

ALAN EMANUEL SILVA CERQUEIRA

**DIVERSIDADE FÚNGICA EM SOLOS SOB PASTAGEM E FLORESTA DA
BACIA AMAZÔNICA E POTENCIAL DESSES FUNGOS PARA O
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Cerqueira, Alan Emanuel Silva, 1989-
C416d Diversidade fúngica em solos sob pastagem e floresta da
2016 Bacia Amazônica e potencial desses fungos para o controle de
fitopatógenos / Alan Emanuel Silva Cerqueira. – Viçosa, MG,
2016.

xii, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos do solo - Amazônia. 2. Fungos do solo -
Diversidade. 3. Pastagens - Solo. 4. Fitopatógenos - Controle.
5. Bacias hidrográficas - Amazônia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

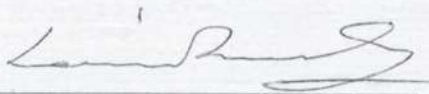
CDD 22. ed. 631.46811

ALAN EMANUEL SILVA CERQUEIRA

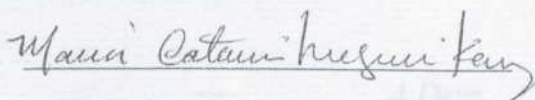
**DIVERSIDADE FÚNGICA EM SOLOS SOB PASTAGEM E FLORESTA DA
BACIA AMAZÔNICA E POTENCIAL DESSES FUNGOS PARA O
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

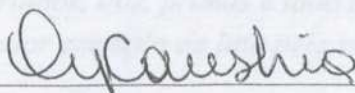
APROVADA: 15 de julho de 2016.



Laércio Zambolim



Maria Catarina Megumi Kasuya
(Coorientadora)



Cynthia Canêdo da Silva
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A todos, por me conhecer todos os momentos da vida, ser os familiares a tudo desejados. Dora, carregando por mim a responsabilidade, me incentivando e guiando em todos os momentos.

Aos meus pais: ao pai Manoel dos Santos Cerqueira Filho e Maria Auxiliadora Alves Cerqueira, por todo amor, apoio, incentivo e aos quais atribuo o mérito a tudo que conquisei e sem os quais não concluiria esta etapa da minha vida profissional. Todos os meus sonhos são motivados por e dedicados aos meus avós da guarda Manoel e Dora.

Aos meus irmãos (Jamarô, Yves e Júlia), a Jeferson, Maria Clara, Yane, Vitor, Paulo Artur, Luquinhas, Pedrinho e Yara. Aos meus tios, primo e toda minha família por estarem sempre presentes em todos os momentos, me incentivando, me apoiando e aconselhando. Amo muito todos vocês.

A minha prima Jussara (in memoriam), por ter causado tanta felicidade e amor mesmo diante de momentos tão difíceis e por ser o maior exemplo de luta pela vida que já conheci.

A Fernanda Mariana, por todo amor, incentivo, compreensão e por ser meu porto seguro em muitas das dificuldades encontradas e à sua família.

Aos meus muitos amigos irmãos, incluindo os da UFPA, UFPA, BSB, Chave, Portinari, Cleto e Paulo Samba, e os demais que desde a infância até hoje contribuem para a construção da minha carreira como pessoa e como profissional.

A Professora Cynthia Cândido da Silva pela sua excelente orientação e pela paciência e compreensão que teve comigo durante estes dois anos.

A Professora Maria Carolina Megumi Katsuya, pela co-orientação, por todo apoio e por ter me mostrado de braços abertos no seu laboratório.

Ao Professor Lázaro Zambolim pela colaboração e gentileza.

A Pedro Vinícius pelo apoio e comprometimento com bioinformática.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia

Ao Núcleo de Estudos em Microbiologia Agrícola (NEMBA) pelos momentos de

aprendizado e de alegria.

Aos meus pais Manoel Cerqueira e Maria Auxiliadora,

Aos meus irmãos, sobrinhos, tios, primos e toda minha família e a Fernanda,

À minha prima Jussara, o maior exemplo de luta pela vida e de felicidade que já vi,

Aos meus amigos e colegas,

Aos amigos PS (Lucas, Paulo, Kallan, Vitorias, Ruyra, Paulo, Sandro e Anderson), Marcela, Fabia, Mariana, André, Phillippi, Hanna, Samara, M. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder todas as condições de trilhar os caminhos a mim destinados. Deus, obrigado por me abençoar, iluminar, proteger e guiar em todos os momentos.

Aos meus preciosos pais Manoel dos Santos Cerqueira Filho e Maria Auxiliadora Silva Cerqueira, por todo amor, apoio, incentivo e aos quais atribuo o mérito a tudo que conquistei e sem os quais não concluiria esta etapa da minha vida profissional. Todos os meus passos são motivados por e dedicados aos meus anjos da guarda Manoel e Dora.

Aos meus irmãos (Ismario, Yves e Júlia), a Juliana, Maria Clara, Yane, Yres, Paulo Arthur, Luquinhas, Pedrinho e Yan, Aos meus tios, primos e toda minha família por estarem sempre presentes em todos os momentos, me incentivando, me acolhendo e aconselhando. Amo muito todos vocês.

A minha prima Jussara (in memoriam), por ter emanado tanta felicidade e amor mesmo diante de momentos tão difíceis e por ser o maior exemplo de luta pela vida que já conheci.

A Fernanda Manuela, por todo amor, incentivo, compreensão e por ser meu porto seguro em muitas das dificuldades encontradas e à sua família.

Aos meus muitos amigos/ irmãos, incluindo os da UFBA, UEFS, Bosque, Chave, Portinari, Gepetto e Partido Samba, e os demais que desde a infância até hoje contribuem para a construção do meu caráter como pessoa e como profissional.

A Professora Cynthia Canêdo da Silva pela sua excelente orientação e pela paciência e compreensão que teve comigo durante estes dois anos.

A Professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela co-orientação, por todo apoio e por ter me recebido de braços abertos no seu laboratório.

Ao Professor Laércio Zambolim pela colaboração e gentileza.

A Pedro Vidigal pelo apoio e ensinamentos em bioinformática.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia

Ao Núcleo de Estudos em Microbiologia Agrícola (NEMA) pelos momentos de aprendizado e de alegria.

As irmãs Tamar Holanda, minha grande parceira em todas as empreitadas de trabalho e Aneli pela irmandade e carinho durante estes dois anos.

Aos amigos PS (Lucas, Paulo, Kaliane, Vanessa, Thyara, Tomás, Sandro e Aristides), Marcílio, Fábio, Jonathan, Andrés, Phillippi, Hanna, Samantha, Manu, Rita,

Isabelle, Rodrigo, Conrado e todos os outros por tornarem esta jornada muito mais leve e agradável.

A Adriano, Marco Aurélio e Celso pela amizade e pela maravilhosa companhia.

Aos amigos do Vila Flat, em especial Duílio e Gabriela, pela parceria.

A Dra. Maria Zélia, pelos ensinamentos e por ter me incentivado a encarar este desafio.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia por todo o conhecimento transmitido e pela ativa contribuição para a minha formação como microbiologista.

Aos amigos Paulo Prates Júnior, Hilbert Lucas, Tomás Veloso e Kaliane pelos ensinamentos, amizade, companheirismo e exemplo de conduta profissional.

Aos amigos Fábio e Marcílio pela irmandade e companheirismo.

A Bruno, Marliane, Zé Maria, Melissa e todo pessoal do Laboratório de Associações Micorrízicas pelos excelentes momentos de trabalho e alegria.

Ao professor Sérgio de Paula pelo apoio ao trabalho e a todos do Laboratório de Imunovirologia.

A Adriana Nunes, Dorisvalder Nunes, Luiz Cleyton e ao pessoal da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) pelo apoio e por proporcionar, através da coleta, a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq, CAPES-PROEX, FAPEMIG pelo financiamento do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram e contribuem para a minha formação como profissional e como pessoa.

BIOGRAFIA

Alan Emanuel Silva Cerqueira, filho de Manoel dos Santos Cerqueira Filho e Maria Auxiliadora Silva Cerqueira, nasceu em Salvador, no Estado da Bahia, em 10 de Setembro de 1989. No segundo semestre de 2008 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Bahia, onde se graduou Bacharel em outubro de 2013. No segundo semestre de 2014, ingressou no mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em Julho de 2016.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Área de estudo

2. Alterações das comunidades e seus efeitos na composição da comunidade microbiana

2.1. Importância do estudo da alteração da comunidade

2.2. Métodos para o estudo da composição das comunidades microbianas

2.3. Efeitos das alterações florísticas nas comunidades bacterianas

2.4. Alterações ambientais e sua influência na comunidade fúngica

3. Considerações acerca das culturas da Banana e Marango e seus agentes fitopatógenos

3.1. Cultura da bananeira e problemas associados ao mal do Panamá - Fusarium wilt na cultura

3.2. Cultura do marango e seus associados ao fungo causador por *Boryria cinerea* e a influência exercida por *C. guineensis* no sistema

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OBJETIVOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

APRESENTAÇÃO

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1. Área de estudo	2
2. Alterações dos ecossistemas e seus efeitos na composição da comunidade microbiana	3
2.1. Importância do estudo da alteração do ecossistema	3
2.2. Técnicas para o estudo da composição das comunidades microbianas	4
2.3. Efeitos das alterações florestais nas comunidades bacterianas	5
2.4. Alterações ambientais e sua influência na comunidade fúngica	6
3. Considerações acerca das culturas da Banana e Morango e seus agentes fitopatogênicos	8
3.1. Cultura da bananeira e problemas associados ao mal do Panamá - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	8
3.2. Cultura do morangueiro e danos associados ao mofo cinzento causado por <i>Botrytis cinerea</i> e à antracnose causada por <i>Colletotrichum acutatum</i>	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
OBJETIVOS	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
APRESENTAÇÃO	20

Capítulo 1: Efeitos da conversão da floresta em pastagem no perfil funcional, na composição e na diversidade fúngica dos solos da Bacia Amazônica

RESUMO	21
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Coleta do solo na Bacia do Rio Mutum-Paraná – RO.....	26
2. Extração de DNA total do solo	27
3. Sequenciamento do metagenoma, montagem de contigs e análise do perfil funcional dos ambientes	28
3.1. Sequenciamento e montagem de contigs.....	28
3.2. Anotação das sequências pelo CLC Genomics Workbench.....	28
4. Sequenciamento da região ITS e análise do perfil taxonômico dos ambientes...	28
5. Curvas de Rarefação e atribuição de índices de diversidade Alfa e medidas de dissimilaridade	29
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	48
MATERIAL SUPLEMENTAR	51

Capítulo 2: Potencial de fungos isolados de solos da Bacia Amazônica para o biocontrole de fitopatógenos

RESUMO	61
ABSTRACT	63

INTRODUÇÃO	64
MATERIAL E MÉTODOS	68
1. Coleta do solo na Bacia do Rio Mutum-Paraná - RO	68
2. Isolamento de microrganismos	70
3. Prospecção dos isolados de interesse biotecnológico	70
3.1. Ensaio de cultura dupla (teste de pareamento) <i>in vitro</i>	70
RESULTADOS.....	72
DISCUSSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	80
CONCLUSÕES GERAIS.....	84

CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Diversidade fúngica em solos sob pastagem e floresta da Bacia Amazônica e potencial desses fungos para o controle de fitopatógenos.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

A floresta amazônica, considerada um dos locais de maior biodiversidade do planeta, tem sido submetida a elevadas taxas de desflorestamento. Em Rondônia, cerca de 36% do total da área florestal do Estado já foi desmatada, devido, principalmente, às atividades de pastagem. Considerando que ainda pouco se conhece sobre os efeitos que esta conversão pode causar na microbiota do solo, no equilíbrio e na resiliência do ecossistema, estudos vêm sendo realizados para sua melhor compreensão. Entretanto, o maior enfoque tem sido sobre as bactérias, ao passo que os fungos têm sido menos explorados. Em adição, os estudos realizados com fungos não utilizaram, em sua maioria, técnicas de sequenciamento de nova geração. Portanto, a aplicação destas técnicas pode contribuir para o melhor entendimento dos efeitos da alteração do ambiente na composição e diversidade de fungos do solo. Os danos ambientais causados pela utilização de defensivos agrícolas têm estimulado a adoção de práticas ambientalmente corretas, dentre elas, a aplicação de microrganismos e seus metabólitos para o controle biológico de fitopatógenos. Com o avanço da pecuária sobre as áreas das bacias hidrográficas do Rio Mutum-Paraná-RO, está ocorrendo uma conversão da Floresta Ombrófila Aberta em áreas de pastagem. Desse modo, o isolamento de fungos do solo desta região pode favorecer a obtenção de microrganismos aptos a atuarem no biocontrole, antes que estes sejam perdidos por este processo. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo, numa perspectiva ecológica, avaliar de que modo a conversão de floresta em pastagem, na região da Bacia do Rio Mutum-Paraná-RO, altera o perfil funcional, a composição e a diversidade das comunidades fúngicas do solo. Em adição, numa perspectiva biotecnológica, objetivou-se obter isolados fúngicos originários de regiões de pastagem e floresta e, testá-los quanto à sua eficiência no controle dos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causador do mal-do-Panamá na cultura da banana e, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* causadores do mofo cinzento e antracnose respectivamente, na cultura do Morango. Os resultados encontrados não revelaram nítidas diferenças nos perfis funcionais dos fungos entre os ambientes. Entretanto, houve uma alteração na composição taxonômica dos fungos com destaque para presença de Glomeromycota apenas na pastagem e ocorrência de Zygomycota praticamente apenas na floresta. O filo Ascomycota foi o mais abundante e

Basidiomycota teve baixa incidência em ambos ambientes. Foi observado aumento na diversidade alfa de fungos na pastagem acompanhada por uma homogeneização biótica, neste ambiente. Em relação ao isolamento de fungos, foram obtidos 74 isolados, dos quais cerca de 23 (31%) apresentaram potencial antagonístico *in vitro* a pelo menos um dos fitopatógenos. Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para uma melhor compreensão de como os fungos respondem à conversão de floresta para pastagem e, além disso, indicativos da possível utilização dos isolados e dos seus metabólitos para o biocontrole de importantes fungos causadores de doença em bananeira e morangueiro, foram visualizados.

