diferença entre os solos associados ou não com os corpos de frutificação. Isto é corroborado pelo Warmink et al. (2009), que também utilizou as análises de PCR-DGGE e observou efeitos claros da micosfera de diversos fungos sobre as comunidade bacteriana e sobre a comunidade de *Pseudomonas* em solos.

Sigler e Turco (2002) encontraram muitas bandas de DGGE exclusivas para diferentes solos, sugerindo que os diversos tipos de solo abrigam diferentes comunidades bacterianas. Em contraste, as bandas únicas não foram comuns entre todas as amostras de solo micosférico e de controle neste estudo, indicando que a maioria estão presentes nos dois sistemas, mas em quantidades diferentes. Isto é porque a intensidade das bandas pode estar correlacionada com a abundância das populações de uma comunidade (RANJARD et al., 2001). No entanto, esse fator de intensidade das bandas não foi considerado nas análises seguintes devido ao possível viés da coloração pelo SYBR, ou da diferenciação na coloração e aquisição das imagens de géis distintos.

Figura 11 - Os géis das análises de PCR-DGGE com as perfis da toda a comunidade bacteriana nos solos micosféricos e nos solos controles correspondentes (cada amostra composta com o controle ao esquerdo e microsfera ao direito) das três parcelas de amostragem Restinga (a), Santa Virgínia (b) e Picinguaba (c)

Tabela 3 - O efeito da presença de fungos (micosfera) na toda comunidade bacteriana tal como ilustrado no número relativo total de bandas por amostra composta nos géis de DGGE na figura 11. Os valores de dissimilaridade baseados no índice de *Jaccard*

Amostra	Número total das bandas		Dissimilaridade
	Controle	Micosfera	
8	66	62	49%
9	64	54	38%
10	61	65	57%
11	61	58	35%
12	62	55	54%
13	79	68	45%
14	61	66	47%
15	79	62	47%
16	72	75	40%
17	72	62	48%
18	76	64	53%
19	82	66	56%
Média	70	63	47%
Número total de posições de banda por gel:			130
1	92	84	43%
2	90	79	60%
3	71	82	58%
4	86	82	66%
26	95	87	67%
27	95	74	69%
28	71	70	68%
29	99	98	59%
30	104	91	50%
31	89	114	49%
32	98	85	52%
33	104	88	46%
Média	91	86	57%
Número total de posições de banda por gel:			187
5	42	35	36%
6	33	47	43%
7	36	59	64%
20	82	88	50%
21	76	84	62%
22	91	72	58%
23	85	91	51%
24	92	63	55%
25	99	94	38%
Média	71	70	53%
Número total de posições de banda por gel:			151

2.3.2.1 Comunidades de α -proteobacteria e β -proteobacteria presentes nas micosferas de três parcelas de estudo

Utilizando os *primers* específicos para α -proteobacteria e β -proteobacteria nas reações de PCR foi possível visualizar apenas as comunidades relativas a estas classes por meio da técnica de DGGE. Estes grupos foram escolhidos por serem grupos comumente estudados em relação a interação de comunidades bacterianas com hospedeiros fúngicos. Como um exemplo desta situação, Mogge et al. (2000) que detectaram diferenças significativas em comunidades de proteobactérias associadas com diferentes espécies de ECM utilizando sondas específicas em microscopia FISH.

Similar à investigação de toda a comunidade bacteriana, o número total de bandas DGGE relacionado a α -proteobacteria diferiu entre os três parcelas de estudo e também variou entre cada solo micosférico e solo controle correspondente (figura 12a-c, tabela 4). É interessante notar que em um estudo anterior, Boersma et al. (2009) observaram comunidades de *Sphingomonadaceae* (da classe α -proteobacteria) em micosferas de dois fungos ectomicorrízicos que foram mais estreitamente relacionadas entre si, do que as comunidades comparadas dos solos controles correspondentes.

Apesar desta análise apresentar em geral um maior número de bandas, estas foram menos abundantes na parcela Picinguaba, sugerindo que ocorre nesta área uma diversidade baixa de α -proteobacteria, contrariamente ao que ocorre nas outras parcelas, que apresentaram números totais semelhantes. Além disso, esse total mais baixo em Picinguaba pode indicar uma seleção forte apenas para alguns grupos específicos de α -proteobacteria que levariam a tal perfil da comunidade. No entanto, quando se considera apenas a similaridade entre cada micosfera e controle correspondente, parece que existe menos similaridade geral dentro de cada amostra composta em comparação com a análise anterior da comunidade bacteriana global. Este é um indicador de que a presença de fungos (ou seja, a criação do micro-ambiente micosfera) pode ter uma influência forte sobre a comunidade da classe α -proteobacteria, maior do que a observada para a comunidade total de bactérias.

Por outro lado, a análise da comunidade de β -proteobacteria presente nas amostras revelaram padrões que eram menos claramente distinguíveis em relação a comparação entre solos controle e micosférico (figura 13a-c, tabelas 5a-c). Apesar

Figura 12 - Os géis das análises de PCR-DGGE com as perfis da comunidade de α -proteobacteria nos solos micosféricos e nos solos controles correspondentes (cada amostra composta com o controle ao esquerdo e micosfera ao direito) das três parcelas de amostragem Restinga (a), Santa Virgínia (b) e Picinguaba (c)

Tabela 4 - O efeito da presença de fungos (micosfera) na comunidade de *α -proteobacteria* tal como ilustrado no número relativo total de bandas por amostra composta nos géis de DGGE na figura 12. Os valores de dissimilaridade baseados no índice de Jaccard

Amostra	Número total das bandas		Dissimilaridade
	Controle	Micosfera	
8	36	66	74%
9	42	38	67%
10	47	58	69%
11	42	37	52%
12	50	51	67%
13	48	65	69%
14	68	58	50%
15	62	47	57%
16	63	41	65%
17	56	45	67%
18	79	54	57%
19	73	69	52%
Média	56	52	62%
Número total de posições de banda por gel:			135
1	47	47	68%
2	57	55	62%
3	59	59	51%
4	57	58	60%
26	71	74	51%
27	71	59	57%
28	60	59	49%
29	46	48	62%
30	65	75	53%
31	50	64	70%
32	64	67	54%
33	59	59	54%
Média	59	60	58%
Número total de posições de banda por gel:			126
5	36	48	55%
6	38	42	52%
7	33	45	63%
20	37	37	70%
21	50	54	56%
22	40	59	52%
23	53	42	60%
24	39	42	55%
25	35	39	58%
Média	40	45	58%
Número total de posições de banda por gel:			96

Figura 13 - Os géis das análises de PCR-DGGE com as perfis da comunidade de β -*proteobacteria* nos solos micosféricos e nos solos controles correspondentes (cada amostra composta com o controle ao esquerdo e micosfera ao direito) das três parcelas de amostragem Restinga (a), Santa Virgínia (b) e Picinguaba (c)

Tabela 5 - O efeito da presença de fungos (micosfera) na comunidade de β -*proteobacteria* tal como ilustrado no número relativo total de bandas por amostra composta nos géis de DGGE na figura 13. Os valores de dissimilaridade baseados no índice de *Jaccard*

Amostra	Número total das bandas		Dissimilaridade
	Controle	Micosfera	
8	28	35	71%
9	36	36	62%
10	46	35	55%
11	44	43	51%
12	39	49	58%
13	36	39	71%
14	35	21	81%
15	37	24	73%
16	38	30	74%
17	40	28	81%
18	44	31	75%
19	41	29	65%
Média	39	33	68%
Número total de posições de banda por gel:			91
1	26	26	70%
2	30	33	76%
3	30	33	63%
4	18	18	62%
26	36	29	62%
27	36	39	68%
28	32	28	67%
29	37	30	63%
30	28	36	77%
31	32	26	59%
32	28	28	60%
33	25	27	56%
Média	30	29	65%
Número total de posições de banda por gel:			79
5	46	31	76%
6	38	40	70%
7	52	49	56%
20	41	43	60%
21	38	28	68%
22	38	39	60%
23	43	43	66%
24	38	30	69%
25	42	41	68%
Média	42	38	66%
Número total de posições de banda por gel:			91

de aparecer que, em média, houve um maior número total de bandas nas amostras controles, isso não foi constante em todas as amostras, apesar alguns valores de similaridade entre amostras compostas terem sido extremamente baixos.

2.3.3 Análises estatísticas

2.3.3.1 Comparando os valores de similaridade dentro e entre amostras compostas

Tabela 6 - Os resultados do teste estatístico comparando dentro e entre grupos de amostras compostas (solos micosféricos e nos solos controles correspondentes), baseado nas matrizes de similaridade (*Jaccard*) das faixas dos três géis mostrando as perfis das comunidades bacterianas (a), de *α-proteobacteria* (b) e *β-proteobacteria* (c).*

	Gel	$\bar{r}_{dentro}$	$\bar{r}_{entre}$	valor <i>d</i>
(a)	Restinga	0,526	0,420	0,105
	Santa Virginia	0,477	0,374	0,103
	Picinguaba	0,492	0,333	0,159
	Global	0,499	0,384	0,115
(b)	Restinga	0,379	0,319	0,060
	Santa Virginia	0,482	0,355	0,127
	Picinguaba	0,421	0,340	0,080
	Global	0,427	0,337	0,090
(c)	Restinga	0,319	0,286	0,033
	Santa Virginia	0,392	0,282	0,111
	Picinguaba	0,342	0,328	0,014
	Global	0,351	0,294	0,058

*Não houve valores significativos. No entanto seria possível realizar este tipo de teste com repetições adicionais. Note que global significa a comparação de similaridade entre os três géis próprios.

Após o cálculo da matriz de similaridade de cada gel de DGGE, foi feita a comparação dos valores de similaridade (coeficientes de correlação gerados a partir dos dados de ausência e presença) dentro de cada amostra composta ($\bar{r}_{dentro}$) e entre cada amostra composta ($\bar{r}_{entre}$) por gel (tabela 6a-c). Tal informação mostra que, em média, em todos os géis existe sempre uma maior similaridade dentro das

amostras compostas de cada solo micosférico e solo controle correspondente do que entre cada uma das amostras compostas. O menor o valor de similaridade entre é atribuível ao fato do que a maioria das amostras compostas foram coletadas a partir de seções isoladas de cada parcela. Isto pode indicar que há circunstâncias e condições muito particulares para cada micro-ambiente onde cada par de amostras está exposta a diversos fatores abióticos e bióticos.