ABSTRACT

CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Fungal diversity in forest and pasture soils from the Amazon Basin and their potential for the biocontrol of phytopathogens.** Adviser: Cynthia Canêdo da Silva. Co-adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya.

The Amazon rainforest has one of the highest biodiversity in the world and has been submitted to high deforestation. In Rondônia, around 36% of the forest was deforested and this is mainly due to the pasture establishment. Studies have been performed to ease the comprehension of the effects of this conversion on soil microbiota and on the ecosystem equilibrium and resilience. However, the majority part of them focused on bacteria while the fungi are less explored. In addition, the studies that focused on fungi often did not use next generation technologies. Thereby, the application of such technologies can contribute to a better understanding of the effects of environment alterations in soil fungi. The environmental damage caused by agricultural chemical compounds has stimulated the adoption of environmentally friendly practices, for example, the application of microorganisms and its metabolites to the biological control of plant pathogens. The advancement of livestock towards the Mutum-Paraná River hydrographic basin in Rondônia is leading to the conversion of the rainforest into pasture areas. Thus, the isolation of soil fungi from this region can allow the obtainment of microbes capable of biocontrol, before their loss by forest to pasture conversion. In this context, in an ecological perspective, this work aimed to evaluate how the deforestation and pasture establishment affect the functional profile, the composition and the taxonomy of the fungal soil communities in the Mutum-Paraná River basin regions. Furthermore, in a biotechnological perspective, this work intended to isolate fungi from forest and pasture regions and verify their efficacy in the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* that causes banana Panama disease, and *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum* causal agents of gray mold and anthracnose in the strawberry crop, respectively. The results did not show clear differences in the functional profile between the environments. However, there was an alteration of the fungal taxonomic composition. The phylum Glomeromycota was found only in pastures, while Zygomycota mainly in forest. Ascomycota was the most abundant phylum and Basidiomycota had low incidence in both environments. An increase in the alpha diversity of fungi in pasture areas was observed, followed by a biotic homogenization. Regarding the fungal isolation, it was obtained 74 isolates, 23 (31%) of them with potential to the *in vitro* control of at least one

of the plant pathogenic fungi. Therefore, these results contribute to a better understanding of how forest to pasture conversion affect the fungi. In addition, indicatives of the possible usage of the isolated fungi and its metabolites to the biocontrol of important plant pathogens were observed.

Estudos têm buscado compreender os efeitos desta conversão na microbiota do solo, no equilíbrio e na resistência do ecossistema. Entretanto, o maior enfoque tem sido sobre as bactérias, as quais os fungos têm sido menos explorados. Em adição, os estudos com fungos são escassos, em sua maioria, visando o sequenciamento de nova geração, que permite um melhor acesso à estrutura da comunidade. Desse modo, a aplicação de técnicas como o sequenciamento shotgun do metagenoma e sequenciamento de região intergênica ITS podem favorecer um melhor entendimento de como os fungos são afetados taxonomicamente e funcionalmente pela conversão de floresta em pastagem.

Devido à sua ampla diversidade biológica, os ambientes amazônicos, são potenciais detentores de microrganismos com potencial biotecnológico. A região da bacia do Rio Murum-Panamá em Rondônia tem sido sujeita à ação antrópica, portanto, o isolamento de fungos do solo desta região pode favorecer a obtenção de microrganismos aptos a atuarem nos diversos ramos da biotecnologia, antes que estes sejam perdidos pela conversão da floresta em pastagem.

Dentre as possíveis aplicações biotecnológicas dos microrganismos estão o controle biológico de fungos fitopatogênicos. Nos últimos anos, têm surgido uma intensa preocupação com os impactos ambientais gerados pela utilização excessiva de defensivos agrícolas e estratégias de biocontrole despertam como uma alternativa mais sustentável contra doenças e pragas.

Portanto, este trabalho teve como objetivo, numa perspectiva ecológica, avaliar de que modo a conversão de floresta em pastagem, na região da Bacia do Rio Murum-Panamá (RMP), afeta a composição taxonômica, a diversidade e o perfil funcional da comunidade fúngica do solo. Numa perspectiva biotecnológica, foi visado o isolamento de fungos da pastagem e floresta com potencial para o biocontrole dos fitopatógenos *Fusicoccum oxysporum* f. sp. *rubrum* causador do mal-do-Panamá na cultura do banana, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*, causadores de mofo cinzento e antracnose, respectivamente, na cultura do morango.

INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia gradualmente tem sido submetida à conversão das áreas de floresta em pastagem e/ou campos agrícolas. Em Rondônia, este processo teve origem na década de 70 e, desde então, a pecuária tem sido a principal atividade econômica da região.

Estudos têm buscado compreender os efeitos desta conversão na microbiota do solo, no equilíbrio e na resiliência do ecossistema. Entretanto, o maior enfoque tem sido sobre as bactérias, ao passo que os fungos têm sido menos explorados. Em adição, os estudos com fungos não utilizaram, em sua maioria, técnicas de sequenciamento de nova geração, que permitem um maior acesso à estrutura da comunidade. Desse modo, a aplicação de técnicas como o sequenciamento *shotgun* do metagenoma e sequenciamento da região intergênica ITS podem favorecer um melhor entendimento de como os fungos são afetados taxonômica e funcionalmente pela conversão de floresta em pastagem.

Devido à sua ampla diversidade biológica, os ambientes amazônicos, são possíveis detentores de microrganismos com potencial biotecnológico. A região da bacia do Rio Mutum-Paraná em Rondônia tem sido sujeita à ação antrópica, portanto, o isolamento de fungos do solo desta região pode favorecer a obtenção de microrganismos aptos a atuarem nos diversos ramos da biotecnologia, antes que estes sejam perdidos pela conversão da floresta em pastagem.

Dentre as possíveis aplicações biotecnológicas dos microrganismos estão o controle biológico de fungos fitopatogênicos. Nos últimos anos, têm surgido uma imensa preocupação com os impactos ambientais gerados pela utilização desenfreada de defensivos agrícolas e estratégias de biocontrole despontam como uma alternativa mais sustentável contra doenças e pragas.

Portanto, este trabalho teve como objetivo, numa perspectiva ecológica, avaliar de que modo a conversão de floresta em pastagem, na região da Bacia do Rio Mutum-Paraná-RO, altera a composição taxonômica, a diversidade e, o perfil funcional da comunidade fúngica do solo. Numa perspectiva biotecnológica, foi visado o isolamento de fungos de pastagem e floresta com potencial para o biocontrole dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causador do mal-do-Panamá na cultura da banana, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*, causadores do mofo cinzento e antracnose, respectivamente, na cultura do morango.

1. Área de estudo

A bacia do Rio Mutum-Paraná, no Estado de Rondônia, está localizada numa área de predominância de terrenos sedimentares (NUNES, 2012), clima equatorial úmido, baixas altitudes e altos índices pluviométricos (NIMER, 1989; RONDÔNIA, 2001 e 2005). Possui vegetação majoritariamente constituída pela Floresta Ombrófila, formação típica da zona intertropical, também conhecida como Floresta Fluvial (NUNES, 2012).

Ao longo de sua história, Rondônia passou por cinco grandes processos de ocupação impulsionados pelas atividades econômicas presentes na região: o primeiro ciclo da borracha; o ciclo do telégrafo; o segundo ciclo da borracha; o ciclo da cassiterita e; o ciclo agropecuário. Este último ciclo foi determinante para o pleno desenvolvimento do Estado e está diretamente ligado à descoberta de manchas de terras férteis na região, à conclusão da BR-364 que permitiu a chegada de forte contingente migratório e, à chegada do INCRA, em 1970, que promoveu a implantação de vários projetos de assentamento agrícola. O ciclo agropecuário proporcionou as condições econômicas, sociais e políticas para que o, então Território Federal de Rondônia, fosse transformado na 23ª Unidade Federada Brasileira (ARAGÃO et al, 2014; GRECELLÉ, 2008).

Entretanto, apesar do benefício social e econômico gerado, a evolução da pecuária em Rondônia está intimamente relacionada à evolução do desflorestamento, uma vez que anteriormente ao início da criação de gado não haviam registros de desmatamento na região. Estima-se que entre 1970 e 2013, o total desmatado chegou a cerca de 85.315 hectares, ou 35,91%, da área do Estado (ARAGÃO et al, 2014).

O avanço da pecuária sobre as áreas da bacia do Rio Mutum-Paraná tem acarretado a conversão da Floresta Ombrófila Aberta, em pastagem (NUNES, 2012). Apesar do atual interesse pelo estudo da comunidade microbiana do solo amazônico, informações acerca dos efeitos que a mudança do uso do solo pode causar na diversidade microbiana e no funcionamento do ecossistema ainda são incipientes (MENDES et al., 2015a) e, portanto, representa um campo aberto para pesquisas.

2. Alterações dos ecossistemas e seus efeitos na composição da comunidade microbiana

2.1. Importância do estudo da alteração do ecossistema

A biodiversidade presente no solo é fator crucial para regulação e funcionamento dos ecossistemas. Os microrganismos do solo, por exemplo, atuam na decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, na aquisição de nutrientes pelas plantas - por meio de associações simbióticas micorrízicas e bactérias fixadoras de nitrogênio, etc. Desse modo, a alteração da microbiota do solo, pode afetar o equilíbrio de importantes processos do ambiente (MOREIRA et al, 2010).

Os organismos que compõem os ecossistemas naturais, normalmente possuem um estado de equilíbrio ou um balanço populacional que se deve, em parte, à presença de inimigos naturais (ELLISON; EVANS, 1996). Nesse sentido, os microrganismos do solo, auxiliam no controle natural de doenças e pragas (MOREIRA et al, 2010). Entretanto, as mudanças ambientais causadas por atividades antrópicas, podem causar declínio da estrutura do solo e afetar a composição e as funções microbianas (MENDES et al., 2015a). Isto pode acarretar na perda deste controle natural e à dominância de certos organismos que se tornam potenciais causadores de danos (ELLISON; EVANS, 1996).

Alguns fatores contribuem para a capacidade de resiliência de uma comunidade microbiana frente a distúrbios ambientais, dentre eles, a elevada taxa de crescimento, a flexibilidade fisiológica e a rápida evolução dos microrganismos (ALLISON; MARTINY, 2008). Porém, alterações no ambiente podem promover o aumento da abundância de certos grupos com maior capacidade de adaptação, culminando numa mudança do perfil da comunidade biológica (ALLISON; MARTINY, 2008).

As mudanças na composição e distribuição microbiana no solo decorrentes de distúrbios ambientais, como por exemplo, a conversão de floresta para pastagem, pode ter relação com alterações dos componentes físico-químicos do solo. De fato, mudanças no pH, na matéria orgânica, no teor de nitrogênio e na concentração de alumínio e magnésio, decorrentes desta conversão, podem influenciar na distribuição dos microrganismos (RODRIGUES et al., 2013). Portanto, o conhecimento dos fatores que estão relacionados às mudanças nas comunidades microbianas é essencial para o entendimento dos seus impactos ambientais e para auxiliar no manejo dos ambientes (JESUS et al., 2009).

2.2. Técnicas para o estudo da composição das comunidades microbianas

Para o estudo da composição das comunidades microbianas, uma ampla variedade de técnicas pode ser utilizada. De acordo com Kirk et al. (2004), dentre os métodos utilizados para medir a diversidade microbiana do solo estão os baseados em bioquímica e os moleculares. Dentre os métodos baseados em bioquímica estão: a contagem de microrganismos cultiváveis em placas, a análise dos ácidos graxos metil éster (FAME) e ácidos graxos ligados aos fosfolipídios (PLFA). O método da cultura em placa é o método primário utilizado no estudo de comunidades microbianas, mas sofre limitações devido ao fato de apenas uma pequena parcela dos microrganismos ser cultivável além de favorecer microrganismos de crescimento rápido (VAN ELSAS et al., 2000; KIRK et al., 2004).

Devido às limitações inerentes às técnicas dependentes de cultivo, a emergência de técnicas independentes de cultivo foi essencial para o desenvolvimento dos estudos sobre a diversidade genética dos microrganismos do solo. Dentre os métodos moleculares, destacam-se as técnicas baseadas em PCR (“fingerprinting”) as quais incluem DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação) / TGGE (eletroforese em gel com gradiente de temperatura); RFLP (polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição); T-RFLP (polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição terminais), dentre outras (KIRK et al., 2004).

Mais recentemente, técnicas de sequenciamento de nova geração e de metagenômica vêm expandindo a detecção de comunidades microbianas não cultiváveis (LIU et al., 2015). Estas abordagens têm ampliado o interesse científico no entendimento da complexidade das comunidades microbianas para uma ampla gama de ambientes, inclusive os extremos, como lagoas hipersalinas, poços de petróleo, dentre outros (MENDES et al., 2015a). Nestes estudos, o foco não tem sido apenas na composição da comunidade microbiana, mas como a sua relação com o ambiente tem afetado o funcionamento dos ecossistemas (LANGENHEDER et al., 2010).

Nesse contexto, duas estratégias metodológicas principais têm sido utilizadas no estudo da diversidade microbiana: a metagenômica direcionada (“targeted metagenomics”) ou sequenciamento de *amplicon*, baseada na amplificação por PCR e sequenciamento de um ou mais marcadores moleculares e que, embora não envolva o sequenciamento direto do metagenoma, tem sido utilizada no novo campo do metagenoma quantitativo, e o sequenciamento aleatório *shotgun* do metagenoma

("shotgun metagenomics"), que permite acesso a todo conteúdo gênico e à estrutura da comunidade pela avaliação do metagenoma total (CUADROS-ORELLANA et al., 2013).

A qualidade do DNA metagenômico é um fator chave para a correta aplicação de ambas as técnicas supracitadas e, por isso, técnicas para um melhor amostragem e extração de DNA de alta qualidade têm sido desenvolvidas. (CUADROS-ORELLANA; LEITE; SMITH, 2013). Essas abordagens, aliadas à bioinformática, têm proporcionado um aumento nos estudos de ecologia microbiana que buscam a compreensão dos efeitos dos gradientes ambientais, a exemplo das alterações na forma de uso da terra, nos microrganismos (MENDES et al., 2015a).

2.3. *Efeitos das alterações florestais nas comunidades bacterianas*

Estudos com base em técnicas independentes de cultivo, têm mostrado que a composição da comunidade microbiana, especialmente a bacteriana, varia de acordo com as mudanças ambientais e físico-químicas do solo oriundas da conversão de floresta em pastagem e campos agrícolas (BORNEMAN & TRIPLETT, 1997; JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; RANJAN et al., 2015; MENDES et al., 2015a; MENDES et al., 2015b; MONTECCHIA et al., 2015).

Através do T-RFLP e bibliotecas de gene RNAr 16S (JESUS et al. 2009), sequenciamento de alto rendimento 454 do DNA (RODRIGUES et al., 2013) e sequenciamento metagenômico *shotgun* (MENDES et al., 2015a), foi observado um aumento da diversidade alfa bacteriana após conversão de floresta para pastagem em ambientes amazônicos. A acidez do solo é um dos fatores que mais influenciam a diversidade bacteriana. Na floresta, as comunidades estão relacionadas à uma maior acidez (menor pH), maior concentração e saturação de alumínio e maior matéria orgânica. Na pastagem, as comunidades microbianas estão associadas a aumentos nas concentrações de ferro, cobre, nitrogênio e magnésio (MENDES et al., 2015a; RODRIGUES et al., 2013; JESUS et al. 2009).

Este aumento na diversidade bacteriana na pastagem tem impacto no perfil funcional dos ambientes, uma vez que eleva a redundância funcional, ou seja, um maior número de organismos diferentes passa a executar as mesmas funções. Em ecossistemas em equilíbrio, como a floresta, o funcionamento é mantido com base numa elevada

abundância de genes funcionais e uma menor diversidade taxonômica, levando a uma menor redundância funcional (MENDES et al., 2015a).

Entretanto, ao contrário do observado para a diversidade alfa, este processo de conversão reduz a diversidade beta indicando uma homogeneização biótica entre as áreas convertidas, que passam a ser mais similares entre si, como resultado da perda de organismos endêmicos das florestas (RODRIGUES et al., 2013).

2.4. *Alterações ambientais e sua influência na comunidade fúngica*

Os fungos exercem uma gama de funções no ecossistema e, isto pode ser reflexo da sua vasta diversidade que tem sido estimada entre 1,5 e 5,1 milhões de espécies em todo o mundo, com cerca de 100.000 espécies descritas (HIBBETT et al., 2011). Estes organismos têm papel fundamental na ciclagem de nutrientes, podem desenvolver associações simbióticas e patogênicas com plantas e animais e, além disso, interagir com outros microrganismos (FRACETTO et al., 2013).

Assim como os outros microrganismos, os fungos também são afetados pela interferência humana nos solos (revisado por FRACETTO et al., 2013 e MUELLER et al. 2016). Visto a importância dos fungos para o desenvolvimento, funcionamento e estabilidade dos ecossistemas, o conhecimento da diversidade, estrutura e dos padrões de distribuição espacial das suas comunidades, são alguns dos pontos centrais da ecologia microbiana (LIU et al., 2015).

Características fisiológicas e ecológicas distintas entre fungos e bactérias levam a diferentes padrões de distribuição e diversidade de ambos os grupos ao longo de gradientes físico-químicos no solo (ORGIAZZI et al., 2013). Conforme mencionado anteriormente, a diversidade bacteriana está relacionada com as características físico-químicas do solo, em destaque para o pH. Entretanto, os fungos, têm comportamento diferente das bactérias e o pH do solo, por exemplo, exerce uma influência menor na composição das comunidades fúngicas (ORGIAZZI et al., 2013), que podem estar mais associadas, por exemplo, a mudanças no teor de nutrientes (LAUBER ET AL., 2008).

Esta diferença nas respostas às variáveis ambientais entre fungos e bactérias foi demonstrada no estudo realizado por Hovatter et al. (2011) onde, ao contrário do que ocorreu para bactérias, não foi possível explicar a variabilidade entre as comunidades fúngicas de acordo com características do solo. Alele et al. (2014), verificou que fungos e bactérias podem responder de modo semelhante, quando são feitas alterações mais

drásticas em áreas de florestas, mas quando as alterações são brandas, forças diferentes influenciam na distribuição destes organismos.

Desse modo, a proporção entre fungos e bactérias nas comunidades do solo se altera à medida que ocorrem mudanças em aspectos ambientais como disponibilidade de nutrientes no solo, umidade e distúrbios físicos (ORGIAZZI et al., 2013 e VAN DER WAL et al., 2006). Além disso, práticas agrícolas e intensificação da pastagem podem resultar na redução da biomassa de fungos por atividades de lavoura, pelo efeito negativo da fertilização nos fungos micorrízicos e pela ausência da camada de serapilheira que tem material de ligno-celulose que é o substrato para saprófitos especializados. Bactérias, entretanto, parecem ser menos afetadas pelo manejo agrícola (VAN DER WAL et al., 2006).

Os microrganismos do solo, dependem de produtos da fotossíntese das plantas e por isso as comunidades microbianas devem ser afetadas pela composição, diversidade e produtividade vegetal (GAO et al., 2013). É sugerido que uma maior diversidade vegetal, aumenta a quantidade de substratos orgânicos e de nichos, podendo acomodar mais microrganismos decompositores (GAO et al., 2013).

Desse modo, as alterações na composição vegetal possivelmente tem um papel chave nas comunidades fúngicas do solo (FRACETTO et al., 2013). Os fungos tendem a ser mais sensíveis a estas mudanças devido às suas relações mais diretas com as plantas, a exemplo das associações micorrízicas e dos fungos decompositores (LAUBER et al., 2008; PROBER et al., 2015; Gao et al., 2013). Relações positivas entre a diversidade de plantas e de fungos já foram relatadas (CARNEY, 2006; PEAY; BARALOTO; FINE, 2013).

Entretanto, um número proporcionalmente menor de estudos examinaram os efeitos do desflorestamento na diversidade de fungos de florestas tropicais, e o modo pelo qual os fungos são afetados por mudanças no uso do solo ainda não é bem definido (MUELLER et al., 2016). Alele et al. (2014) demonstrou por DGGE uma maior quantidade de bandas de fungos em ambientes preservados e que houve uma redução na diversidade de ambientes alterados. A redução da diversidade fúngica em ambientes de cerrado pela conversão de ambientes naturais em agrícolas também foi observada (DE CASTRO et al., 2008). Porém, Leal et al. (2009) estudando fungos micorrízicos arbusculares e Mueller et al. (2013) demonstraram um aumento na diversidade fúngica em ambientes de pastagem em relação a floresta em ecossistemas amazônicos.

Em relação à diversidade beta, Alele et al. (2014) demonstraram que áreas naturais tem maior diferença na composição taxonômica entre si do que ambientes antropizados, que tendem à uma homogeneização biótica das comunidades. As alterações ambientais podem, então, reduzir a resiliência aos distúrbios e, com o tempo, tornar as comunidades mais semelhantes entre si. (ALELE et al., 2014).

Entretanto, muitos destes estudos não utilizaram técnicas de sequenciamento de nova geração e, uma vez que os solos constituem grandes reservatórios de microrganismos, a utilização destas técnicas possibilita um melhor rendimento e maior acesso à diversidade microbiana (revisado por ORGIAZZI et al., 2013). Por outro lado, apesar da sua importância, os fungos possuem baixa representatividade nos principais bancos de dados de sequências metagenômicas em comparação com bactérias, o que pode representar um gargalo para este tipo de análise (CUADROS-ORELLANA; LEITE; SMITH, 2013).

3. Considerações acerca das culturas da Banana e Morango e seus agentes fitopatogênicos

3.1. Cultura da bananeira e problemas associados ao mal do Panamá - *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

A produção de banana é uma atividade com grande importância econômica no Brasil, ocupando a 11ª posição no *ranking* dos principais produtos agrícolas brasileiros. Esta cultura representa a maior parcela (~22,0%) da produção frutícola nacional, sendo os maiores produtores do país, os Estados da Bahia, São Paulo e Minas Gerais, (IBGE, 2013).

A bananeira, assim como toda cultura, pode ser potencialmente afetada por agentes causadores de doenças. Dentre estes agentes fitopatogênicos, se encontra o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), agente causal do mal-do-Panamá. Esta é uma doença endêmica em todas as regiões produtoras do mundo e, no Brasil, se torna um grave problema uma vez que, na maioria dos casos, as cultivares plantadas são susceptíveis (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* é um fungo de solo e devido à sua variabilidade patogênica foi dividida em raças de acordo com sua especificidade na infecção de diferentes cultivares de banana, sendo Foc 1, Foc 2 e Foc 4 as três raças

principais relatadas em todo o mundo (GROENEWALD et al., 2006; BORGES et al., 2009).

Devido à sua capacidade de formar estruturas de resistência, os clamidósporos, sobrevivem bem na ausência do hospedeiro e, isto, junto à sua associação com plantas invasoras comumente encontradas em bananais, favorecem a ocorrência do patógeno no ambiente (BORGES et al., 2009). Este fungo pode ser afetado positiva ou negativamente pelas alterações no solo, de modo que as condições deste ambiente podem influenciar na resistência e susceptibilidade das bananeiras ao patógeno (BORGES et al., 2009).

Dentre as formas de disseminação da doença estão, o contato dos sistemas radiculares de plantas sadias com esporos liberados por plantas doentes, o uso de material de plantio contaminado, a movimentação dos solos por equipamentos e implementos agrícolas, além da disseminação pela água de irrigação, drenagem, inundação, pelo homem e pelos animais (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009).

Os sintomas do mal-do-Panamá estão associados à presença do patógeno nos vasos condutores das plantas, especialmente no xilema. Nota-se externamente o amarelecimento, murcha, seca e quebra das folhas junto ao pseudocaule. Internamente, se observa, por corte transversal do pseudocaule e do rizoma, uma descoloração pardo-avermelhada, devido à presença do patógeno no câmbio vascular (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009).

De acordo com Fancelli (2003), Cordeiro (2007) e Borges et al. (2009), o mal-do-Panamá ao atingir cultivares susceptíveis podem provocar perdas de 100% da produção, como é o caso da banana “Maçã”. Cultivares que possuem susceptibilidade menor, como a banana “Prata”, podem sofrer perdas em torno de 20% da produção. Estas perdas estão relacionadas às características do solo, de modo que solos supressores ao patógeno podem favorecer o cultivo de linhagens susceptíveis, com maior produtividade.

As medidas para o controle da doença estão relacionadas à prevenção, como por exemplo, a plantação em áreas inócuas e sem incidência histórica; a utilização de mudas sadias e livres de nematoides (que facilitam a penetração do patógeno ao lesionar as plantas); a manutenção do pH do solo próximo à neutralidade e com níveis cálcio e magnésio (condições que desfavorecem o patógeno) e a plantação em solos com maior teor de matéria orgânica favorecendo a presença de outros microrganismos que competem com o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009).

Entretanto, poucas medidas existem no controle ao patógeno após seu estabelecimento. Assim, em bananais doentes, recomenda-se a erradicação das plantas infectadas, por meio de uso herbicidas, para evitar a propagação de fontes de inóculo do patógeno para outras áreas de cultivo (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009). Portanto, a busca por novos métodos de controle que possam atuar no controle ao patógeno representa um campo aberto para as pesquisas.

3.2. *Cultura do morangueiro e danos associados ao mofo cinzento causado por Botrytis cinerea e à antracnose causada por Colletotrichum acutatum*

A produção de morangos no Brasil é de grande importância social uma vez que o cultivo é realizado predominantemente em pequenas propriedades rurais, através da mão de obra familiar (CAMARGO et al., 2008). Esta produção ocorre em regiões de clima temperado e subtropical (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2009) e é destinada, majoritariamente, ao mercado interno, principalmente para o consumo *in natura* (ANTUNES; REISSER JUNIOR, 2007). Os principais estados produtores de morango são Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), respectivamente. (CARVALHO, 2012).

Os morangos são frutos muito perecíveis, portanto as perdas pós-colheita podem alcançar níveis expressivos (ANTUNES; DUARTE FILHO, 2005). A cultura do morango pode ser afetada por diversos agentes fitopatogênicos, e isso contribui para que a produção seja difícil, onerosa e necessite de medidas de manejo e controle de doenças. Dentre as principais doenças pós-colheita que afetam os frutos do morango, estão o mofo cinzento, ocasionado pelo fungo *Botrytis cinerea* (EMBRAPA, 2008) e antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* (FREEMAN, 2008).

Botrytis cinerea é um organismo com um estilo de vida necrotrófico transportado pelo ar, que age produzindo uma série de enzimas capazes de degradar a parede celular e algumas toxinas que contribuem para a destruição de células hospedeiras e utilização dos seus nutrientes. Além disso, há evidências de que este patógeno possua uma estratégia de patogenicidade onde é capaz de fazer com que o hospedeiro induza a morte celular programada (WILLIAMSON et al., 2007). Por apresentar características como a polifagia e ser cosmopolita, podem ocasionar epidemias rápidas e severas. Isso, junto com a formação de estruturas de resistência denominadas escleródios, quando não associado a hospedeiros, dificulta seu controle (MORANDI & MAFFIA, 2005).

Além dos frutos, este patógeno pode também atacar os pecíolos, caule, botões florais e pétalas. Com o desenvolvimento da infecção há formação de uma abundante massa de micélio e esporos sobre os frutos em amadurecimento. Normalmente, temperaturas amenas e, principalmente, alta umidade favorecem o desenvolvimento da doença, sendo que períodos de chuva corriqueiros promovem ataques severos da doença (ANTUNES & DUARTE FILHO, 2005).

A execução de práticas sanitárias, como a remoção de restos culturais infectados evitando a esporulação do fungo e a disseminação dos esporos, auxiliam na prevenção à contaminação de plantas sadias pelos patógenos (MORANDI & MAFFIA, 2005). Entretanto, a ausência de variedades de morango totalmente resistentes a *B. cinerea* e a capacidade do fungo permanecer em estado latente desde o período de florescimento causando podridão apenas após a colheita, faz com que seja necessária uma aplicação preventiva de fungicida visando o controle da doença (ANTUNES & DUARTE FILHO, 2005; EMBRAPA, 2008).