Além disso, o valor d é uma estimativa da perda de similaridade quando as amostras compostas são comparadas com as outras amostras compostas em vez de meramente comparando cada amostra sozinha entre todas as outras amostras (KROPF et al., 2004). O valor d é geralmente superior na comparação compartilhada entre os resultados globais das comunidades de α -*proteobacteria* e β -*proteobacteria*, portanto, indica maiores alterações entre os solos micosféricos e controles para estes grupos. Isto corrobora os resultados por Kluber et al. (2011), onde α -*proteobacteria*, β -*proteobacteria* e *Actinobacteria* foram associados com fragmentos de densos conglomerados de fúngicos, mas outras bactérias destas classes foram associadas com estas estruturas, não respondendo assim a este tipo de alteração.

2.3.3.2 Diversidade beta de comunidades bacterianas, de α -*proteobacteria* e de β -*proteobacteria*

Usando os mesmos dados de ausência e presença na comparação dentro e entre as amostras compostas, as análises de *nMDS* foram realizadas a partir de matrizes de similaridade de *Jaccard* para cada comunidade (comunidade bacteriana total, α -*proteobacteria* e β -*proteobacteria*), sendo esta análise feita separadamente para amostras coletadas em cada parcela (figura 14a-i). Esta análise nos permitiu visualizar mais precisamente a diversidade beta de todas as amostras. Os dados anteriores sobre a identificação de cogumelos e informação sobre o substrato também foram usados como ferramentas valiosas para compor o conjunto apresentado nas análises de *nMDS*.

Na análise para as comunidades bacterianas totais (figura 14a-c) as parcelas Restinga e Picinguaba apresentaram agrupamentos mais definidos e constantes. É interessante notar que, no caso de Restinga, há uma tendência para as amostras de solo controle ficarem concentradas no centro do gráfico, indicando uma similaridade entres tais amostras. Além disso, cada solo micosférico apresentou distância variáv-

Figura 14 - Análises de *nMDS* da toda comunidade bacteriana (a-c), de α -proteobacteria (d-f) e β -proteobacteria (g-i) baseado nos géis das figuras 11, 12 e 13, respectivamente. *Clustering* das comunidades foi efetuada pelo programa *PAST* (HAMMER et al., 2001; LIMA, 2011) com base no método de similaridade *Jaccard*. As linhas pontilhadas indicam a distância em valores de similaridade dentro de cada amostra composta

el em relação ao seu controle. Porém, é possível observar a alocação de tais amostras nas extremidades dos gráficos, indicando a distinção entre as diferentes micosferas, e uma tendência ao agrupamento de micosferas de organismos próximos filogeneticamente. Observa-se na parcela Picinguaba um padrão de separação que pode ser atribuído fato de que a maioria das amostras desta parcela foram coletadas da serrapilheira, e também a ocorrência de similaridades entre micosferas de fungos pertencentes à mesma família, onde as amostras M5-7 e M20-21 são todas consideradas na família *Marasmiaceae*. Além disso, nesta parcela, o cogumelo M24 representa a única amostra de solo micosférico do solo e aparece para estabelecer o seu próprio grupo isolado. Os resultados sugerem assim que, a estrutura da comunidade bacteriana que colonizou a micosfera pode ser influenciada pelo ambiente do solo local, e pode haver também um efeito seletivo forte de determinados grupos de fungos simbioses, corroborando com os resultados descritos por Izumi e Finlay (2010).

As análises para a comunidade de α -*proteobacteria* (figura 14d-f) apresentaram distribuições mais similares em todas as parcelas. Semelhante à comunidade bacteriana, em geral, a tendência para as amostras de solo controle na parcela Restinga foi para o meio, mas aquelas das micosferas apresentaram mais de uma distribuição com base na família fúngica. Na distribuição na parcela Santa Virgínia, é interessante que as micosferas na serrapilheira (M2 e M29) apresentaram distâncias similares entre as amostras controles, da mesma forma que foi observado para as amostras de Picinguaba. Como na comunidade bacteriana em geral, as amostras em Picinguaba exibiram uma tendência única com distâncias relativamente mais longas entre as amostras de solos micosféricos e controles correspondentes. Aqui também é aparente que existe a formação de grupos específicos, que se correlacionam com as famílias fúngicas.

Como visto anteriormente nos resultados a partir dos géis de DGGE da comunidade de β -*proteobacteria*, esta classe também não apresentou distribuições fixas nas análises de *nMDS* (figuras 14g-i). Por conseguinte, é difícil interpretar os padrões, indicando a natureza complexa da seleção sobre este tipo de classes.

Destaca-se por fim, que a técnica de DGGE foi apenas utilizada como uma análise preliminar, a fim de selecionar amostras compostas particulares que iria gerar resultados significativos através da técnica de pirosequenciamento, que tem uma resolução muito mais elevada. Por esta razão. Assim, a técnica DGGE não se

destina a descrever a diversidade verdadeira dos solos micosféricos e dos controles correspondentes, mas apenas dá suporte para nossa posterior comparação das estruturas de comunidades bacterianas dominantes no ambiente micosférico.

2.3.4 As comunidades bacterianas nos solos micosféricos via pirosequenciamento

2.3.4.1 Diversidade alfa das comunidades bacterianas

As sequências obtidas a partir do processo de pirosequenciamento gerou uma riqueza de dados sobre as comunidades bacterianas presentes nas amostras do presente estudo. Como tal, estes conjuntos de dados são úteis para a análise comparativa das comunidades bacterianas, a riqueza de espécies e as estimativas

Tabela 7 - Número total de sequências, espécies observadas (UTOs) e diversidade alfa (Chao1 e Shannon) para cada amostra baseado dos resultados de pirosequenciamento

Amostra	Número de sequências	Espécies observadas (UTOs)	Diversidade Alfa	
			Chao1	Shannon
C10	13.664	3.251	7.074	9,54
C16	9.772	2.742	6.564	9,70
C2	5.611	2.150	5.176	10,00
C21	4.678	2.395	6.065	10,55
C24	7.931	2.226	5.449	9,42
C27	3.489	1.748	4.835	9,90
C7	6.625	2.412	5.343	10,13
C9	13.751	2.986	6.665	9,21
M10	10.477	1.939	3.720	8,58
M16	7.414	1.394	3.148	7,93
M2	1.990	741	1.699	8,31
M21	4.191	1.328	4.229	8,28
M24	11.154	2.675	5.369	9,58
M27	12.014	3.622	8.008	10,41
M7	3.685	1.343	3.158	9,21
M9	13.545	2.460	5.199	8,87
Total	129.991	17.390	-	-

de cobertura, bem como na descrição geral da diversidade as níveis de filo e classe (ELSHAHEED et al., 2008). A tabela 7 apresenta o número total de sequências, as espécies observadas (UTOs) e índices de diversidade alfa por amostra. As amostras apresentaram uma variação no número total de sequências iniciais (1.990-13.751), o que pode ter interferido no número de UTOs presentes por amostra. Contudo, o número total de sequências nem sempre se correlaciona com o número total de UTOs. Baseado nestes dados, foi possível aplicar os índices de diversidade alfa (Chao1 e Shannon) para ter uma noção geral da diferença de diversidade relativa. Tais índices são úteis como uma abordagem eficaz para estimar a diversidade de comunidades microbianas, ou seja, quanto mais elevados os valores, maior a diversidade da comunidade microbiana (JUN e WENFENG, 2009). Na média, quando se considera os dois grupos de controles e micosferas como tratamentos diferentes, ambos os valores dos índices de diversidade alfa são maiores nos controles. Isto corrobora os resultados por Gryndler et al. (2000), que encontraram uma seleção da população bacteriana na superfície do micélio, resultando na composição de comunidades bacterianas menos diversas, o que indica a seleção neste ambiente, levando à colonização pelos organismos aptos a sobreviver e crescer nestas condições particulares do microhabitat.

As curvas de rarefação, tanto considerando as amostras separadamente (figura 15a) ou em grupos, comparando controle com micosfera (figura 15b), apresentam resultados semelhantes, indicando uma menor tendência de saturação para as amostras de solo controle. Essas curvas podem ser usadas para comparar as comunidades com quantidades diferentes de organismos amostrados (HUGHES et al., 2001), considerando numa mesma análise os componentes riqueza e equabilidade (OLSZEWSKI, 2004). Deve-se notar que na figura 15a (usando a seleção da identidade de UTOs de 97%) que o *plateau* não foi atingido em nenhuma das amostras, o que indica que toda a representação geral da diversidade das amostras só pode ser inteiramente descrita com uma maior esforço amostral. Isto corrobora com os dados de Anderson et al. (2012), que também não alcançaram uma assíntota em suas curvas de rarefação quando se estudaram a diversidade de comunidades bacterianas associadas com formigas. De acordo com Youssef e Elshahed (2009), as comunidades podem ser comparadas usando suas curvas de rarefação, onde a comunidade cuja curva está acima é considerada mais diversific-

Figura 15 - Curvas de rarefação com base no número total de seqüências e número total de UTOS (97% de similaridade) por amostra (a) e por tratamento (b)

ada. Assim, é suportada que o microhabitat específica de micosfera conduz as condições de menos diversidade.

Além deste tipo de enfoque, foi possível também fazer uma análise das sequências obtidas por meio de afiliação taxonômica das mesmas. Dessa forma, quando se analisa a diversidade alfa ao nível filo, é possível observar porcentagens particulares de cada grupo dentre os tipos de amostras (tabela 8). Tendo as amostras controle como base, verifica-se grandes alterações nas comunidades em todos os pares, com exceção para a amostra 16 (figura 16).

Como pode ser visto na figura 16, o filo *Acidobacteria* é o mais abundante entre as sequências obtidas na maioria das amostras. Este filo *Acidobacteria* se divide em pelo menos oito subdivisões, representadas por diferentes classes que são capazes de resistir a uma grande variedade de condições ambientais (HUGENHOLTZ et al., 1998; JANSSEN, 2006). Neste estudo, a comunidade de *Acidobacteria* tende a diminuir de frequências nas amostras de micosfera, o que pode ser possivelmente explicado pela sua característica oligotróficas (FIERER et al., 2007; DAVIS et al., 2011; FIERER et al., 2012), que é contrastante ao ambiente micosférico.

O segundo maior percentual de abundância relativa, em média, foi atribuído ao filo *Proteobacteria*. Este filo também é comumente detectado sob condições ácidas dos solos florestais, onde pode ser numericamente dominantes (LAUBER et al., 2001; LIN et al., 2010; NIE et al., 2011).

Também é interessante notar que quando se olha unicamente para a diferença entre amostras obtidas diretamente do solo e amostras de cogumelos presentes na serrapilheira (nas folhas), há um padrão de maior aumento neste grupo para as amostras obtidas de serrapilheira, enquanto que a frequência de *proteobacteria* permanece similar nas amostras analisadas a partir do solo. Por esta razão, é interessante olhar para o filo *Proteobacteria* de forma mais detalhada.

Olhando dentro do filo *Proteobacteria* ao nível de classe, é aparente mais acentuada a dinâmica de comunidades particulares, representadas pelos grupos *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* (figura 17, tabela 8). A alteração na frequência destes grupos foi previamente descrita por Wessen et al. (2010), que descreve que especialmente *Gammaproteobacteria* foram mais responsivas a alterações na quantidade de nutrientes no solo devido ao uso de fertilizantes. Assim sendo, uma vez que o micro-

Figura 16 - Composição relativa das comunidades bacterianas (nível de filo) dentro de cada amostra composta

Tabela 8 - Composição relativa detalhada das comunidades bacterianas para cada amostra

Táxon (filó)	C9*	M9*	C16	M16	C24*	M24*	C27*	M27*	C2*	M2*	C7*	M7*	C10*	M10*	C21*	M21*
Acidobacteria	57,5%	53,9%	42,8%	53,0%	46,6%	31,7%	27,9%	17,8%	39,8%	23,9%	31,0%	8,6%	52,1%	10,6%	17,7%	6,6%
Actinobacteria	0,6%	1,5%	0,7%	0,3%	0,7%	0,9%	3,4%	1,8%	1,0%	1,4%	1,1%	1,6%	0,7%	0,6%	1,6%	2,3%
Incertae sedis	0,1%	0,1%	0,1%	0,3%	3,8%	0,4%	-	-	0,6%	-	0,1%	0,1%	0,2%	-	-	-
Bacteroidetes	1,9%	4,3%	6,5%	0,7%	3,7%	4,9%	11,6%	18,9%	7,9%	12,0%	8,9%	32,1%	4,0%	17,9%	21,9%	18,6%
Chlamydiae	1,4%	1,1%	0,9%	0,3%	0,5%	0,2%	0,5%	0,6%	1,0%	0,2%	1,0%	0,1%	1,7%	0,8%	0,3%	0,2%
Firmicutes	0,3%	0,5%	0,2%	0,3%	0,8%	0,1%	0,1%	0,4%	0,2%	0,1%	1,1%	0,4%	0,7%	0,1%	-	0,1%
Gemmatimonadetes	-	-	0,1%	-	0,3%	0,3%	0,7%	0,7%	0,2%	0,2%	1,0%	-	-	-	0,5%	0,3%
OD1	0,1%	-	0,1%	-	-	0,1%	0,2%	0,4%	0,2%	-	0,5%	-	-	-	0,2%	0,2%
Outro	16,3%	11,7%	13,7%	12,5%	19,5%	14,1%	21,2%	19,7%	21,6%	13,1%	25,2%	12,6%	15,1%	12,1%	20,9%	8,1%
Planctomycetes	1,4%	2,7%	1,0%	1,3%	1,8%	2,4%	3,2%	2,8%	1,2%	0,5%	3,0%	2,3%	1,2%	2,2%	2,5%	1,9%
Proteobacteria	10,2%	12,1%	24,7%	24,4%	9,3%	32,0%	25,3%	21,9%	16,3%	42,3%	14,8%	34,2%	13,3%	46,1%	27,4%	58,8%
TM7	-	-	-	-	-	0,1%	-	0,1%	0,1%	0,7%	0,1%	0,3%	-	0,1%	0,3%	-
Verrucomicrobia	9,6%	12,1%	9,0%	6,9%	12,7%	12,7%	5,7%	14,6%	9,7%	4,8%	12,8%	6,5%	10,4%	9,3%	6,4%	2,8%
Não classificado	0,4%	-	0,1%	-	0,1%	-	-	0,1%	0,1%	0,9%	0,1%	-	0,4%	-	-	-

*Valores significativos ($p < 0,01$) para a diferença na similaridade entre cada amostra composta (solo micosférico e solo controle correspondente) baseado no teste *weighted Unifrac* utilizando o programa *QIIME* (CAPORASO et al., 2010).

habitat micosfera pode proporcionar concentrações mais elevadas de material recalcitrante e nitrogênio, este é um impacto possível sobre estes os grupos componentes deste filo.

Figura 17 - Composição relativa das comunidades bacterianas no filo *Proteobacteria* (nível de classe) dentro de cada amostra composta

Tabela 9 - Composição relativa detalhada das comunidades bacterianas no filo *Proteobacteria* para cada amostra

Táxon (classe)	C9	M9	C16	M16	C24	M24	C27	M27	C2	M2	C7	M7	C10	M10	C21	M21
■ <i>Alphaproteobacteria</i>	59,8%	73,6%	32,1%	26,7%	52,5%	38,6%	60,1%	50,3%	49,9%	49,3%	48,6%	71,1%	44,0%	12,6%	58,1%	27,2%
■ <i>Betaproteobacteria</i>	7,7%	7,0%	22,5%	66,5%	17,2%	36,8%	11,3%	21,5%	13,2%	27,5%	11,9%	11,8%	11,9%	7,3%	12,6%	20,8%
■ <i>Deltaproteobacteria</i>	4,2%	2,7%	2,7%	1,4%	6,3%	2,8%	3,7%	3,8%	3,6%	0,7%	4,4%	2,5%	2,7%	1,2%	1,3%	0,3%
■ <i>Gammaproteobacteria</i>	17,8%	9,6%	37,8%	3,5%	14,1%	14,7%	11,7%	15,7%	17,3%	14,5%	17,3%	6,4%	31,3%	73,3%	15,3%	48,9%
■ Outro	10,5%	7,1%	4,9%	1,9%	10,0%	7,1%	13,1%	8,7%	16,0%	7,9%	17,8%	8,2%	10,0%	5,6%	12,6%	2,7%

É interessante notar que *Alfaproteobacteria* compreende a maior parte das UTOs na média, seguindo por *Gammaproteobacteria* e, em seguida *Betaproteobacteria* (figura 17). Isto difere um pouco a partir do estudo realizado por Sugano et al. (2005) que encontrou *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, como grupos mais abundantes em resíduos vegetais no solo.

No presente estudo, pode-se observar que há uma tendência geral de aumento na quantidade de *Betaproteobacteria* e diminuição nos valores de *Alphaproteobacteria* nas amostras de solo micossférico. Este padrão é de certa forma diferentes do esperado, uma vez que várias bactérias pertencentes a *Alphaproteobacteria* são associadas a hospedeiros eucarióticos, como e bactérias

endofíticas, ou associadas aos fungos do solo, no caso de *Stenotrophomonas* (BERG e HALLMAN, 2006).

2.3.4.2 Diversidade beta das comunidades bacterianas

Embora importante para avaliar a abundância relativa de UTOs por amostra, a diversidade alfa não contempla de forma robusta a comparação entre os diferentes pares de amostras, sendo usada para este tipo de análise as medições de diversidade beta (figura 18). Para esta etapa, a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) serviu como uma ferramenta importante para visualizar a grande quantidade de dados de UTOs das bactérias respectivas. Usando esta mesma análise, Fierer et al. (2002) verificou as semelhanças e diferenças relativas entre as comunidades bacterianas.

Observa-se nas figuras de PCA os agrupamentos das amostras, sendo clara a formação de grupos com base em tipos de solo (solos micosféricos ou controles), substrato (solo ou serrapilheira) e associação com famílias fúngicas (figura 18).

Os valores atribuídos a PC1 e PC2 incorporaram a variação explicada 51,40 e 12,71%, respectivamente, assim que figura 18a representa de forma robusta as similaridades e diferenças observadas entre as diferentes amostras. É interessante notar que existe um conjunto de amostras de controle, e que há mais de uma separação entre as micosferas baseado no substrato. As amostras encontradas na serrapilheira apresentaram distâncias maiores em similaridade entre as micosferas e controles (linhas pontilhadas) em comparação com aquelas encontradas no solo. Isso corrobora a informação anterior apresentada na seção sobre os géis de DGGE. No entanto, neste caso, não houve uma associação evidente com base na família fúngica inferida.

Por outro lado, mesmo com menor variação percentual explicada para PC3 (9,00%), figuras 18b e 18c, as associações entre substrato e família fúngica foi melhor observada. Nestas duas figuras, os controles são relativamente próximos, juntamente com as micosferas que se estendem mais para os extremos do gráfico. Como pode ser visto na figura 18b, todas as amostras de cogumelos da família *Marasmiaceae* se localizaram relativamente distantes das outras amostras. No entanto, é interessante notar que M21, que está na serrapilheira, apresentou uma distância muito mais curta entre o seu controle correspondente. Do mesmo modo ne-

Figura 18 - Os resultados da análise PCoA de dados de pirosequenciamento sobre toda a comunidade bacteriana entre todas as amostras. As linhas pontilhadas indicam a distância em valores de similaridade dentro de cada amostra composta

sta figura, as amostras da família *Lepiotaceae* também se distribuíram numa área limitada do gráfico (figura 18c).

De forma mais detalhada, é possível observar a abundância relativa das UTOs de acordo com o substrato (no solo ou nas folhas) entre os dois tratamentos (controle e micosfera) ao nível de filo (figura 19). Em geral, parece que a comunidade de *Proteobacteria* aumentou no solo micosférico, com destaque para aqueles amostrados em cogumelos associados a serrapilheira. No entanto, parece que haver menos *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia* em tais amostras. Isto também é corroborado por Joseph et al. (2003) e Stevenson et al. (2004), que descobriram que estes dois filos parecem a ser restritos ao solo. Também é interessante observar o caso particular da amostra 24, onde há uma diminuição aparente no filo *Incertae sedis* na micosfera quando comparado com o seu controle correspondente. No entanto, é difícil entender esse tipo de dinâmica, composta de espécies com posições taxonômicas não bem estabelecidas e descritas, alocadas taxonomicamente como grupo "*incertae sedis*" (BALTAZAR e GIBERTONI, 2009).