Colletotrichum acutatum é um fungo patogênico que atinge ampla gama de hospedeiros, e, por isso, pode levar a perdas de rendimento em diversas culturas, com destaque para a cultura do morango (JÍLKOVÁ et al., 2015). Dentre as estratégias de patogenicidade estão a formação inicial de um apressório, que penetra a superfície do hospedeiro combinando força e degradação enzimática, seguida pela hifa biotrófica, que passa a habitar o interior das células da epiderme envolvida pela membrana plasmática do hospedeiro e, por fim, a diferenciação do fungo em hifas necrotróficas, que possuem crescimento rápido destruindo os tecidos da planta (O'CONNELL et al., 2012). A maioria dos órgãos da planta são afetados por *C. acutatum* e colapsam devido à podridão causada por este fungo (FREEMAN, 2008).

Ao contrário do *B. cinerea*, apesar de *C. acutatum* sobreviver no solo sob certas condições, não há estruturas de dormência específicas observadas. Entretanto, a presença deste fungo em plantas não consideradas hospedeiras, incluindo ervas daninhas e plantas cultivadas sem sintomas da doença, favorece a permanência deste patógeno entre as estações, e serve como fonte de inóculo para a infecção do morango (FREEMAN, 2008).

As medidas de controle mais efetivas de doenças causadas por *Colletotrichum* estão relacionadas ao controle cultural, utilização de cultivares resistentes e controle químico (LANDUM et al., 2016; ZIVKOVIC et al., 2010). O controle cultural, reduz os níveis de inóculo, mas não é suficiente para combater *C. acutatum*, sendo apenas efetivo quando aplicado em controle integrado. Variedades resistentes/tolerantes aos patógenos não estão

disponíveis para todas as culturas e a sua aplicação é cara. Portanto, a utilização de fungicidas é a medida mais aplicada para redução da severidade das doenças causadas por *Colletotrichum*, e precisam ser continuamente aplicados (LANDUM et al., 2016).

Além de problemas associados à intoxicação de consumidores e trabalhadores, bem como a elevação do custo de produção, a aplicação constante de produtos químicos pode levar ao surgimento de indivíduos resistentes na população do fungo (WILLIAMSON et al., 2007) relatados há pelo menos quase duas décadas (HUNTER et al., 1987). Fungicidas inibidores da beta tubulina, por exemplo, têm pouca aplicação contra *Botrytis cinerea*, uma vez que o patógeno desenvolveu resistência a estes produtos (WILLIAMSON et al., 2007). A não sensibilidade de isolados de *B. cinerea* a uma combinação de fungicidas (“multi-drug resistance”) está muitas vezes associada à presença e ação de transportadores de membrana da família ABC (“ATP-Binding Cassete”), que transportam moléculas através da membrana plasmática, agindo como fatores de virulência desses fungos (DE WAARD et al., 2006). Por sua vez, a resistência a compostos como Benomyl e do grupo Benzimidazoles, já foi relatada para *C. acutatum* (PERES, 2004).

Esses fatores evidenciam a necessidade do desenvolvimento de produtos naturais e biodegradáveis como alternativa aos métodos tradicionais de combate ao patógeno (CUZZI, 2013). Estudos de ecologia microbiana do filoplano demonstraram potencial para o uso de antagonistas a *Botrytis* em culturas. Algumas formulações de agentes de controle biológico incluem bactérias, leveduras e fungos filamentosos como *Thichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*) e *Ulocladium oudemansii*. Seu modo de aplicação principal é através do *spray* nas culturas, porém foi demonstrado sucesso em morango, através da inoculação por meio de abelhas que carregam *Gliocladium roseum* e *T. harzianum* (CUZZI, 2013).

O controle *in vitro* de *C. acutatum* também já foi demonstrado, e algumas espécies de fungos endofíticos (LANDUM et al., 2016), além de *Trichoderma harzianum* (ZIVKOVIC et al., 2010; FREEMAN et al., 2004) foram relatadas com potencial *in vitro* para seu biocontrole.

Portanto, embora se saiba que a utilização de agentes de controle biológico, apresenta algumas restrições, como uma faixa restrita de temperatura e umidade ótimas para o antagonista, além de serem influenciadas pelas flutuações da microbiota natural do filoplano que respondem à mudanças nos exsudatos das plantas (WILLIAMSON et al.,

2007), o uso destes antagonistas desponta como uma alternativa ambientalmente sustentável para o controle de fitopatógenos (HAN et al., 2015).

ALLEN, P. O. et al. How Does Colonization of Natural Tropical Rainforest Ecosystems Affect Soil Bacterial and Fungal Communities in the Nile River Watershed of Uganda? *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. e104918, 2014.

ALTRICH, S. D.; MARTINY, J. B. H. Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105 Suppl., p. 11512-11519, 2008.

ANTUNES, L. E. C.; REISER JUNIOR, C. Produção de morangos. *Jornal da Fruta, Lages*, v. 13, n. 191, p. 22-24, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. Sistema de produção do morango. *Embrapa Clima Temperado, Sistema de Produção*, v. 5, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes/TM/Morango/Sistema%20Producao%20Morango/index.htm>. Acesso em: 05 out. 2015.

ARAGÃO, J.L.; PFEIFER, L.R.M.; BORRERO, M.A.V. Ocupação tardia e o desenvolvimento da agropecuária no Estado de Rondônia: Uma história da bovinocultura no desenvolvimento regional? Delayed occupation and the development of agriculture in the state of Rondônia. *Seminário-Revista das Pós-Graduações em História da UFPA*, v. 13, n. 1, 2014.

BORGES, A.L. et al. Sistema de produção da bananaite irrigada. *Embrapa Semiárido*, 2009. (Embrapa Semiárido, Sistema de Produção, 4). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes/T34/Banana/BananeiraIrrigada/dorocao.htm#murchasvasculares>. Acesso em: 05 jul. 2015.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BRASIL. Departamento Nacional de Pesquisas Minerais. PROJETO RADAMBRASIL. Folha SC 20 Porto Velho: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1976.

CAMARGO, L. R. P. Produtividade e qualidade de cultivares de morangoiro em sistemas orgânico e convencional na região de Guarapuava - PR. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual do Centro-Oeste UNICENTRO, Guarapuava/PR, 2005.

CARNEY, K. M.; MATSON, P. A. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microbial Ecology*, v. 52, n. 2, p. 226-238, 2006.

CARVALHO-SERENO, P. Informação Conjuntural. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais - Subsecretaria de Agropecuária - EMATER - MG, no 82, janeiro de 2012.

CORDIHO, Z.J.M. Sistema de produção de banana para o Estado do Pará. *Guia das ABRIS*, 2007. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes/TM/Banana/BananaPara/producao.htm>. Acesso em: 05 out. 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALELE, P. O. et al. How Does Conversion of Natural Tropical Rainforest Ecosystems Affect Soil Bacterial and Fungal Communities in the Nile River Watershed of Uganda? **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104818, 2014.
- ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105 Suppl , p. 11512–11519, 2008.
- ANTUNES, L. E. C., REISSER JUNIOR, C. Producao de morangos. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 15, n. 191, p. 22 - 24, 2007.
- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. Sistema de produção do morango. **Embrapa Clima Temperado, Sistema de Produção**, v. 5, 2005. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>>. Acesso em: 05 out. 2015.
- ARAGÃO, J.L.; PFEIFER, L.F.M.; BORRERO, M.A.V. Ocupação tardia e o desenvolvimento da agropecuária no Estado de Rondônia: Uma história da bovinocultura no desenvolvimento regional* Delayed occupation and the development of agriculture in the state of Rondônia. **Semina-Revista dos Pós-Graduandos em História da UPF**, v. 13, n. 1, 2014.
- BORGES, A.L. et al. Sistema de produção da bananeira irrigada. Embrapa Semiárido, 2009 (Embrapa Semiárido, Sistema de Produção, 4). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrigada/doencas.htm#murchasvasculares>>. Acesso em: 05 out. 2015
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2647–2653, 1997.
- BRASIL. Departamento Nacional de Pesquisa Mineral. PROJETO RADAMBRASIL. Folha SC 20 Porto Velho: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1978.
- CAMARGO, L. K. P. Produtividade e qualidade de cultivares de morangueiro em sistemas orgânico e convencional na região de Guarapuava - PR. (Dissertacao de Mestrado) - Universidade Estadual do Centro Oeste/UNICENTRO, Guarapuava/PR, 2008.
- CARNEY, K. M.; MATSON, P. A. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 226–238, 2006.
- CARVALHO SERGIO, P. **Informativo Conjuntural. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais - Subsecretaria do Agronegocio – EMATER – MG**, no 82, janeiro de 2012.
- CORDEIRO, Z.J.M. Sistema de produção de banana para o Estado do Pará. Cruz das Almas, 2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaPara/doencas.htm>> Acesso em: 05 out. 2015

- CORDEIRO, Z.J.M., MATOS, A.P., KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.) In: KIMATI, H., AMORIN, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. v. 2., p. 99-117.
- CUADROS-ORELLANA, S.; LEITE, L. R.; SMITH, A. Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: a Decade in Review. **Fungal Genomics & ...**, v. 3, n. 2, 2013.
- CUZZI, Cláudia. Extratos de canola no controle de *Botrytis cinerea* in vitro e do mofo cinzento em pos-colheita de morangos. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.
- DE WAARD, M. A et al. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. **Pest Management Science**, v. 62, n. 3, p. 195–207, 2006.
- DE CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129–139, 2008.
- ELLISON, C. A.; EVANS, H. C. Amazon-ingly useful fungi—A biological control cornucopia? **Mycologist**, v. 10, n. 1, p. 11–13, 1996.
- EMBRAPA – Incidência de Doenças de Pós-Colheita em Frutos de Morango Produzidos no Distrito Federal – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - **Embrapa Hortaliças**. ISSN 1677 - 2229, Agosto, 2008.
- FANCELLI, M. Cultivo da banana para o estado do Amazonas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4 p. (Sistema de produção, 6) Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaAmazonas/doencas.htm#3>> Acesso em: 05 out. 2015
- FRACETTO, G. G. M. et al. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 2, p. 59–67, 2013.
- FREEMAN, S. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **HortScience**, v. 43, n. 1, p. 66–68, 2008.
- FREEMAN, S. et al. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 4, p. 361–370, 2004.
- GAO, C. et al. Host plant genus-level diversity is the best predictor of ectomycorrhizal fungal diversity in a Chinese subtropical forest. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 12, p. 3403–3414, 2013.
- GROENEWALD, S. et al. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Mycological Research**, v. 110, n. 3, p. 297–305, 2006.
- HAN, J. et al. Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 2, p. 165–175, 2015.

- HIBBETT, D. S. et al. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 38–47, 2011.
- HOVATTER, S.R.; DEJELO, C.; CASE, A.L.; BLACKWOOD, C.B. Metacommunity organization of soil microorganisms depends on habitat defined by presence of *Lobelia siphilitica* plants. **Ecology** 2011, 92, 57–65.
- HUNTER, T. et al. Effects of Fungicide Spray Regimes On Incidence of Dicarboximide Resistance in Gray Mould *Botrytis-Cinerea* On Strawberry Plants. **Ann Appl Biol**, v. 110, n. 3, p. 515–526, 1987.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, v. 40, p. 1–102, 2013.
- JESUS, E.C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1004–1011, 2009.
- JÍLKOVÁ, B. et al. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates to selected fungicides. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 63, n. 4, p. 1111–1119, 2015.
- KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169–188, 2004.
- LANDUM, M. C. et al. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological Research**, v. 183, p. 100–108, 2016.
- LANGENHEDER, S. et al. Bacterial Biodiversity-Ecosystem Functioning Relations Are Modified by Environmental Complexity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10834, 2010.
- LAUBER, C. L. et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407–2415, 2008.
- LEAL, P. L.; STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n.1, p. 111–121, 2009.
- LIU, P. et al. Pyrosequencing Reveals Fungal Communities in the Rhizosphere of Xinjiang Jujube. **Biomed Res Int**, 2015 (2015), p. 972481
- HERPIN, U. et al. Biogeochemical dynamics following land use change from forest to pasture in a humid tropical area ^ of XRF-spectroscopy. p. 97–109, 2002
- MENDES, L. W. et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151–160, 2015b.
- MENDES, L. W. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, p. 255–265, 2015a.
- MONTECCHIA, M. S. et al. Pyrosequencing Reveals Changes in Soil Bacterial Communities after Conversion of Yungas Forests to Agriculture. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0119426, 2015.
- MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A. Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2005. 35p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 44).

- MOREIRA, F. M. A.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D.E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. UFPA, 2010.
- MUELLER, Rebecca. The Effects of Global Changes on Fungal Communities: Measuring Biodiversity Belowground. 2013.
- MUELLER, R. C. et al. Land use change in the Amazon rainforest favors generalist fungi. **Functional Ecology**, p. n/a–n/a, 2016.
- NEILL, C. et al. Nitrogen dynamics in soils of forests and active pastures in the western Brazilian Amazon Basin. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 9, p. 1167–1175, 1995.
- NIMER, E. Climatologia do Brasil. Rio de Janeiro, IBGE 2ª edição, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1989.
- NUNES, D. D. Hidrovia do Madeira: (Re)configuração, integração e meio ambiente. Tese. p.379. (doutorado), Universidade Federal do Pará. Belém, 2004.
- NUNES, D.D. Vulnerabilidade Natural à Erosão da bacia do Rio Mutum-Paraná – Porto Velho-RO (2009-2011). Porto Velho/RO. CNPq (MCT/CNPq/CT-Amazônia), **Relatório de Pesquisa**, 2012. 74p.
- O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060–5, 2012.
- OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 91 - 95, 2009.
- ORGIAZZI, A. et al. 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages From Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome. **Diversity**, v. 5, n. 1, p. 73–98, 2013.
- PEAY, K. G.; BARALOTO, C.; FINE, P. V. A. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. **The ISME journal**, v. 7, n. 9, p. 1852–61, 2013.
- PEREIRA, C. M. R. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Atlantic forest areas under different land uses. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 185, p. 245–252, 2014.
- PERES, N. A. R. et al. Benomyl Sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125–130, 2004.
- PLOETZ, R.C., HERBERT, J., KABONJI, S., HERNANDEZ, J.H., PEGG, K.G., VENTURA, J.A., MAYATO, L.S. Importance of Fusarium wilt in different banana-growing regions. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Fusarium wilt of Banana**, St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990. p.9-26.
- PROBER, S. M. et al. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. **Ecology Letters**, v. 18, n. 1, p. 85–95, 2015.
- PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity-Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.

RANJAN, K. et al. Forest-to-pasture conversion increases the diversity of the phylum Verrucomicrobia in Amazon rainforest soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. July, p. 1–9, 2015.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 988–93, 2013.

RONDÔNIA, Plano Agroflorestal de Rondônia – PLANAFLORO. **Porto velho: TECNOSSOLOS, Relatório Técnico**, 2001.

RONDÔNIA. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental (SEDAM). **Boletim Climatológico de Rondônia**, ano de 2003/ SEDAM Porto Velho, 2005.

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255–267, 2011.

VAN ELSAS, J. D. et al. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 133–151, 2000.

VAN DER WAL, A. et al. Fungal biomass development in a chronosequence of land abandonment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 51–60, 2006.

WANG, W. et al. Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to Fusarium wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.). **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 451–459, 2012.

WILLIAMSON, B. et al. Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007.

ZIVKOVIC, S. et al. Screening of antagonistic activity of microorganisms against Colletotrichum acutatum and Colletotrichum gloeosporioides. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 611–623, 2010.

OBJETIVOS

1. Perspectiva ecológica

- Entender como o perfil funcional, a composição e a diversidade taxonômica dos fungos são alteradas pela conversão de floresta em pastagem.

2. Perspectiva biotecnológica

- Isolar fungos com potencial para o bioncontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter um panorama dos efeitos da conversão de floresta em pastagem no perfil funcional da microbiota fúngica;
2. Verificar de que modo a conversão de floresta em pastagem e as características físico-químicas do solo afetam a composição taxonômica e a diversidade alfa dos fungos;
3. Verificar se a conversão de floresta em pastagem leva a uma menor dissimilaridade e maior homogeneização entre pontos de pastagem
4. Isolar fungos de amostras de solo aptos para o biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*.

APRESENTAÇÃO

Para uma exploração mais completa das amostras de solo coletadas na região da bacia do Rio Mutum-Paraná no estado de Rondônia, este trabalho objetivou não apenas extrair informações sobre a composição e diversidade fúngica, mas também, isolar fungos com potencial biotecnológico do solo deste local. Para tanto, a pesquisa foi dividida em dois capítulos. O primeiro, intitulado **“EFEITOS DA CONVERSÃO DA FLORESTA EM PASTAGEM NO PERFIL FUNCIONAL, NA COMPOSIÇÃO E NA DIVERSIDADE FÚNGICA DOS SOLOS DA BACIA AMAZÔNICA”**, utilizou de tecnologias de sequenciamento de nova geração para a compreensão de como as funções, a composição e a diversidade dos fungos são afetadas pela alteração de um ambiente de floresta para pastagem. No segundo capítulo, utilizou-se técnicas clássicas de microbiologia como o isolamento de microrganismos em meio de cultura, para obter fungos com potencial para o biocontrole de fitopatógenos. Este capítulo foi intitulado **“POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS DE SOLOS DA BACIA AMAZÔNICA PARA O BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS”**.

CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva, MS, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016.
Capítulo 1: Efeitos da conversão da floresta em pastagem no perfil funcional, na composição e na diversidade fúngica dos solos da Bacia Amazônica. Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

A ascensão de técnicas de sequenciamento de nova geração, tais como o sequenciamento do metagenoma, tem permitido um melhor entendimento das interações ecológicas entre os microrganismos e o ambiente e do modo como estas interações são afetadas por intervenções antrópicas. No estado de Rondônia, o avanço da pecuária em direção às áreas da bacia hidrográfica do Rio Mutum-Paraná, tem contribuído para a conversão da Floresta Ombrófila Aberta (pertencente à floresta amazônica) em pastagem. A alteração da microbiota por este processo, pode levar a uma mudança no perfil funcional dos ambientes, uma vez que diferentes espécies podem realizar diferentes funções. Tem sido observado que ambientes de pastagem possuem maior redundância funcional que a floresta. Isso pode ser reflexo do aumento da diversidade nos ambientes convertidos, como vem sendo demonstrado por diversos estudos, nos quais a elevação da diversidade alfa bacteriana nas pastagens, é atribuída às alterações físico-químicas do solo. Além disso, uma redução da diversidade beta e homogeneização biótica da comunidade tem sido observada nestes ambientes. Entretanto, uma menor proporção de trabalhos tem sido realizada com fungos. Estudos sugerem que este grupo de microrganismo possui maior relação com a composição vegetal do ambiente, sendo menos influenciados pelas características físico-químicas do solo. Desse modo, considerando que o referido processo de desflorestamento acarreta na redução da diversidade vegetal, levantou-se a hipótese de que a mudança de floresta para pastagem diminuiria a diversidade alfa e a dissimilaridade na composição dos fungos. Um total de 10 pontos de floresta e 10 pontos de pastagem foram amostrados ao da bacia do Rio Mutum-Paraná – RO. Pelo sequenciamento da região ITS do DNA total do solo foi possível ter acesso às mudanças na composição e na diversidade taxonômica entre os ambientes. As alterações dos perfis funcionais dos ambientes foram acessadas pelo sequenciamento metagenômico *shotgun* do DNA total. Os resultados encontrados não revelaram nítidas diferenças funcionais entre os ambientes. Alterações na composição de fungos, entretanto, foram mais notáveis. O filo Ascomycota predominou na floresta e na pastagem. Basidiomycota apresentou um percentual pequeno em ambos ambientes, sendo maior na pastagem. Zygomycota e Glomeromycota apresentaram tendências opostas. O primeiro, presente praticamente apenas na floresta e em elevada proporção. O segundo, ausente na floresta e encontrado

apenas na pastagem, embora em baixa proporção. Em relação à diversidade de gêneros, os fungos responderam de forma semelhante ao já relatado para as bactérias e, ao contrário do imaginado, houve um aumento da alfa diversidade na pastagem. Além disso, houve uma relação entre as características físico-químicas do solo e a distribuição dos fungos. A redução na dissimilaridade na pastagem, por sua vez, foi corroborada, indicando uma homogeneização biótica deste ambiente. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para uma melhor compreensão de como os fungos respondem à conversão de floresta para pastagem.

Advances of livestock towards the hydrographic basin of Mucuna-Piraí River contributes in the conversion of the area from forest to pasture. This process can lead to changes in the microclimate and in the functional profile of these environments, since different species can fulfill different functions. It has been observed that pasture environments change a higher functional redundancy than forest. This may be due the increase in microbial diversity in pasture ecosystems that has been demonstrated by many studies, at which the elevation of the bacterial alpha diversity is related to alterations in the soil physicochemical conditions. In addition, a decrease in the beta diversity and biotic homogenization has been reported at pastures. Smaller amounts of researches are performed with fungi. Some studies inform that the fungi have higher relation with the plant composition being less influenced by the soil properties. Thus, when the plant diversity decreases during the conversion process, we hypothesized that this could lead to a lower alpha diversity and the dissimilarity of fungi. Soil of 10 sample points from forest and 10 from pasture were collected throughout the Mucuna-Piraí River basin. Via amplicon ITS sequencing of the total soil DNA, changes in composition and in the taxonomic diversity between the two environments could be addressed. Shotgun metagenomic sequencing of the total soil DNA informed about the functional changes of these environments. The results indicate low functional differences but clear fungal composition differences. The phylum Ascomycota predominated in both forest and pasture. Basidiomycota presented lower percent loads, but was higher in pasture. Zygomycota and Glomeromycota presented opposite tendencies, the first being predominantly present in forest and the second only present in pasture and with low proportion. Regarding the diversity, the fungi response in the same way as previous studies have shown for bacteria and had higher diversity in pasture. In addition, there were positive relationships between soil properties and fungal distribution. The reduction of the dissimilarity in pasture was confirmed and this suggested to a biotic homogenization. These results contribute to a better understanding of how fungal communities are driven by forest to pasture conversion.

ABSTRACT

CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva, MS, Universidade Federal de Viçosa, July, 2016.
Chapter 1: Effects of forest-to-pasture conversion in the functional profile, composition and diversity of fungi from the Amazon basin soils. Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisor: Maria Catarina Megumi Kasuya.

The advance of next-generation sequencing (NGS) techniques, allows a better understanding of the ecological interactions between the microorganisms and the environment and the way human interventions affect such interactions. In Rondônia, the advance of livestock towards the hydrographic basin of Mutum-Paraná River contributes to the conversion of the amazon forest to pasture. This process can lead to changes in the microbiota and in the functional profile of those environments, since different species can realize different functions. It has been observed that pasture environments charge a higher functional redundancy than forest. This can be due the increase in microbial diversity in those ecosystems that has been demonstrated by many studies, at which the elevation of the bacterial alpha diversity is related to alterations in the soil physicochemical conditions. In addition, a decrease in the beta diversity and biotic homogenization has been reported at pastures. Smaller amounts of researches are performed with fungi. Some studies inform that the fungi have higher relation with the plant composition being less influenced by the soil properties. Thus, once the plant diversity decreases during the conversion process, we hypothesized that this could lead to a lower alpha diversity and the dissimilarity of fungi. Soil of 10 sample points from forest and 10 from pasture were collected throughout the Mutum-Paraná River basin. Via amplicon ITS sequencing of the total soil DNA, changes in composition and in the taxonomic diversity between the two environments could be addressed. Shotgun metagenomic sequencing of the total soil DNA informed about the functional changes of those environments. The results indicate low functional differences but clear fungal composition differences. The phylum Ascomycota predominated in both forest and pasture. Basidiomycota presented lower percent in both, but was higher in pastures. Zygomycota and Glomeromycota presented opposite tendencies, the first being predominately present in forest and the second only present in pasture and with low proportion. Regarding the diversity, the fungi response in the same way as previous studies have shown for bacteria and had higher diversity in pastures. In addition, there were positive relationships between soil properties and fungal distribution. The reduction of the dissimilarity in pasture was confirmed and this signalized for a biotic homogenization. These results contribute to a better understanding of how fungal communities are driven by forest to pasture conversion.

INTRODUÇÃO

A floresta amazônica é detentora da maior biodiversidade global em função da sua ampla área, tipos de solo, fauna e flora (STÜRMER & SIQUEIRA, 2011). Entretanto, a diversidade microbiana presente no território brasileiro é considerada ainda muito desconhecida, sendo evidente que o entendimento da diversidade biológica e funcional é fundamental para a manutenção da dinâmica do ecossistema e para um melhor manejo do uso das terras (PYLRO et al., 2014).

As regiões florestais amazônicas têm sido submetidas a elevadas taxas de conversão de uso do solo (MENDES et al., 2015a), ou seja, áreas de floresta nativa têm sido transformadas em áreas de pastagem e/ou campos agrícolas. Este mesmo processo ocorre em Rondônia, onde o avanço da pecuária sobre as áreas das bacias do Rio Mutum-Paraná tem levado à destruição da Floresta Ombrófila Aberta (ARAGÃO et al., 2014). Tais mudanças na forma de uso da terra alteram a composição vegetal e as propriedades físico-químicas do solo, influenciando a biodiversidade e o funcionamento de ecossistemas terrestres (LAUBER et al., 2008).

Em relação ao funcionamento dos ambientes, foi observado para bactérias que em áreas alteradas (pastagens e campos agrícolas) ocorre uma alta redundância funcional que é reflexo da sua maior diversidade taxonômica, ou seja, existe uma maior variedade de microrganismos executando as mesmas funções (MENDES et al., 2015a). Ambientes em equilíbrio como a floresta, por sua vez, possuem uma elevada abundância de genes funcionais e menor diversidade levando a uma menor redundância funcional. As maiores diferenças funcionais entre estes ambientes estão nas categorias respiração, metabolismo de DNA e RNA e resposta ao estresse, uma vez que há maior quantidade de gêneros realizando estas funções na pastagem do que na floresta (MENDES et al., 2015a).

A elevação da diversidade taxonômica, em especial bacteriana, com a conversão de ambientes de floresta amazônica para pastagem e agricultura tem sido relatada (CENCIANI et al., 2009; JESUS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; MENDES et al., 2015; MENDES et al., 2015b). Dentre os fatores físico-químicos que mais afetam a diversidade bacteriana, destaca-se a acidez do solo, de modo que, na floresta, as comunidades estão relacionadas à uma maior acidez e a aumentos na concentração e saturação de alumínio do que na pastagem (JESUS et al. 2009; MENDES et al., 2015a; RODRIGUES et al., 2013;).

Estes estudos relataram o aumento na diversidade alfa, ou seja, a diversidade de unidades espacialmente definidas (MAGURRAN, 2004), em ambientes de pastagem. Levando em consideração a diversidade beta, ou seja, as diferenças na composição da diversidade alfa entre diferentes áreas (MAGURRAN, 2004) verificar esta informação, Rodrigues et al. (2013) observaram que as comunidades microbianas dos ambientes de pastagem apresentam menor diversidade beta, havendo, assim, uma homogeneização biótica nestes ambientes.

No que concerne aos fungos, estudos demonstram que estes respondem menos às características físico-químicas do solo (ORGIAZZI et al., 2013; ROUSK et al., 2010). Por outro lado, as alterações na composição vegetal possivelmente têm um papel chave nas comunidades fúngicas do solo (FRACETTO et al., 2013) que tendem a ser mais sensíveis a estas mudanças, a exemplo das associações micorrízicas e dos fungos decompositores (LAUBER et al., 2008). De fato, uma relação positiva entre a diversidade de plantas e de fungos já foi relatada (CARNEY, 2006; PEAY; BARALOTO; FINE, 2013).

A redução da diversidade alfa fúngica pela conversão de ambientes naturais em agrícolas (DE CASTRO et al., 2008) e a maior riqueza de fungos em ambientes florestais já foram observadas (ALELE et al., 2014). Também foi demonstrado por que a conversão de ambientes florestais para ambientes alterados, leva a uma redução da beta diversidade, indicando uma homogeneização biótica da composição de fungos entre diferentes pontos (ALELE et al., 2014).