Semelhantemente, quando olhamos dentro do filo *Proteobacteria* ao nível de classe (figura 20), é possível observar a dinâmica semelhante de acordo com o substrato e tratamento. Aqui existem algumas diferenças claras, onde embora o ordem *Burkholderiales* pareça ser a mais proeminente nas micosferas nos dois substratos, há uma maior abundância de tal grupo no solo de cogumelos. Por outro lado, as comunidades de *Burkholderiales* nos solos controles mantiveram-se em geral, num padrão constante, possivelmente indicando o efeito fúngico. Isto é corroborado pelos resultados por van Elsas (2008) que encontraram vários tipos de bactérias, incluindo *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Dyella* como selecionados na micosfera do fungo ectomicorrízico *Laccaria proxima*.

Dessa forma, se outras cepas bacterianas dessas classes seguem padrões semelhantes, estas podem ser portanto, mais adaptadas à presença de fungos simbiossiontes. No entanto, quando comparando entre as amostras representantes das famílias fúngicas, tais como *Lepiotaceae* (M10 e M24) e *Marasmiaceae* (M2, M7, M16 e M21), os padrões não são tão claramente indicados como baseado apenas no substrato. Isto pode ser atribuído ao fato de que cada cogumelo individual, embora sejam semelhante taxonomicamente, pode ocupar intervalos variados ao longo o processo de decomposição, ou seja, produzindo metabólicas para comunidades bacterianas específicas.

(a)

(b)

Figura 19 - Abundância relativa das UTOs da toda comunidade bacteriana de acordo com o substrato no solo (a) e nas folhas (b) entre os dois tratamentos ao nível de filo

(a)

Táxon (ordem)
Caulobacteriales
Alphaproteobacteria (outro)
Rhizobiales
Rhodospirillales
Sphingomonadales
Burkholderiales
Betaproteobacteria (outro)
Rhodocyclales
Procabacteriales
Myxococcales
Deltaproteobacteria (outro)
Enterobacteriales
Legionellales
Gammaproteobacteria (outro)
Pseudomonadales
Xanthomonadales
Outro

(b)

Figura 20 - Abundância relativa das UTOs da comunidade de *Proteobacteria* de acordo com o substrato no solo (a) e nas folhas (b) entre os dois tratamentos ao nível de ordem

2.3.4.3 UTOs com diferenças significativas entre solos micosféricos e controles

2.3.4.4 Teste *paired T* para diferenças significativas entre os tratamentos

As seções anteriores foram importantes para a determinação das variáveis e condições ambientais que contribuem para as diferenças na composição das comunidades bacterianas. No entanto, usar testes estatísticos como ferramentas para encontrar os resultados com base em diferenças significativas é essencial para o estabelecimento de descobertas científicas sólidas. O objetivo é testar uma hipótese ecológica, onde espera-se determinar se o ambiente físico ou o nicho dentro de cada ambiente é mais importante para a estruturação da diversidade bacteriana (LOZUPONE et al., 2006). Estes resultados revelam claras diferenças nas comunidades bacterianas baseado no tratamento e tipo de substrato.

A figura 21 apresenta os resultados do teste *paired T* ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Este tipo de análise considera as medidas tomadas "antes" e "depois" um tratamento. Assim, os representantes dos UTOs na figura são aqueles que mais drasticamente se alteram a partir da condição padrão (controle) para a condição na presença do cogumelo (micosfera) entre todas as amostras compostas. Este teste serve como uma ferramenta importante para demonstrar que a localização geográfica e as condições ambientais exercem forte pressão de seleção sobre a composição de espécies, como corroborado por Fulthorpe et al. (2008). A figura 21a indica a orientação das amostras baseado na similaridade, onde todas as amostras de controles ficaram a esquerda e das micosferas a direita. No entanto, dentro destes grupos de tratamento, as amostras não se agruparam baseado nas famílias fúngicas ou no substrato. Isto indica que, para este teste particularmente, apenas algumas micosferas apresentaram aumentos/diminuições relativos semelhantes das comunidades bacterianas, talvez de acordo com níveis sucessionais específicos dentro de cada nível trófico. Esta diferença na abundância de cepas bacterianas pode indicar que o solo funciona como um reservatório para as bactérias que têm um efeito benéfico sobre o crescimento dos fungos pré-simbióticos, antes do encontro inter-espécies, como sugerido por Frey-Klett et al. (2004). No entanto, existem diferenças visuais dentro das amostras de solo

micosférico entre substrato no solo e nas folhas (ou seja, o número relativamente elevado de representantes do filo *Acidobacteria* no solo).

Figura 21 - Abundância relativa das UTOs significativas ($p < 0,05$) entre todas as pares de amostras compostas baseado no teste *paired T* utilizando o programa *QIIME* (CAPORASO et al., 2010)

Outras alterações importantes são observadas entre os controles e as micosferas na serrapilheira, onde os filot *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* aumentaram e outros filot, especialmente *Acidobacteria*, diminuem. A diminuição na abundância de *Acidobacteria* é corroborada no estudo de Hollister et.

al. (2010), onde tais fenômenos ocorreram e quando as condições tornaram-se mais salinas. Assim, parece que quando se apresentam condições mais extremas, tais como as geradas pela micosfera, uma redução semelhante na abundância de *Acidobacteria* seria esperado. Ocorre também um aumento evidente no filo *Bacteroidetes* dentro de amostras coletadas em solo (no caso de M24 e M27). Embora haja alguma evidência do que os membros destes filos podem ser sub-representados nas bibliotecas de PCR amplificados de 16S RNAr (COTTRELL e KIRCHMAN, 2000; EILERS et al., 2000), membros da classe *Sphingobacteria*, pertencente a este filo, foram encontrados e classificados como comuns em solos (JANSSEN, 2006).

2.3.4.5 Teste ANOVA para UTOs significativamente induzidas ou inibidas

O teste ANOVA determina se a abundância das UTOs está correlacionada com uma variável contínua em uma categoria particular de grupos de amostras, e indica as UTOs particulares que são significativamente induzidas ou inibidas com base nestes critérios. Assim, esta é uma ferramenta importante para visualizar como UTOs de diferentes classificações taxonômicas reagem a diferentes situações, como substratos distintos (figura 22) e diferenças entre os tratamentos (figura 23).

Baseado nos dados apresentados na figura 22, das UTOs induzidas pelo substrato de solo, aquelas pertencentes aos grupos taxonômicos *Singulisphaera* (*Planctomycetaceae*) e *Acetobacteriaceae* (*Alphaproteobacteria*) foram as mais inibidas na serrapilheira. É interessante notar que *Singulisphaera* foi descrita inicialmente em pântanos de Rússia (KULICHEVSKAYA et al., 2008) e que *Acetobacteriaceae* é considerada é uma família composta por organismos capazes de realizar a fixação de N₂ (SARAVANAN et al., 2008), corroborando sua forte dependência do substrato. Entre as outras induzidas no substrato de solo foram os representantes de *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Myxococcales*, *Planctomycetaceae* e, algumas outras UTOs que só poderiam ser identificadas somente até o domínio *Bacteria*. Por outro lado, as UTOs induzidas pelo substrato de serrapilheira incluíram o seguinte em ordem crescente: 16656 (*Spartobacteria* gênero *incertae sedis*), 9854 (*Alphaproteobacteria*), 5542 (*Chitinophagaceae*), 13348 (*Alphaproteobacteria*), 8479 (*Rhizobium*), 11490 (*Alphaproteobacteria*), 117 (*Bacteria*) e 14500 (*Dokdonella*). No

Figura 22 - Log2 dos valores medias da abundância relativa das amostras no solo divididos por aqueles nas folhas, baseado nas UTOs significativas ($p < 0,05$) de acordo com substrato baseado no teste ANOVA utilizando o programa *QIIME* (CAPORASO et al., 2010)

entanto, embora que *Dokdonella* tenha sido descrita como a mais significativamente induzida pelo substrato de serrapilheira, não houve evidência na literatura da sua dependência de tal microhabitat.

Aplicando o mesmo teste ANOVA, mas desta vez baseado no tratamento (figura 23), é possível ver quais UTOs são induzidas ou inibidas pelas condições diferentes de solo controle ou micosfera. Entre as UTOs significativas encontradas aqui, representantes dos seguintes grupos foram inibidos na micosfera: *Chlamydiales*, *Myxococcales*, *Actinomycetales*, *Planctomycetaceae*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, além de alguns grupos só identificados até o domínio *Bacteria*. É interessante notar que UTO 2055 representa um organismos do filo *Proteobacteria* que foi fortemente inibido na micosfera. Talvez um exemplo extremo desse tipo de inibição seja a ocorrência de atividade antimicrobiana pelos fungos (MESSNER et al., 2003; FOLMAN et al., 2008). Portanto, pode haver forte incentivo para espécies de fungos se adaptarem a estabelecer a interação com bactérias, que podem os suprir de alguma forma ao longo de seu processo de colonização dos solos.

Este grupo é representado pelas UTOs induzidas na região da micosfera; 5718 (*Burkholderia*), 16188 (*Acidobacteria* Gp1), 8332 (*Comamonadaceae*), 13192 (*Sphingobacteriaceae*), 881 (*Burkholderiaceae*), 247 (*Chitinophagaceae*), 3444 (*Schlesneria*), 736 (*Acidobacteria* Gp3) e 16656 (*Spartobacteria* gênero incertae sedis). Esta diferenciação corrobora a ideia de microbiota específica existente sobre a superfície de micélios e na sua proximidade, provavelmente fornecida com carbono e energia a partir dos fungos (GRYNDLER et al., 2000).

Das UTOs mais induzidas pela micosfera, *Burkholderia* sp. é capaz realizar a fixação de nitrogênio atmosférico, enquanto outras espécies ocorrem como endófitos de diversas plantas, produzindo uma grande variedade de antibióticos com atividade contra fungos entomopatogênicos (SANTOS et al., 2010). Além disso, a versatilidade metabólica de espécies dentro da família *Burkholderiaceae* permitir-lhes a colonizar uma ampla faixa de nichos ecológicos, onde são relativamente bem representadas (MARTINSEN et al., 2010).

É interessante que a abundância de membros da subdivisão 1 de *Acidobacteria*, que parecem a ser controlados pelo pH do solo (SAIT et al., 2006; JANSSEN, 2006). Por conseguinte, esta UTO pode incluir um grupo que requer um

Figura 23 - Log2 dos valores medias da abundância relativa das microssferas divididos por aqueles dos controles, baseado nas UTOs significativas ($p < 0,05$) de acordo com tratamento baseado no teste ANOVA utilizando o programa *QIIME* (CAPORASO et al., 2010)

pH mais elevado que os fungos presentes no solo manipulam, portanto estas bactérias devem também ser capazes de sobreviver em tais condições. Semelhante, efeitos espécies fúngicas-específicas também se tornaram evidente em *Acidobacteriaceae* que foram mais prevalentes em substrato colonizado por *Hypholoma fasciculare*, talvez indicando uma associação entre este fungo e estas bactérias (FOLMAN et al., 2008). Por outro lado, os membros da subdivisão 3 de *Acidobacteria* não indicam muita correlação em associação com o ambiente micosfera. Mas ainda é interessante destacar que esta cepa particular, apesar de estar entre outras *Acidobacteria* (figura 24), foi o único organismo induzido pela micosfera.

A família *Sphingobacteriaceae* foi encontrada a ser uma das famílias bacterianas associadas com densos conglomerados do fungo *Piloderma* no solo (HESSE, 2012). Adicionalmente, a família *Sphingobacteriaceae*, especialmente o gênero *Mucilaginibacter* (*Bacteroidetes*), tem sido muitas vezes associada com a capacidade de hidrolisar pectina, xilana e outros hemiceluloses (PANKRATOV et al., 2007). Dentro da família *Chitinophagaceae*, o gênero *Chitinophaga* foi descrito pela primeira vez em 1981, para descrever um novo grupo de bactérias filamentosas e quitinolíticas (SANGKHOBOL e SKERMAN, 1981). Isso corrobora as sugestões por Fulthorpe (2008) onde essas bactérias quitinolíticas podem estar usando os micélios fúngicos e insetos como fontes de carbono. Assim, não é muito surpreendente que haveria um representante desta família particular de bactérias.

É interessante notar que, dentro da família *Comamonadaceae* se aloca uma bactéria com grande potencial micófago, a espécie *Collimonas fungivorans*, que tem sido associada com micélios do fungo causadores da podridão branca (FOLMAN et al., 2008).

É importante notar em um outro estudo que a maioria das UTOs bacterianas induzidas na micosfera, *Burkholderia terrae* BS001, *Burkholderia sordidicola* BS026, *Burkholderia sediminicola* BS010, *Burkholderia phenazinium* BS024, "*Sphingoterrabacterium pocheensis*" BS024 e *Sphingobacterium daejeonense* BS025 foram encontradas e descritas como selecionadas para a micosfera de *Lyophyllum* sp. cepa Karsten, migrando via micélios fúngicos no solo (WARMINK e VAN ELSAS, 2009).

Em contraste, aquelas de *Schlesneria* e *Spartobacteria* induzidas pela micosfera não foram corroboradas em estudos prévios sobre micosferas. Isso indica um achado novo, onde talvez devido à natureza particular tropical do estudo estejamos amostrando grupos desconhecidos em relação a esta característica.

2.3.4.6 Abundância relativa das UTOs significativas e comparação filogenética

Usando as UTOs significativas resultantes do teste ANOVA baseado em tratamento, um mapa de intensidade (heatmap) da distribuição das mesmas foi gerado (figura 24). Neste tipo de análise, baseada na relação entre dados numéricos (abundância relativa das UTOs) e um gradiente de cor, observa-se também a disposição das amostras dos solos micosféricos e dos controles correspondentes de acordo com a similaridade entre as amostras (figura 24). Desta forma, temos que a maioria das micosferas estão ao lado esquerdo e a maioria dos controles estão ao lado direito, demonstrando assim a estruturação diferencial de tais comunidades bacterianas, representada pelas UTOs com alterações significativas entre estes dois tipos de ambiente. No entanto, é interessante notar que não existem padrões particulares baseado apenas no nível trófico inferido, substrato ou família fúngica. Este padrão geral de grupos semelhantes (por exemplo, M7, M16, M24 e M27; M21, M10 e M9; e M2 sozinha) implica ainda que a composição de comunidades bacterianas pode ser extremamente condicionais, e poderia também acompanhar os padrões de nichos específicos de decomposição (sucessional) mesmo dentro do mesmo nível trófico.

Para ilustrar o parentesco entre as comunidades bacterianas, a imagem foi combinada com um dendograma gerado através do método *fasttree*. É interessante notar que as UTOs (8332, 5718 e 881) de *Burkholderia* e *Comamonadaceae* (ambos são da família *Burkholderiaceae*) que foram induzidas na micosfera são muito estreitamente relacionadas com base nesta árvore filogenética. Este é o mesmo caso para *Sphingobacteriaceae* e *Chitinophagaceae* (UTOs 13192 e 247, respectivamente) que foram também induzidas pela micosfera. Por outro lado, existe uma UTO (16188) que foi classificada como *Acidobacteria* Gp1, está muito distante de outros organismos próximos taxonomicamente. As outras UTOs que foram induzidas pela micosfera (UTOs 3444, 736 e 16656) parecem a ser muito mais semelhantes as outras espécies que não foram induzidas pela micosfera. Talvez isto

* As UTOs induzidas pela presença do ambiente micosférico (micofera).

Figura 24 - Mapa de intensidade (heatmap) da distribuição e uma dendrograma gerada através do método *fasttree* baseado nas UTOs significativas ($p < 0,05$) de acordo com tratamento baseado no teste ANOVA utilizando o programa *QIIME* (CAPORASO et al., 2010)

indique que apenas as UTOs específicas de 5718 (*Burkholderia*) e 16188 (*Acidobacteria* Gp1), 8332 (*Comamonadaceae*) e 13192 (*Sphingobacteriaceae*) desenvolveram uma conexão evolutiva com os hospedeiros fúngicos, o que pode levar a ideia de compartilhamento de tal capacidade via transmissão horizontal de genes.

Portanto, a colocar todos esses dados juntos é essencial quando se considera as diversas variáveis possíveis e os fatores ambientais atuando na seleção de comunidades bacterianas no microhabitat micosfera.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As famílias fúngicas *Marasmiaceae* e *Lepiotaceae* mostraram-se como dominantes entre os cogumelos encontrados em áreas de Mata Atlântica (13 e 5 cogumelos, respectivamente), estando presentes nas três parcelas de estudo. Baseado no tipo de substrato (serrapilheira ou solo) e nas famílias fúngicas encontradas (utilizando dados das buscas BLAST e filogenia baseado nas sequências de ITS e 18S), o nível trófico para a maioria das amostras pode ser inferido a ser saprófita.

Baseado na técnica de DGGE, embora esta seja de baixa resolução, é bastante claro que existe uma grande diferença na comunidade bacteriana entre os solos associados ou não com os corpos de frutificação. Esta análise demonstrou que variou a diversidade de toda a comunidade bacteriana, de α -*proteobacteria* e de β -*proteobacteria* entre cada solo micosférico e solo controle correspondente. Apesar disso, as análises de *nMDS* indicaram a distinção entre as diferentes micosferas, e uma tendência ao agrupamento de micosferas de organismos próximos filogeneticamente.

Sob observações mais detalhadas, com base nos dados de pirosequenciamento, foi indicado que dentro dos grupos de tratamento, as amostras não se agruparam baseado nas famílias fúngicas ou no substrato. Apenas algumas micosferas apresentaram aumentos/diminuições relativos semelhantes das comunidades bacterianas. O grupo de UTOs mais induzidas na região da micosfera incorporou *Burkholderia*, *Acidobacteria* Gp1, *Comamonadaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Chitinophagaceae*, *Schlesneria*, *Acidobacteria* Gp3 e *Spartobacteria* gênero incertae sedis.

REFERÊNCIAS

- ALEM, M.A.S; OTEEF, M.D.Y; FLOWERS, T.H.; DOUGLAS, L.J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukaryotic Cell**, Washington D.C, v. 5, p. 1770–1779, 2006.
- ANDERSON, K.E.; RUSSELL, J.A.; MOREAU, C.S.; KAUTZ, S.; SULLAM, K.E.; HU, Y.; BASINGER, U.; MOTT, B.M.; BUCK, N.; WHEELER, D.E. Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 9, p. 2282-2296, 2012.
- ANDRADE, G.; MIHARA, K.L.; LINDERMAN, R.G. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 202, p. 89–96. 1998.
- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 8, p. 1–10, 2006.
- ASHBY, M.N.; RINE, J.; MONGODIN, E.; NELSON, K.E.; DIMSTER-DENK, D. Serial analysis of rRNA genes and the unexpected dominance of rare members of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 73, p. 4532–4542, 2007.
- ASSIGBETSE, K.; GUEYE, M.; THIOULOUSE, J.; DUPONNOIS, R. Soil Bacterial Diversity Responses to Root Colonization by an Ectomycorrhizal Fungus are not Root-Growth-Dependent. **Microbial Ecology**, Hoboken, v. 50, p. 350-359, 2005.
- AZAIZEH, H.A.; MARSCHNER, H.; ROMHELD, V.; WITTENMAYER, L. Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and other soil microorganisms on growth, mineral nutrient acquisition and root exudation of soil-grown maize plants. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 5, p. 321-327, 1995.
- BALTAZAR, J.M.; GIBERTONI, T.B. A checklist of the aphyllophoroid fungi (*Basidiomycota*) recorded from the Brazilian Atlantic Forest. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 109, p. 439-442, 2009.
- BANSAL, M.; MUKERJI, K.G. Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 5, p. 39-44, 1994.
- BÁRCENAS-MORENO, G.; ROUSK, J.; BÅÅTH, E. Fungal and bacterial recolonisation of acid and alkaline forest soils following artificial heat treatments. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1023-1033, 2011.
- BASILIO DE AZEVEDO, L.C. **Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares no solo e raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 111p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecology**: individuals, populations, and communities. 3rd ed. Malden, MA.:Blackwell Science, 1996. p. 829–830.

BERG, G; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T. (Ed.). **Microbial Root Endophytes**. Berlin:Springer-Verlag, 2006. p. 53–70.

BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 588–594, 2006.

BODDY, L. Fungal community ecology and wood decomposition processes in angiosperms: from standing tree to complete decay of coarse woody debris. New York:editora, , 2001. p. 43-56: **Ecology of woody debris in boreal forests**. (Ecological Bulletins, 49)

BOERSMA, F.G.H.; WARMINK, J.A.; ANDREOTE, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Selection of *Sphingomonadaceae* at the base of *Laccaria proxima* and *Russula exalbicans* fruiting bodies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 75, p. 1979–1989, 2009.