Nesse sentido, levantou-se a hipótese de que, a conversão de floresta em pastagem levaria a redução da alfa diversidade e da dissimilaridade na composição fúngica entre diferentes pontos. Portanto, visando contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos da ação antrópica sobre ambientes naturais, este trabalho, objetivou, pelo emprego de uma abordagem metagenômica, verificar de que modo a conversão de ambientes florestais da bacia do Rio Mutum-Paraná – RO para ambientes de pastagem afeta o perfil funcional, a composição de espécies e a diversidade alfa de fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do solo na Bacia do Rio Mutum-Paraná – RO

Amostras de solo foram obtidas em áreas de diferentes usos e manejos, com ênfase para as áreas de floresta e pastagem, a partir de uma grade de 10x10 km² considerando os diferentes tipos de solos da região (NUNES, 2012). A coleta foi realizada com uso do trado holandês de caneco entre 0-20 cm de profundidade. Cada amostra foi acondicionada em sacos plásticos. As coletas foram divididas em duas expedições, realizadas em setembro de 2014 e 2015. Na primeira, quatro locais de floresta e quatro de pastagem foram coletados, enquanto na segunda, foram feitas coletas em seis locais de floresta e seis de pastagem. Cada local de coleta foi amostrado em duplicata e, portanto, ao todo foram obtidas 20 amostras de solo oriundas de 10 pontos de pastagem e 20 amostras de solo de 10 pontos de floresta (Figura 1, Quadro S1). Uma parcela de cada amostra de solo foi destinada à análise dos componentes físico-químicos do solo na sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA RONDÔNIA – CPAFRO) localizada em Porto Velho, Rondônia.

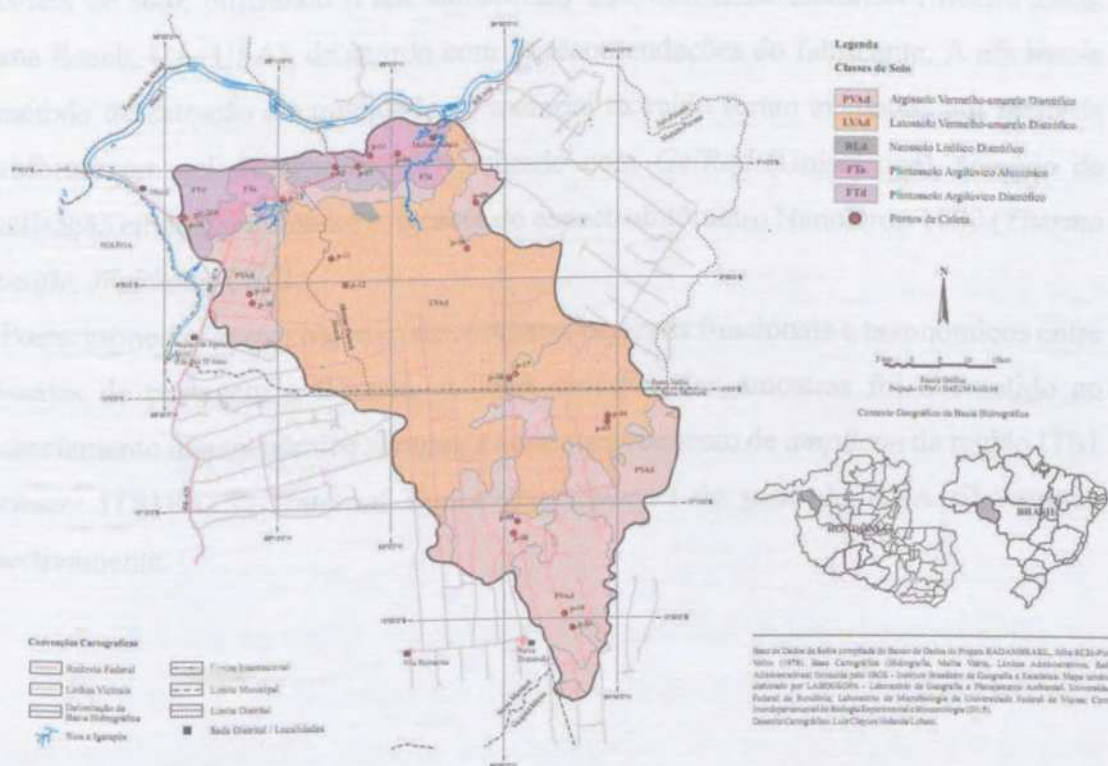


Figura 1 - Mapa da bacia Hidrográfica do rio Mutum-Paraná com localização dos 20 pontos de coleta.

É importante mencionar os motivos que levaram à realização de duas expedições de coleta. Inicialmente, a caracterização taxonômica e funcional dos fungos nos ambientes de pastagem e floresta seria feita apenas pela técnica de sequenciamento *shotgun* do metagenoma com os dados gerados a partir da primeira coleta. Entretanto, no decorrer do trabalho percebeu-se a necessidade de uma caracterização taxonômica mais completa dos fungos por toda a bacia do Rio Mutum-Paraná. Desse modo, optou-se pela amostragem de mais pontos de pastagem e floresta desta região. Além disso, considerando que a região intergênica ITS do DNA ribossomal pode ser considerada um marcador universal para o reino Fungi (SCHOCH et al., 2012), optou-se pelo sequenciamento de *amplicon* desta região, o que possibilitou uma análise taxonômica mais direcionada para este grupo de microrganismos. Os dados obtidos pelo sequenciamento *shotgun* foram destinados à análise funcional apenas. Verificar se vai deixar. Professora catarina colocou que possivelmente a época interfira.

2. Extração de DNA total do solo

A extração do DNA total foi realizada com 0,5 g de solo de cada ponto de coleta de solo, utilizando o Kit comercial *PowerSoil DNA Isolation* (MoBio Labs, Solana Beach, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A eficiência do método de extração e a qualidade do material extraído foram avaliados por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *GelRed* (Uniscience), seguido de visualização em transluminador e, através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific, Waltham, USA*).

Posteriormente, com o objetivo de comparar os perfis funcionais e taxonômicos entre ambientes de pastagem e floresta, o DNA extraído das amostras foi submetido ao sequenciamento metagenômico *shotgun* e ao sequenciamento de *amplicon* da região ITS1 – primers ITS1F/ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) do gene do RNA ribossomal, respectivamente.

3. Sequenciamento do metagenoma, montagem de *contigs* e análise do perfil funcional dos ambientes

3.1. Sequenciamento e montagem de *contigs*

O DNA total extraído das amostras dos quatro pontos de solo floresta (1F, 2F, 4F, 8F) e quatro de pastagem (3P, 5P, 6P e 7P), oriundos da primeira expedição, foram agrupados em 2 *pools*, gerando uma amostra composta de DNA originário de solo florestal e outra de solo de pastagem. Cada *pool* de DNA foi encaminhado para a realização do sequenciamento metagenômico *shotgun* através da plataforma Illumina HiSeq2000 (2x150 pares de base) (Illumina Inc.) As sequências de nucleotídeos dos *reads* obtidos pelo sequenciamento, foram montadas em *contigs* usando o algoritmo *De Novo Assembly* do software *CLC Genomics Workbench* versão 6.5.1.

3.2. Anotação das sequências pelo *CLC Genomics Workbench*

As sequências dos *contigs* foram anotadas no *CLC Genomics Workbench* versão 6.5.1. Inicialmente, estes *contigs* foram submetidos à anotação taxonômica por meio de pesquisas de similaridade contra o banco de dados de fungos do NCBI. As sequências dos *contigs* classificadas como do reino Fungi, foram submetidas à predição de genes pelo software AUGUSTUS utilizando o fungo *Neurospora crassa* como organismo modelo. Os genes preditos como codificadores de proteínas foram atribuídos a categorias funcionais com base em homologia ao banco de dados KOG (*Eukaryotic Orthologous Groups*), uma versão atualizada do banco COG (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) contendo proteínas ortólogas de eucariotos (TATUSOV et al., 2003), pela ferramenta RPSBLAST. Para verificar se houve diferença entre os ambientes, foram feitas comparações das médias a 5% de significância pelo teste t de Student considerando a quantidade absoluta de proteínas em cada categoria funcional do KOG como uma repetição de cada ambiente (floresta e pastagem). Para tanto, foi utilizado o programa R.

4. Sequenciamento da região ITS e análise do perfil taxonômico dos ambientes

O DNA extraído das duplicatas dos 10 pontos de floresta e 10 pontos de pastagem amostrados foi encaminhado para o sequenciamento de *amplicon* da região ITS1 do gene do RNA ribossomal – *primers* ITS1F/ITS2, através da plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc.). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software* (QIIME v.1.8.0) (CAPORASO et al., 2012)

utilizando os parâmetros do protocolo desenvolvido pelo *Brazilian Microbiome Project* (BMP) (PYLRO et al., 2014) para a região ITS (<http://www.brmicrobiome.org/#!its-profiling-illumina/cjki>).

As sequências com similaridade maior que 97% foram agrupadas em uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (OTU) e a taxonomia foi atribuída às OTUs utilizando o UNITE (KÖLJALG et al., 2013) como o banco de dados de referência. Por meio deste valor de similaridade, foi possível obter classificação taxonômica até o nível de gênero para cada OTU. Diferenças nos percentuais de incidência dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota e Zygomycota, foram utilizadas para avaliar de que modo a conversão floresta-plastagem interfere na composição destes filos. Para verificar se houve diferença na ocorrência de fungos fitopatogênicos e biocontroladores, pertencentes ao filo Ascomycota, entre os ambientes, foi feita uma busca por alguns gêneros de fungos fitopatogênicos já relatados no estado de Rondônia (FERNANDES et al., 2007; FERREIRA et al., 2003) e pelo gênero *Trichoderma*, amplamente utilizado para o biocontrole de fitopatógenos (MENDOZA et al., 2015; MACHADO & SILVA, 2013; WALUNJ et al., 2015).

Uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi feita através de uma tabela contendo a quantidade de sequências de cada filo por ponto de coleta (Tabela S1) e outra contendo os dados físico-químicos do solo (Tabela S2). Por meio desta análise verificou-se de que modo os filos e as características do solo se relacionam com os ambientes estudados. Os gráficos PCA foram gerados usando o *software* Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands).

5. Curvas de Rarefação e atribuição de índices de diversidade Alfa e medidas de dissimilaridade

Através do software QIIME foram obtidas curvas de rarefação e o índice de cobertura de Good's possibilitando verificar se o esforço amostral foi suficiente para representar todo o ambiente. A diversidade alfa foi calculada usando o programa QIIME. Os índices utilizados foram o Chao1, que estima riqueza de espécies, o índice de Shannon, que estima a diversidade com base na riqueza e abundância de espécies, a equitabilidade e dominância. A equitabilidade é uma medida do quão similar as espécies são em sua abundância e a dominância representa a extensão pela qual uma ou poucas espécies dominam a comunidade. Estes índices têm tendências opostas e quanto maior a equitabilidade menor a dominância e, assim, maior a diversidade (maior índice de

Shannon) (MAGURRAN, 2004). No presente trabalho, estes índices foram calculados em nível de gênero. O diagrama de *Venn* foi gerado usando uma ferramenta *online* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) e permitiu verificar a quantidade de gêneros compartilhados e exclusivos de floresta e pastagem.

A diferença na diversidade entre os ambientes foi verificada pela comparação das médias pelo teste *t* de Student a 5% de significância, considerando as 20 amostras (10 pontos em duplicata) da pastagem e as 20 da floresta como uma repetição de cada ambiente. Este teste foi feito utilizando o programa R. Ainda por meio deste programa, foi feita uma correlação entre diversidade (índice de Shannon) e características físico-químicas do solo através do coeficiente de correlação de Pearson. Assumindo que as amostras ambientais são bastante variáveis, considerou-se significativa, uma correlação com até 10% de significância.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi feita baseada numa matriz de dissimilaridade entre os tratamentos (Matriz de Bray-Curtis) obtida pelo QIIME. Os coeficientes de Bray-Curtis avaliam a distância biótica entre os pontos de coleta, ou seja, as diferenças na composição de espécies entre duas áreas. Quanto maior a dissimilaridade, maior a diferença na composição de espécies entre locais (Magurran, 2004). Os gráficos PCA foram gerados usando o *software* Canoco 4.5 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands).

RESULTADOS

O sequenciamento metagenômico *shotgun* dos *pools* de DNA de floresta e pastagem, geraram 44.300.000 e 45.300.000 sequências cruas (*reads*), respectivamente. Os *reads* originários da floresta foram montados em 421.513 *contigs* com tamanho médio de 359 pares de base, e os de pastagem em 543.116 *contigs* com média de 341 pares de base.

Tratando-se de ambientes de floresta, ao todo 2.082 do total de *contigs* obtidos foram classificados como fungo. Estas sequências foram submetidas à predição de genes, e 1.019 genes codificadores de proteínas foram identificados. Dentre as proteínas codificadas por estes genes 663 (~65%) foram classificadas em uma das 26 categorias funcionais do KOG. No que concerne à pastagem 2.704 *contigs* do total obtido para este ambiente foram pertencentes aos fungos, e a partir destes, 1.342 genes codificadores de proteína foram preditos. Dentre as proteínas codificadas por estes genes 867 (~65%) foram classificadas em uma das categorias do KOG (Tabela 1, Figura 2).

	Floresta	Pastagem
Total de contigs	421.513	543.116
Contigs classificados como fungo	2.082	2.704
Genes codificadores de proteínas	1.019	1.342
Proteínas codificadas por estes genes	663	867
Proteínas classificadas em uma das 26 categorias funcionais do KOG	428	562
TOTAL	867	1.424

Tabela 1 – Quantidade absoluta e relativa de proteínas de fungos em cada categoria funcional do KOG em ambientes de Floresta e Pastagem. As cores da tabela representam os tipos de função às quais as categorias funcionais (de A a Z) pertencem.

ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES	PASTAGEM		FLORESTA	
	Nº	%	Nº	%
[A] Processamento e modificação de RNA	5	0,58	10	1,51
[B] Estrutura e dinâmica da cromatina	5	0,58	7	1,06
[J] Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos	62	7,15	59	8,90
[K] Transcrição	3	0,35	4	0,60
[L] Replicação, recombinação e reparo	8	0,92	6	0,90
SINALIZAÇÃO E PROCESSOS CELULARES	PASTAGEM		FLORESTA	
	Nº	%	Nº	%
[D] Controle do ciclo celular, divisão celular, particionamento do cromossomo	2	0,23	4	0,60
[M] Biogênese de parede celular, membrana e envelope	8	0,92	5	0,75
[N] Motilidade celular	0	0,00	0	0,00
[O] Modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteína, chaperonas	84	9,69	54	8,14
[T] Mecanismos de transdução de sinal	38	4,38	21	3,17
[U] Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular	8	0,92	3	0,45
[V] Mecanismos de defesa	2	0,23	0	0,00
[W] Estruturas extracelulares	1	0,12	1	0,15
[Y] Estruturas nucleares	0	0,00	0	0,00
[Z] Citoesqueleto	0	0,00	0	0,00
METABOLISMO	PASTAGEM		FLORESTA	
	Nº	%	Nº	%
[C] Produção e conversão de energia	150	17,30	96	14,48
[E] Transporte e metabolismo de aminoácidos	143	16,49	108	16,29
[F] Transporte e metabolismo de nucleotídeos	36	4,15	43	6,49
[G] Transporte e metabolismo de carboidratos	82	9,46	65	9,80
[H] Transporte e metabolismo de coenzimas	37	4,27	24	3,62
[I] Transporte e metabolismo de lipídios	74	8,54	65	9,80
[P] Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	13	1,50	20	3,02
[Q] Biossíntese, transporte e catabolismo de metabolitos secundários	36	4,15	25	3,77
FUNÇÕES POBREMENTE CARACTERIZADAS	PASTAGEM		FLORESTA	
	Nº	%	Nº	%
[R] Predição de apenas funções gerais	68	7,84	41	6,18
[S] Funções desconhecidas	2	0,23	2	0,30
[X] Proteínas não nomeadas	0	0,00	0	0,00
TOTAL	867	100,00	663	100,00

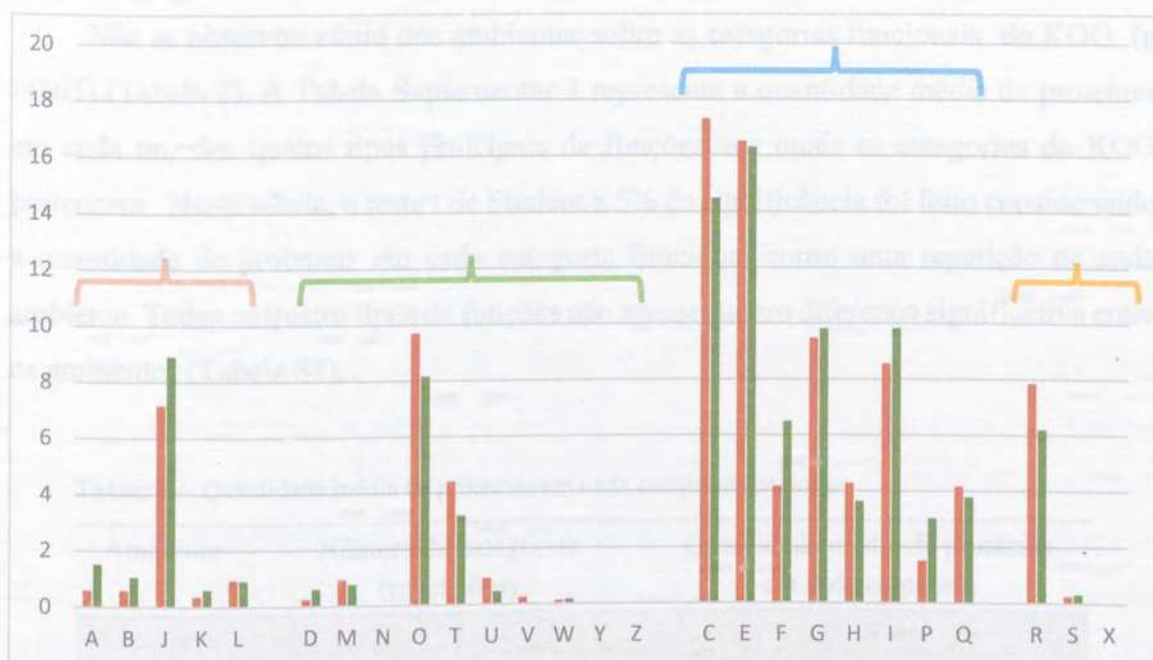


Figura 2 – Classificação das proteínas geradas por sequências codificadoras de origem fúngica em categorias funcionais com base na homologia ao banco de dados KOG. Os valores representam o percentual que cada categoria representa em relação ao total de proteínas para cada ambiente. Legenda das barras: Laranja = Pastagem. Verde = Floresta. Legenda das chaves: Laranja = Proteínas com função no Processamento e Armazenamento de informação; Verde: Proteínas com função na Sinalização e Processos celulares; Azul = Proteínas com função no Metabolismo; Amarelo = Proteínas com função pobremente caracterizadas. Legenda: A = Processamento e modificação de RNA; B= Estrutura e dinâmica da cromatina; C =Produção e conversão de energia; D =Controle do ciclo celular, divisão celular, particionamento do cromossomo; E= Transporte e metabolismo de aminoácidos; F =Transporte e metabolismo de nucleotídeos; G= Transporte e metabolismo de carboidratos; H = Transporte e metabolismo de coenzimas; I = Transporte e metabolismo de lipídios; J = Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos; K= Transcrição; L = Replicação, recombinação e reparo; M= Biogênese de parede celular, membrana e envelope; N = Motilidade celular; O = Modificação pós-traducional, *turnover* de proteína, chaperonas; P= Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; Q = Biossíntese, transporte e metabolismo de metabolitos secundários; R = Predição apenas de funções gerais; S = Funções desconhecidas; T = Mecanismos de transdução de sinal; U = Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; V = Mecanismos de defesa; W = Estruturas extracelulares; X = Proteínas não nomeadas; Y = Estruturas do núcleo; Z = Citoesqueleto.

Não se observou efeito dos ambientes sobre as categorias funcionais do KOG ($p > 0,05$) (Tabela 2). A Tabela Suplementar 3 representa a quantidade média de proteínas em cada um dos quatro tipos principais de funções aos quais as categorias do KOG pertencem. Nesta tabela, o teste t de Student a 5% de significância foi feito considerando a quantidade de proteínas em cada categoria funcional como uma repetição de cada ambiente. Todos os quatro tipos de funções não apresentaram diferença significativa entre os ambientes (Tabela S3).

Tabela 2 – Quantidade média de proteínas em cada categoria funcional

Ambiente	Número de categorias (repetições)	Quantidade média de proteínas em cada categoria
Pastagem	26	33,35 A*
Floresta	26	25,50 A

*Médias acompanhadas de uma mesma letra não apresentam diferença significativa.

As curvas de rarefação obtidas a 30 de Sequent um plano, mostrando observamos uma tendência a saturar no gráfico (Figura 3), que pode ser corroborada pelos valores dos índices de cobertura de Good's, de aproximadamente 95% (Tabela 3). Estes valores representam uma boa cobertura das amostras, ou seja, grande parte das espécies presentes foram amostradas.



Figura 3 – Curvas de rarefação para ambientes de Floresta (Verde) e Pastagem (Laranja)

Uma análise aprofundada na qual se verifiquem as diferenças na composição de proteínas, e não apenas nas categorias funcionais as quais estas proteínas fazem parte, pode elucidar o que difere entre os ambientes. Entretanto, embora as diferenças funcionais tenham sido baixas, a composição de espécies responsáveis por estas funções pode não ser a mesma entre floresta e pastagem, evidenciando a importância da caracterização taxonômica realizada à posteriori.

Pelo sequenciamento da região ITS1 foram obtidas 214.297 *reads* distribuídas entre as duplicatas dos 10 pontos de floresta enviadas para o sequenciamento. Dentre estas, apenas 73.937 *reads* (34,5%) foram classificados em OTUs de algum filo com base em similaridade às sequências do banco de dados UNITE. Cerca de 79.030 (36,9%) foram classificados como fungos não identificados e 61.330 (28,6%) *reads* não tiveram classificação alguma (*unassigned reads*). Para os ambientes de pastagem cerca 220.119 *reads* foram distribuídos entre as amostras, das quais apenas 49.674 (22,6%) foram classificados em algum filo. Cerca de 79.030 (36,9%) foram classificadas como fungos não identificados e 74.816 (34,0%) *reads* não tiveram classificação (*unassigned reads*).

As curvas de rarefação obtidas não definiram um platô, entretanto observamos uma tendência à sua formação (Figura 3), que pode ser corroborada pelos valores dos índices de cobertura de Good's, de aproximadamente 99% (Tabela 3). Estes valores, representam uma boa cobertura dos ambientes, ou seja, grande parte das espécies presentes foram amostradas.



Figura 3- Curva de rarefação para ambientes de Floresta (Verde) e Pastagem (Laranja)

Tabela 3- Índice de cobertura de Good's

Ambiente	Número de amostras	Good's (média)
Floresta	20	0,99358 (99%) A*
Pastagem	20	0,98617 (~99%) A

*Índices acompanhados de mesma letra não apresentam diferença significativa a % de significância pelo teste t de Student.

Com o objetivo de se realizar inferências ecológicas acerca dos ambientes aqui estudados, apenas as sequências classificadas em algum filo foram utilizadas. Dentre os filos encontrados, Ascomycota foi o mais abundante constituindo cerca de 95,77% das sequências das áreas de pastagem e 74,29% das áreas de floresta (Figuras 4).

Diferenças na ocorrência de fungos fitopatogênicos e biocontroladores (*Trichoderma*), pertencentes a este filo, entre os ambientes, foram observadas. Foram encontrados anamorfos *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium* e o teleomorfo *Diaporthe* que faz parte do complexo *Diaphorte-Phomopsis* (ALMEIDA; MENEGHEL; SOJA, 2003), cujo anamórfico *Phomopsis* já foi descrito em Rondônia (FERNANDES et al., 2007). Somando-se os percentuais de incidência de cada um desses gêneros de fungos fitopatogênicos, eles representam cerca de 0,30% e 9,95% do total de fungos identificados encontrados na floresta e na pastagem, respectivamente. Estes percentuais apontaram um aumento considerável dos gêneros relacionados a doenças de plantas nas áreas de pastagem. Em contrapartida, nas regiões de floresta há uma incidência muito maior de *Trichoderma* (9,19%) do que na pastagem (1,19%) em relação ao total de fungos classificados (Figura 5).

Os percentuais de incidência de Basidiomycota foram baixos em ambas as áreas, representando 1,89% na floresta e 3,82% na pastagem. Os filos Zygomycota e Glomeromycota apresentaram tendências inversas. O primeiro esteve presente majoritariamente na floresta representando 24,22% das sequências desta área e 0,35% das sequências de pastagem, ao passo que Glomeromycota, embora em menor número, foi encontrado apenas na pastagem correspondendo a cerca de 0,07% do total de sequências identificadas (Figura 4).

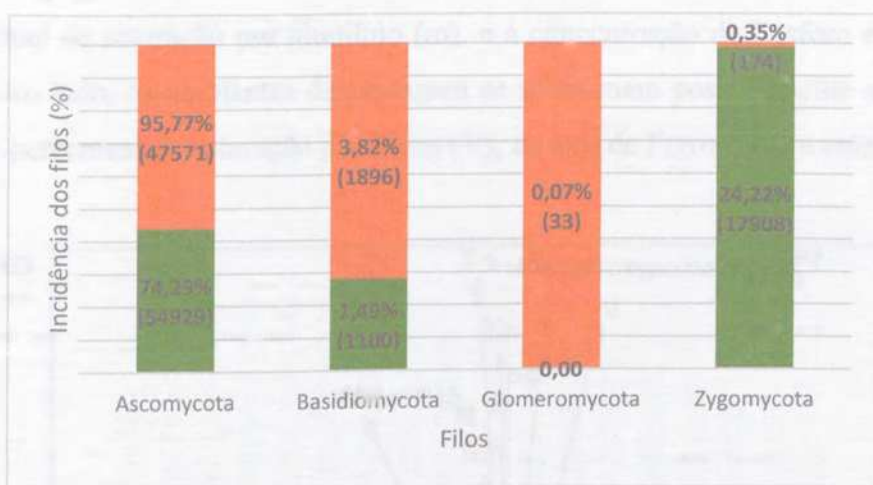


Figura 4 - Percentuais de incidência e quantidade de sequências (parênteses) dos filos nas regiões de pastagem e floresta, considerando apenas as sequências identificadas. Legenda: Laranja = Pastagem; Verde = Floresta.

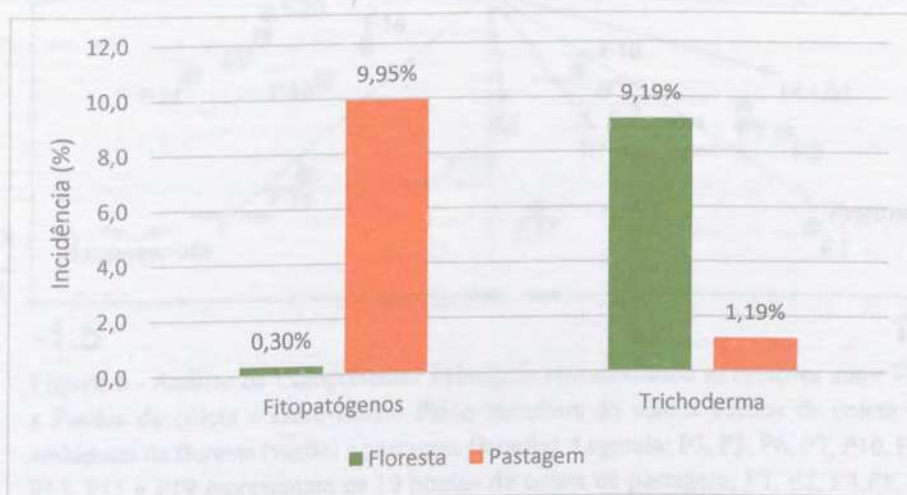


Figura 5 - Percentuais de incidência de fungos com potencial de serem fitopatogênicos (*Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Diaporthe*) e *Trichoderma* em solos sob floresta e pastagem.