BOERSMA, F.G.H.; OTTEN, R.; WARMINK, J.A.; NAZIR, R.; VAN ELSAS, J.D. Selection of *Variovorax paradoxus*-like bacteria in the mycosphere and the role of fungal-released compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 2137–2145, 2010.

BONFANTE, P.; ANCA I. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 363–383, 2009.

BONFANTE, P. At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In: HOCK, B. (Ed.). **Mycota, IX ;Fungal Associations**, 2001. p. 45–91.

BOSWELL, G.P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F.A.; GADD, G.M.; RITZ, K. Functional Consequences of Nutrient Translocation in Mycelial Fungi. **Journal of Theoretical Biology**, New York, v. 217, p. 459–477, 2002.

BRULE, C.; FREY-KLETT, P.; PIERRAT, J.C. et al. Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1683–1694, 2001.

BURKE, R.M.; CAIRNEY, J.W.G. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 12, p. 105–116, 2002.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, China, v. 39, p. 183–204, 2009.

- CAPORASO, J.G.; KUCYNSKI, J.; STOMBAUGH, J. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.
- CESPEDES, R.; GONZALEZ, B.; VICUNA, R. Characterization of a bacterial consortium degrading the lignin model compound vanillyl-beta-D-glucopyranoside. **Journal Basic Microbiology**, Hoboken, v. 37, p. 175–180, 1997.
- CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.
- CHAPELA, I.H.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R.; MUELLER, U.G. **Science**, Washington, v. 266, p. 1691, 1994.
- CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 66, p. 5448–5456, 2000.
- CHOWDHURY, P.R.; HEINEMANN, J.A. The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* bg164r is necessary for cavity disease in white button mushrooms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 72, p. 3558–3565, 2006.
- CLEARY, D.F.R.; SMALLA, K.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; GOMES, N.C.M. Assessment of Variation in Bacterial Composition among Microhabitats in a Mangrove Environment Using DGGE Fingerprints and Barcoded Pyrosequencing. **Plos One**, Oxford, v. 7, n. 1, e29380, 2012.
- CLEGG, C.D.; LOVELL, R.D.L.; HOBBS, P.J. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 263–270, 2003.
- COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, p. D141–145, 2009.
- CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS, SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, SEMAD/INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS – MG. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Floresta Atlântica e Campos Sulinos**. MMA/SBF, Brasília. 2000.
- COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 66, p. 5116–5122, 2000.

DABIRE, A.P.; HIEN, V.; KISA, M.; BILGO, A.; SANGARE, K.S.; PLENCHETTE, C.; GALIANA, A.; PRIN, Y.; DUPONNOIS, R. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 17, p. 537–545, 2007.

DAVIS, K.E.R.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P.H. *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 13, p. 798–805, 2011.

DE BOER, W.; FOLMAN, L.B.; SUMMERBELL, R.C.; BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 795–811, 2005.

DE SANTO, A.V.; RUTIGLIANO, F.A.; BERG, B.; FIORETTO, A.; PUPPI G.; ALFANI, A. Fungal mycelium and decomposition of needle litter in three contrasting coniferous forests. **Acta Oecologica**, Amsterdam, v. 23, p. 247–259, 2002.

DEL GIORGIO, P.A.; COLE, J.J. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 503–541, 1998.

DIAS, E.S.; ABE, C.; SCHWAN, R.F. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 545–549, 2004.

DICKIE, I.A.; XU, B.; KOIDE, R. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. **New Phytologist**, Hoboken, v. 156, p. 527–535, 2002.

DOWD, S.E.; SUN, Y.; SECOR, P.R.; RHOADS, D.D.; WOLCOTT, B.M. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. **BMC Microbiology**, Dordrecht, v. 8, n. 43, 2008.

DUBOIS, J. Classificação e breve caracterização de safes e práticas agroflorestais. In: MAY, H.; TROVATTO, C.M.M (Ed.). **Manual Agroflorestal Para A Mata Atlântica**. Brasília, 2008. p. 17–62.

DUNHAM, S.M.; LARSSON, K.H.; SPATAFORA, J.W. Species richness and community composition of mat-forming ectomycorrhizal fungi in old- and second-growth Douglas-fir forests of the HJ Andrews Experimental Forest, Oregon, USA. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 17, p. 633–645, 2007.

EDDY, S.R. Profile hidden markov models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, p. 755–763, 1998.

EILERS, H.J.; PERNTHALER, F.O.; GLÖCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 66, p. 3044–3051, 2000.

ELSHAHEED, M.S.; YOUSSEF, N.H.; SPAIN, A.M.; SHEIK, C.; NAJAR, F.Z.; SUKHARNIKOV, L.O.; et al. Novelty and Uniqueness Patterns of Rare Members of the Soil Biosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 74, n. 17, p. 5422, 2008.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, p. 175–185, 1998.

FIERER N.; ROBERT, B.J. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **PNAS**, Stanford, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.

FIERER, N.; SCHIMEL, J.P.; HOLDEN, P.A. Influence of Drying–Rewetting Frequency on Soil Bacterial Community Structure. **Microbial Ecology**, Hoboken, v. 45, p. 63–71, 2002.

FIERER, N.; BRADFORD, M.; JACKSON, R. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Washington D.C., v. 88, p. 1354–1364, 2007.

FIERER, N.; LAUBER, C.L.; RAMIREZ, K.S.; ZANEVELD, J.; BRADFORD, M.A.; KNIGHT, R. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **The ISME Journal**, London, v. 6, p. 1007–1017, 2012.

FINLAY, R.D. The fungi in soil. **Modern Soil Microbiology**. In: VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T.(Ed.). London: CRC Press, 2007. p. 107–146.

FOLMAN, L.B.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; BODDY, L.; DE BOER, W. Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 181–191, 2008.

FONTAINE, S.; MARIOTTI, A.; ABBADIE, L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 837–843, 2003.

FORD, R.M.; HARVEY, R. Role of chemotaxis in the transport of bacteria through saturated porous media. **Advances in Water Resources**, Amsterdam, v. 30, p. 1608–1617, 2006.

FREY-KLETT, P.; CHAVATTE, M.; CLAUSSE, M.; COURRIER, S.; ROUX, C.; RAAIJMAKERS, J.; et al. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. **New Phytologist**, Hoboken, v. 165, p. 317–328, 2004.

FU, Y.; SHAO, L.; TONG, L.; LIU, H. Ethylene removal efficiency and bacterial community diversity of a natural zeolite biofilter. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, p. 576–584, 2010.

FULTHORPE, R.R.; RHODES, A.N.; TIEDJE, J.M. High levels of endemism apparent in 3-chlorobenzoate degrading soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 64, p. 1620–1627, 1998.

FULTHORPE, R.R.; ROESCH, L.F.W.; RIVA, A.; TRIPLETT, E.W. Distantly sampled soils carry few species in common. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 901–910, 2008.

GAMA-RODRIGUES, A.C.; GAMA-RODRIGUES, E.; BARROS, N.F. Balanço de carbono e nutrientes em plantio puro e misto de espécies florestais nativas no sudeste da Bahia. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1165–1179, 2008.

GARBAYE, J. Helper bacteria – a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Hoboken, v. 128, p. 197–210, 1994.

GARCIA-PAUSAS, J.; PATERSON, E. Microbial community abundance and structure are determinants of soil organic matter mineralisation in the presence of labile carbon. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1705–1713, 2011.

GÄRDENÄS, A.I.; ÅGREN, G.I.; BIRD, J.A.; CLARHOLM, M.; HALLIN, S.; INESON, P.; KÄTTERER, T.; KNICKER, H.; et al. Knowledge gaps in soil carbon and nitrogen interactions e from molecular to global scale. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 702–717, 2011.

GELLER, A. Comparison of mechanisms enhancing biodegradability of refractory lake water constituents. **Limnology and Oceanography**, Alberta, v. 31, p. 755–764, 1986.

GIBSON, J.; SOOD, A.; HOGAN, D. A. *Pseudomonas aeruginosa* - *Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 75, p. 504–513, 2009.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232, p. 167–180, 2001.

GONÇALVES, R.B.; BRANDÃO, C.R.F. Diversidade de abelhas (*Hymenoptera*, *Apidae*) ao longo de um gradiente latitudinal na Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 51–61, 2008.

GRUBE, M.; BERG, G. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 72–85. 2009.

GRYNDLER, M.; HRSELOVÁ, H.; STRITESKA, D. Effect of Soil Bacteria on Hyphal Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus claroideum*. **Folia Microbiologica**, Heidelberg, v. 45, n. 6, p. 545–551, 2000.

HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 17–27, 2009.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological Eletronica**, Galway, v. 4, p. 1-9, 2001.

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

HE, X.; ZHANG, P.; LIN, Y.; LI, A.; TIAN, X.; ZHANG, Q. Responses of litter decomposition to temperature along a chronosequence of tropical montane rainforest in a microcosm experiment. **Ecological Research**, Dordrecht, v. 24, p. 781–789, 2009.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, Hoboken, v. 35, n. 1, p. 1-21, 2004.

HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriological Reviews**, London, v. 36, p. 478–503. 1972.

HERVEY, A.; ROGERSON, C.T.; LONG, I. **Brittonia**, Dordrecht, v. 29, p. 226, 1997.

HESSE, C.N. **Characterization of Fungal and Bacterial Communities Associated with Mat-forming Ectomycorrhizal Fungi from Old-growth Stands in the H.J. Andrews Experimental Forest**. 2012. 185p. Tese (Doutorado em Botania e Pathologia de Plantas) - Oregon State Univerisity, Oregon, 2012.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOGAN, D.A.; KOLTER, R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. **Science**. Washington, D.C., v. 296, p. 2229–2232, 2002.

HOLLISTER, E.B.; ENGLENDOW, A.S.; HAMMETT, A.J.M.; PROVIN, T.L.; WILKINSON, H.H.; GENTRY, T.J. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 829–838, 2010.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington D.C., v. 180, p. 4765–4774, 1998.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 67, p. 4399–4406, 2001.

IZUMI, H.; FINLAY, R.D. Ectomycorrhizal roots select distinctive bacterial and ascomycete communities in Swedish subarctic forests. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 74, p. 1719–1728, 2010.

JANSSEN, P.H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 72, n. 3, p. 1719, 2006.

JAYASINGHEARACHCHI, H.S.; SENEVIRATNE, G. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal–rhizobial biofilms. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 405–408, 2005.

JENNINGS, D.H. Translocation of solutes in fungi. **Biology Reviews**, Oxford, v. 62, p. 215–243, 1987.

JOHANSSON, J.F.; PAUL, L.R.; FINLAY, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 1–13, 2004.

JOSEPH, S.J.P.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C.A.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 69, p. 7210–7215, 2003.

JUDD, K.E.; CRUMP, B.C.; KLING, G.W. Bacterial responses in activity and community composition to photo-oxidation of dissolved organic matter from soil and surface waters. **Aquatic Sciences**, Dordrecht, v. 69, p. 96–107, 2007.

JUN, Y.; WENFENG, X. Ammonia biofiltration and community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in biofilters. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, 3869–3876, 2009.

KATOH, K.; ASIMENOS, G.; TOH, H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. **Methods in Molecular Biology**, Amsterdam, v. 537, p. 39–64, 2009.

KERR, J.R.; TAYLOR, G.W.; RUTMAN, A.; HØIBY, N.; COLE, P.J.; WILSON, R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 52, p. 385–387, 1999.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the *Proteobacteria*. In: DWARKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3rd ed., Springer: New York, v. 5, p. 3–37, 2006.

KLUBER, L.A.; TINNESAND, K.M.; CALDWELL, B.A.; DUNHAM, S.M.; YARWOOD, R.R.; BOTTOMLEY, P.J.; MYROLD, D.D. Ectomycorrhizal mats alter forest soil biogeochemistry. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1607–1613, 2010.

KLUBER, L.A.; SMITH, J.E.; MYROLD, D.D. Distinctive fungal and bacterial communities are associated with mats formed by ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 1042-1050, 2011.

KOBAYASHI, D.; CROUCH, J.A. Bacterial/Fungal Interactions: From Pathogens to Mutualistic Endosymbionts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 63–82, 2009.

KOHLMEIER, S.; SMITS, T.H.M.; FORD, R.M.; KEEL, C.; HARMS, H. & WICK, L.Y. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. **Environmental Science and Technology**, Iowa City, v. 39, p. 4640–4646, 2005.

KOIDE, K.; OSONO, T.; TAKEDA, H. Colonization and lignin decomposition of *Camellia japonica* leaf litter by endophytic fungi. **Mycoscience**, Dordrecht, v. 46, p. 280–286, 2005.

KROPF, S.; HEUER, H.; GRÜNING, M.; SMALLA, K. Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 57, p. 187–195, 2004.

KULICHEVSKAYA, I.; IVANOVA, A.O.; BAULINA, O.I.; BODELIER, P.L.E.; DAMSTÉ, J.S.S.; DEDYSH, S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. **IJSEM**, Reading, v. 58, n. 5, p. 1186-1193, 2008.

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, n. 5782, p. 1917-1917, 2006.

LANG, E.; KLEEBERG, I.; ZADRAZIL, F. Extractable organic carbon and counts of bacteria near the lignocellulose-soil interface during the interaction of soil microbiota and white rot fungi. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 75, p. 57–65, 2000.

LAUBER, C.L.; STRICKLAND, M.S.; BRADFORD, M.A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2407–2415, 2008.

LAURANCE, W.F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biological Conservation**, Amsterdam, v. 142, p. 1137, 2008.

LEE, H.; CHANG, Y.C.; NARDONE, G.; KWON-CHUNG, K.J. *Tup1* disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 64, p. 591–601, 2007.

LEVEAU, J.H.J.; PRESTON, G.M. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. **New Phytologist**, Hoboken, v. 177, p. 859–876, 2007.

LIMA, J.E. **Diversidade de bacteria e Archaea em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo**. 2011. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LIN, Y.T.; HUANG, Y.J.; TANG, S.L.; WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; CHIU, C.Y. Bacterial community diversity in undisturbed perhumid montane forest soils in Taiwan. **Microbial Ecology**, Hoboken, v. 59, p. 369–378, 2010.

LIOUSSANNE, L.; PERREAULT, F.; JOLICOEUR, M.; ST-ARNAUD, M. The bacterial community of tomato rhizosphere is modified by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi but unaffected by soil enrichment with mycorrhizal root exudates or inoculation with *Phytophthora nicotianae*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 473–483, 2010.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. Unifrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; et al. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 1363–1371, 2004.

LUNDQUIST, E.; SCOW, K.; JACKSON, L.; UESUGI, S.; JOHNSON, C. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1661–1675, 1999.

MAEDA, T.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; MINGMING, P.; SHENG, L.; GARCIA, L.R.; TOMÁS, M.; WOOD, T.K. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. **The ISME Journal**, London, v. 6, p. 493–501, 2012.

MANSFELD-GIESE, K.; LARSEN, J.; BODKER, L. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 133–140, 2002.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E.; HIGASHI, R.M. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non- mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, p. 11–20, 1997.

MARSHNER, P.; TIMONEN, S. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 28, p. 23–36, 2005.

MARTINSEN, L.; JOHNSEN, A.; VENANZETTI, F.; BACHMANN, L. Phylogenetic footprinting of non-coding RNA: hammerhead ribozyme sequences in a satellite DNA family of *Dolichopoda* cave crickets (Orthoptera, Rhaphidophoridae). **BMC Evolutionary Biology**, Dordrecht, v. 10, n. 3, 2010.

MATA ATLÂNTICA. Disponível em: <rainforests.mongabay.com/mata-atlantica/mata-atlantica.html>. Acesso em: fev. 2010.

MATA, J.L.; HALLING, R.E.; PETERSEN, R.H. New species and mating system reports in *Gymnopus* (*Agaricales*) from Costa Rica. **Fungal Diversity**, Amsterdam, v. 16, p. 113-129, 2004.

MATA, J.L.; HUGHS, K.W.; PETERSEN, R.H. An investigation of *Omphalotaceae* (*Fungi: Euagarics*) with emphasis on the genus *Gymnopus*. **Sydowia**, Vienna, v. 58, n. 2, p. 191-289, 2007.

MCLEAN, M.A.; HUHTA, V. Temporal and spatial fluctuations in moisture affect humus microfungal community structure in microcosms. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 32, p. 114–119, 2000.

MESSNER, K.; FACKLER, K.; PONGSAK, L.; GINDL, W.; SREBOTNIK, E.; WATANABE, T. Overview of white-rot research: where we are today. In: GOODELL, B.; NICHOLAS, D.D.; SCHULTZ, T.R. (Ed.). *Wood Deterioration and Preservation: Advances in our Changing World*. Washington, DC: American Chemical Society, 2003. ACS symposium series, v. 845, p. 73–96.

MIRANDA, C.C.; CANELLAS, L.P.; TRINIDADE 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.

MOGGE, B.; LOFERER, C.; AGERER, R.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A. Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L-ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 9, p. 271–278, 2000.

MÖHLENHOFF, P.; MÜLLER, L.; GORBUSHINA, A.A.; PETERSEN, K. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, p. 169–173, 2001.

MOLINA, R.; PILZ, D.; SMITH, J.; DUNHAM, S.; DREISBACH, T.; O'DELL, T.; CASTELLANO, M. Conservation and management of forest fungi in the Pacific Northwestern United States: an integrated ecosystem approach. In: Moore, D., Nauta, N.N., Evans, S.E., Rotheroe, M. (Eds.), *Fungal Conservation Issues and Solutions*. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK, p. 19-63, 2001.

MOPPER, K.; ZHOU, X.; KIEBER, R.J.; KIEBER, D.J.; SIKOESKI, R.J.; JONES, R.D. Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. **Nature**, London, v. 353, p. 60–62, 1991.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 852-858, 2000.

- NAKAYAMA, J. Pyrosequence-Based 16S rRNA Profiling of gastro-intestinal microbiota. **Bioscience and Microflora**, Tokyo, v. 29, p. 83–96, 2010.
- NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERIUI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Hoboken, v. 54, p. 655–670, 2003.
- NAZIR, R; WARMINK, J.A.; BOERSMA, H.; VAN ELSAS, J.D. Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 169-185, 2010.
- NIE, M.; MENG, H.; LI, K.; WAN, J.; QUAN, Z.; FANG, C.; CHEN, J.; LI, B. Comparison of Bacterial and Fungal Communities Between Natural and Planted Pine Forests in Subtropical China. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 34–42, 2012.
- NILSSON, R.H.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, R.M. Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases – an example from the mycorrhizal fungi. **BMC Bio-informatics**, Dordrecht, v. 6, n. 178, 2005.
- NILSSON, R.H.; BOK, G.; RYBERG, M. KRISTIANSSON, E.; HALLENBERG, N. A software pipeline for processing and identification of fungal ITS sequences. **Source Code for Biology and Medicine**, Plymouth, v. 4, n. 1, 2009.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 63, p. 3327–3332, 1997.
- OLSZEWSKI, T.D. A unified mathematical framework for the measurement of richness and evenness within and among multiple communities. **OIKOS**, Hoboken, v. 104, p. 377–387, 2004.
- OSONO, T.; TAKEDA, H. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. **Mycologia**, Stanford, v. 94, p. 421–427, 2002.
- OSONO, T.; FUKASAWA, Y.; TAKEDA, H. Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition. **Mycologia**, Stanford, v. 95, p. 820-826, 2003.
- OSONO, T. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. **Ecological Research**, Dordrecht, v. 22, p. 955–974, 2007.
- PANKRATOV, T.A.; TINDALL, B.J.; LIESACK, W.; DEDYSH, S.N. *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan- and laminarin-degrading members of the family *Sphingobacteriaceae* from acidic Sphagnum peat bog. **IJSEM**, Reading, v. 57, p. 2979–2979, 2007.
- PATERSON, E.; MIDWOOD, A.J.; MILLARD, P. Through the eye of the needle: a review of isotope approaches to quantify microbial processes mediating soil carbon

balance. **New Phytologist**, Hoboken, v. 184, p. 19–33, 2009.

PEDROS-ALIO, C. Marine microbial diversity: can it be determined. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 14, p. 257–263, 2006.

PELEG, A., HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial–fungal interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 63–82, 2010.

PIETIKÄINEN, J.; FRITZE, H. Clear-cutting and prescribed burning in coniferous forest: comparison of effects on soil fungal and total microbial biomass, respiration activity and nitrification. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 101–109, 1995.

POOLE, E.J.; BENDING, G.D., WHIPPS, J.M. & READ, D.J. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*–*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. **New Phytologist**, Hoboken, v. 151, p. 743–751, 2001.

PRATA, E.M.B.; ASSIS, M.A.; JOLY, C.A. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea na transição da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas - Floresta Ombrófila Densa Submontana do Núcleo Picinguaba/PESM, Ubatuba, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 285–299, 2011.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B.M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, Oxford, Vol. v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.

PUCCINELLI, C.; CAPELARI, M. Two new species of *Marasmius* (*Basidiomycota*, *Marasmiaceae*) from Brazil. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 95, p. 295–300, 2006.

PUCCINELLI, C.; CAPELARI, M. A new species of *Marasmius* (*Basidiomycota*, *Marasmiaceae*) and the first record of *M. foliophilus* from Brazil. **Journal of Mycology**, Amsterdam, v. 28, p. 263–268, 2007.

PUCCINELLI, C.; CEPELARI, M. *Marasmius* (*Basidiomycota* - *Marasmiaceae*) do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: seção *Sicci. Hoehnea*, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 637–655, 2009.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 167–177. 2001.

RASHID, M.H.; KOMBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS**, Stanford, v. 97, n. 9, p. 4885–4890, 2000.

RICHARD, F.; MOREAU, P.A.; SELOSSE, M.A.; GARDES, M. Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 82, p. 1711–1729, 2004.

ROCHET, J.; MOREAU, P.A.; MANZI, S.; GARDES, M. Comparative phylogenies and host specialization in the alder ectomycorrhizal fungi *Alnicola*, *Alpova* and *Lactarius* (*Basidiomycota*) in Europe. **BMC Evolutionary Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 40, 2011.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.KM.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.AO; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, London, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROSA, L.H.; CAPELARI, M. AGARICALES FUNGI FROM ATLANTIC RAIN FOREST FRAGMENTS IN MINAS GERAIS, BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 846-851, 2009.

ROUSK, J.; BROOKES, P.C.; BÅÅTH, E. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 926-934, 2010.

SAIT, M.; DAVIS, K.E.R.; JANSSEN, P.H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 72, p. 1852–1857, 2006.

SANGKHOBOL, V.; SKERMAN, V.B.D. *Chitinophaga*, a new genus of chitinolytic myxobacteria. **IJSEM**, Reading, v. 31, p. 285–293, 1981.

SANTOS, A.V.; DILLON, R.J.; DILLON, V.M.; REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.239,p. 319–323, 2004.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T.M. 2008. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, Hoboken, v. 55, n. 1, p. 130-140.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 265–275, 2008.

SCHLOSS, P.D. A High-Throughput DNA Sequence Aligner for Microbial Ecology Studies. **Plos One**, Oxford, v. 4, n. 12, e8230, 2009.

SCHREINER, R.P.; BETHLENFALVAY, G.J. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. **Critical Review in Biotechnology**, Edinburgh, v. 15, p. 271–285, 1995.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D. ; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 105, p. 1413–1421, 2001.

SIGLER, W.V.; TURCO, R.F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 107–118, 2002.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; MARK WELCH, D.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. **Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington D.C. v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

SOOD, S.G. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 219–227, 2003.

SOUKUPOVÁ, L.; HRSELOVÁ, L.; GRYNDLEROVÁ, H.; MERHAUTOVÁ, V.; GRYNDLER, M. **Alkali-extractable soil organic matter: An important factor affecting the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi**. Institute of Microbiology ASCR, v.v.i., Division of Ecology, Videnska 1083, CZ 142 20, Prague 4, Czech Republic, 2008.

SPAIN, A.; KRUMHOLZ, L.R.; ELSHAHED, M.S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 992–1000. 2009.

SPRAGUE, R.; LAWRENCE, D.B. The fungi on deglaciaded Alaskan terrain of known age (Part I). **Research Studies**, Piraeus, v. 27, p. 110–128, 1959a.

SPRAGUE, R.; LAWRENCE, D.B. The fungi on deglaciaded Alaskan terrain of known age (Part II). **Research Studies**, Piraeus, v. 27, p. 214–229, 1959b.

SPRAGUE, R.; LAWRENCE, D.B. The fungi on deglaciaded Alaskan terrain of known age (Part III). **Research Studies**, Piraeus, v. 28, p. 1–20, 1960.

SPRAGUE, G.F.; WINANS, S.C. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, p. 1045–1049, 2006.

STAMETS, P. **Mycelium running: How mushrooms can help save the world**. Random House, Inc., New York. 2005.

STEFFEN, K.T.; SCHUBERT, S.; TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. **Bioremediation**, Washington D.C., v. 18, n. 3, p. 359–369. 2007.

STEVENSON, B.S.; EICHORST, S.A.; WERTZ, J.T.; SCHMIDT, T.M.; BREZNAK, J.A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes.

Applied and Environmental Microbiology, Washington D.C., v. 70, p. 4748–4755, 2004.

SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. Decomposition in terrestrial ecosystems. **Studies in ecology**, Blackwell, Oxford, v. 7, p. 342-362, 1979.

TONHASCA, JÚNIOR A. **Ecologia e história natural da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. p.198.

TOOMEY, K. **A Continuing Study of the Mushrooms on the Caribbean Island of Dominica**. 2009. 27p. Tese (Graduação em Estudos Ambientais) - Texas A&M University, Texas, 2009.

TORNBERG, K.; BÅÅTH, E.; OLSSON, S. Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacteria community of polluted and unpolluted soils. **Biology and Fertility of Soils**, Dordrecht, v. 37, p. 190–197, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology: An Introduction**. San Francisco: Pearson Education, 2010. p. 95.

UROZ, S.; CALVARUSO, C.; TURPAUL, M.P.; PIERRAT, J.C.; MUSTIN, C.; FREY-KLETT, P. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 73, p. 3019–3027, 2007.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA, F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 47, p. 77-87, 2011.

WARMINK, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Selection of bacteria in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 887-900, 2008.

WARMINK, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Migratory response of soil bacteria to hyphae of *Lyophyllum karsteni* in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C. v. 75, n. 9, p. 2820-2830, 2009.

WARMINK, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Selection of bacterial populations in the mycosphere of *Laccaria proxima*: is type III secretion involved? **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 887–900, 2008.

WARMINK, J.A.; NAZIR, R.; VAN ELSAS, J.D. Universal and species-specific bacterial 'fungiphiles' in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 11, p. 300–312, 2009.

WARMINK, J.A.; NAZIR, B.; CORTEN, J.D.; VAN ELSAS, J.D. Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 43, p. 760-765, 2010.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; DE MEIJER, A.; DE A. AMAZONAS, M.L.A.; NEVO, E.; DA EIRA, A.F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Amsterdam, v. 4, p. 267-290, 2002.

WAWRIK, B.; KUTLIEV, D.; ABDIVASIEVNA, U.A.; KUKOR, J.J.; ZYLSTRA, G.J.; KERKHOF, L. Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 73, p. 2982–2989, 2007.

WESSEN, E.; HALLIN, S.; PHILIPPOT, L. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1759–1765, 2010.

WILKINSON, S.; ANDERSON, J.; SCARDELIS, S.; TISIAFOULI, M.; TAYLOR, A.; WOLTERS, V. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 189–200, 2002.

YARA, R.; MACCHERONI, W.; HORII, J.; AZEVEDO, J.L. A bacterium belonging to the *Burkholderia cepacia* complex associated with *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Microbiology**, Hoboken, v. 44, p. 263–268, 2006.

YOUSSEF, N.H.; ELSHAHED, M.S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 305–313, 2009.

YOUSSEF, N.; SHEIK, C.S.; KRUMHOLZ, L.R.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; ELSHAHED, M.S. Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based Environmental Surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 75, n. 16, p. 5227, 2009.

ZAVARZIN, G.A. **A Planet of Bacteria**. Herald of the Russian Academy of Sciences. Dordrecht, v. 78, n. 2, p. 144–151, 2008.

ZHU, Y.G.; MILLER, R.M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 8, p. 407–409. 2003.

ANEXOS

ANEXO A

Domínio *Eukaria*

Transcripto de RNAr

Primers utilizados

Primer	Sequência (5'-3')
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
NS4	CTTCCGTCAATTCTTTAAG
ITS1	CTTGGTCATTAGAGGAAGTA
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Sequenciamento *Sanger*

Região de interesse	Primer		Tamanho esperado	Amostra (cogumelo)
	Forward	Reversa		
ITS total	ITS1	ITS4	900 pb	1,3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,16,28,30,32
ITS1	ITS1	ITS2	450 pb	todos (1-33)
ITS2	ITS3	ITS4	450 pb	todos (1-33)
18S total	NS1	NS8	2000 pb	5,7,8,9,10,11,12,13
18S metade	NS1	NS4	1000 pb	3,5,7,8,9,10,11,12

ANEXO B

Domínio *Bacteria*

Transcripto de RNAr

Primers utilizados

Primer	Sequência (5'-3')
203aF	CGCACAAAGCCCTACGGGGGAAAGATTAT
520F-MID1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGAGAGAGAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGAGAGCAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATCTCTGAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCATGAGAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGAGAGCAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGATCAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAGCAGAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGATCATCAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTCTCAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCAGAGCAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATGCATGAYTGGGYDTAAAGNG
520F-MID12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGAGCTGAYTGGGYDTAAAGNG
802R-1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACCRGGGTHCTAATCC
802R-2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACCAGATATCTAATTC
802R-3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTACDSRGGTMTCTAATC
802R-4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACNVGGGTATCTAATCC
948βF	CGCACAAAGCGGTGGATGA
U968F-1 GC	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGCGGGAACGC
1378R	CGGTGTGTACAACGCCCGGGAACG
1492R	CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTAT

Pirosequenciamento

Primer		Amostra (bactérias)
Forward	Reversa	
520F-MID1	802R(todos)	M2
520F-MID2	802R(todos)	C7
520F-MID3	802R(todos)	C16
520F-MID4	802R(todos)	C9
520F-MID5	802R(todos)	C10
520F-MID6	802R(todos)	M27
520F-MID7	802R(todos)	C2
520F-MID8	802R(todos)	M7
520F-MID9	802R(todos)	M9, C27
520F-MID10	802R(todos)	C21, M21
520F-MID11	802R(todos)	M10, C24
520F-MID12	802R(todos)	M16, M24