A Análise de Componentes Principais (PCA) representou a relação dos ambientes com as características físico-químicas do solo e a composição de filos. De modo geral, amostras dos dois ambientes estiveram relacionadas ao filo Ascomycota, mais abundante em ambos. Basidiomycota, presente em baixa abundância em ambos ambientes, mas maior na pastagem, apresentou relação mais forte com alguns pontos deste local. Entretanto os resultados apontaram uma forte relação entre o filo Zygomycota e os pontos de floresta, e entre Glomeromycota e os pontos de pastagem (Figura 6).

Em relação aos componentes físico-químicos do solo, a maioria dos pontos de floresta estão relacionadas positivamente à potencial acidez do solo ($H + Al$), ao

percentual de saturação por alumínio (m), e à concentração de Fósforo e de Alumínio. Por outro lado, os ambientes de pastagem se relacionam positivamente ao aumento do pH, ao percentual de saturação por bases (V), ao teor de Ferro, dentre outros (Figura 6).

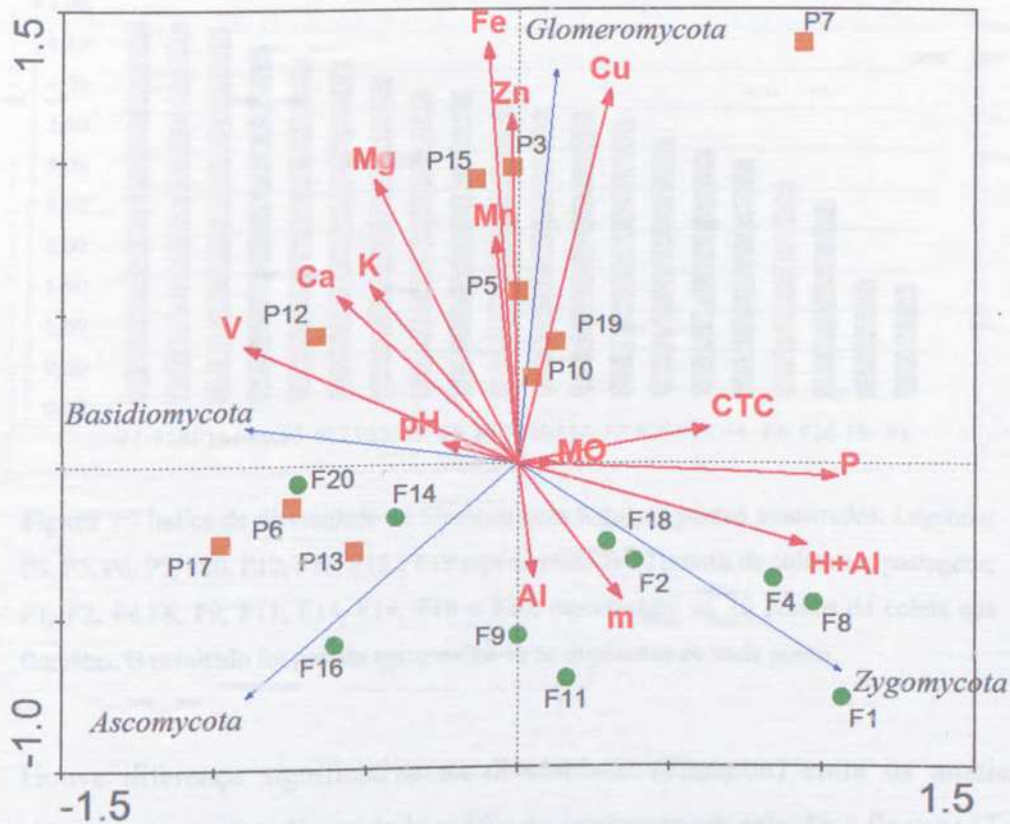


Figura 6 - Análise de Componentes Principais representando as relações entre Filos x Pontos de coleta e entre Dados físico-químicos do solo x Pontos de coleta nos ambientes de floresta (verde) e pastagem (laranja). Legenda: P3, P5, P6, P7, P10, P12, P13, P15 e P19 representam os 10 pontos de coleta na pastagem; F1, F2, F4,F8, F9, F11, F14, F14, F18 e F20, representam os 10 pontos de coleta da floresta. As duplicatas de cada ponto estão agrupadas. Zn, Cu, Fe, Mg, Ca, K, P e Al referem-se à concentração destes elementos no solo; MO refere-se ao conteúdo de matéria orgânica do solo; m representa o percentual de saturação por alumínio e V, o percentual de saturação por bases dos solos e; CTC refere-se ao capacidade de troca catiônica do solo.

De modo geral, a maioria dos pontos de pastagem apresentaram uma maior diversidade do que os pontos de floresta (Figura 7).

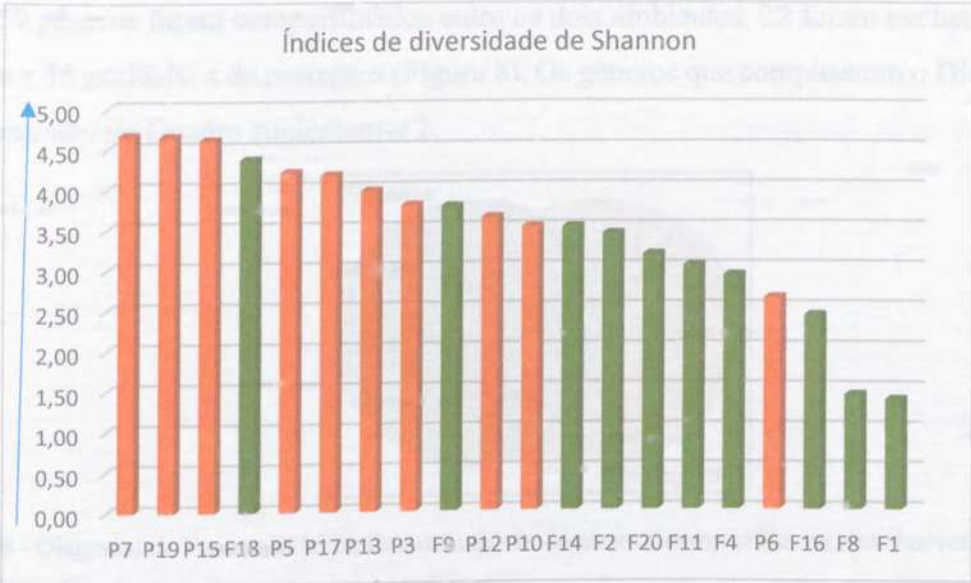


Figura 7 - Índice de diversidade de Shannon para todos os pontos amostrados. Legenda: P3, P5, P6, P7, P10, P12, P13, P15 e P19 representam os 10 pontos de coleta nas pastagens; F1, F2, F4,F8, F9, F11, F14, F18 e F20, representam os 10 pontos de coleta nas florestas. O resultado foi gerado agrupandos-se as duplicatas de cada ponto.

Houve diferença significativa na diversidade (Shannon) entre os ambientes, apontando para uma maior diversidade média na pastagem em relação à floresta (Tabela 4). Alguns outros índices foram apresentados e, exceto o índice de Chao1, todos apresentaram diferença significativa entre os ambientes. A maior equitabilidade e menor dominância na pastagem certamente contribuíram para uma significativa maior diversidade (Shannon) neste ambiente.

Tabela 4 – Índices de diversidade considerando todas as 20 amostras (10 pontos em duplicata) de cada ambiente como uma repetição.

Ambiente	Nº de amostras	Shannon (média)	Chao1 (média)	Equitabilidade (média)	Dominância (média)
Pastagem	20	3,724 A	70,13 A	0,6407 A	0,1636 B
Floresta	20	2,838 B	66,86A	0,4882 B	0,3142 A

* Índices de diversidade acompanhados de letras diferentes apresentam diferença significativa.

Embora não significativamente diferente, como mostrado pelo índice de Chao1, a pastagem apresentou maior riqueza de gêneros (95) em relação a floresta (81). Dentre estes, 59 gêneros foram compartilhados entre os dois ambientes, 22 foram exclusivos de floresta e 36 exclusivos de pastagem (Figura 8). Os gêneros que compuseram o Diagrama de *Venn* estão no Quadro suplementar 2.

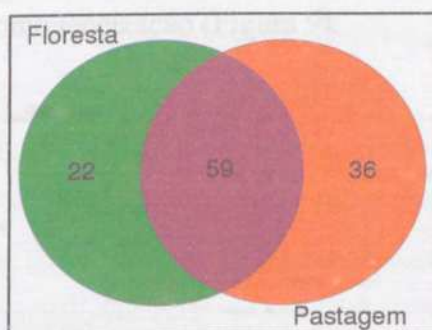


Figura 8 - Diagrama de *Venn* representando a quantidade de gêneros compartilhados e exclusivos de cada ambiente.

Para verificar a dissimilaridade entre os pontos de coleta de cada ambiente e obter informações mais precisas sobre a homogeneização biótica, uma Análise de Componentes Principais foi realizada com uma matriz de dissimilaridade Bray-Curtis (Quadro S3) entre os pontos de coleta. Os resultados mostraram que os pontos de pastagem foram menos dissimilares entre si, e, por isso, compartilham mais espécies, apresentam uma tendência à homogeneização (Figura 9).

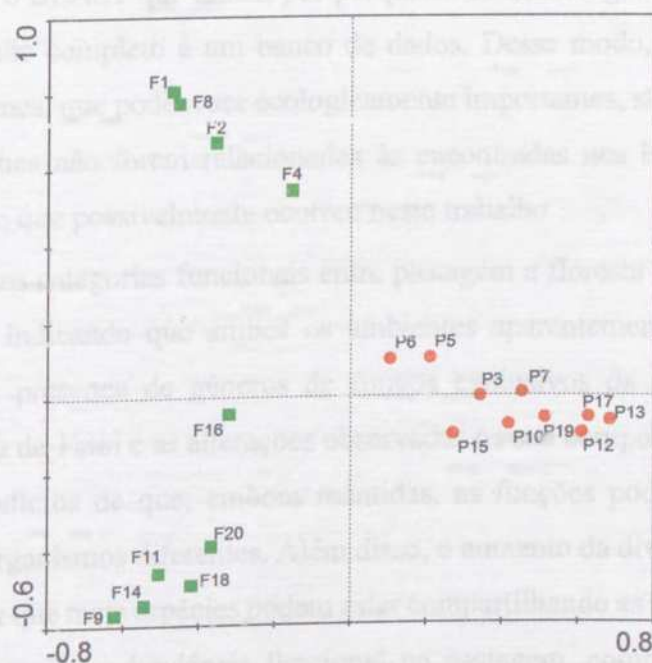


Figura 9- Análise de Componentes Principais (PCA) representando a distribuição de cada ponto de coleta baseada numa matriz de dissimilaridade Bray-Curtis. Os pontos mais próximos entre si apresentam menor dissimilaridade. Legenda: P3, P5, P6, P7, P10, P12, P13, P15 e P19 representam os 10 pontos de coleta na pastagem; F1, F2, F4, F8, F9, F11, F14, F18 e F20, representam os 10 pontos de coleta da floresta. As duplicatas de cada ponto foram agrupadas.

DISCUSSÃO

Apenas cerca de 65% das sequências codificadoras de proteínas de floresta e pastagem foram classificadas em categorias funcionais do KOG. Um dos maiores problemas associados à predição e anotação de genes e a determinação de categorias funcionais aos genes obtidos a partir de sequenciamento metagenômico é a dependência de ferramentas como o BLAST que atuam por pesquisas de homologia e que dependem da qualidade e do quão completo é um banco de dados. Desse modo, as informações contidas em novos genes, que podem ser ecologicamente importantes, são perdidas se as sequências destes genes não forem relacionadas às encontradas nos bancos de dados (SUENAGA, 2012), o que possivelmente ocorreu neste trabalho.

As diferenças nas categorias funcionais entre pastagem e floresta foram pequenas (Tabela 1, Figura 2), indicando que ambos os ambientes aparentemente tiveram suas funções mantidas. A presença de gêneros de fungos exclusivos da pastagem como mostrado no diagrama de *Venn* e as alterações observadas na sua composição de fungos, podem representar indícios de que, embora mantidas, as funções podem estar sendo executadas por microrganismos diferentes. Além disso, o aumento da diversidade alfa na pastagem pode indicar que mais espécies podem estar compartilhando as mesmas funções o que acarreta numa maior redundância funcional na pastagem, como observado por (MENDES et al., 2015a).

Na pastagem houve maior quantidade de proteínas relacionadas a produção e conversão de energia (Categoria C – Tabela 1, Figura 2) e isto pode estar relacionado a maior incidência de organismos estrategistas R neste tipo de ambiente (PEREIRA et al., 2014; LEAL et al., 2009), que apresentam maior velocidade de crescimento e demandam mais energia. Entretanto, de modo geral, as diferenças entre os dois ambientes foram pequenas e, por isso, a análise da composição de proteínas em cada categoria, já em processo, permitirá uma melhor elucidação das diferenças funcionais entre os ambientes.

Os fungos são microrganismos cuja vasta maioria das espécies são desconhecidas (SCHOCH et al., 2012). A quantidade de sequências de fungos não identificados ou sequências não classificadas (*unassigned*), podem corresponder a microrganismos novos ainda não identificados. Uma vez que as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento permitem a obtenção de sequências de uma ampla quantidade de fungos desconhecidos e muitas vezes não cultiváveis, a baixa quantidade de sequências curadas depositadas nos bancos de dados públicos disponíveis, limita a classificação taxonômica

em estudos de biodiversidade, representando um gargalo destes tipos de análise (ORGIAZZI et al., 2013).

Utilizando apenas as sequências classificadas em algum filo para fazer estudos ecológicos, observou-se que o filo Ascomycota apresentou os maiores percentuais de incidência em ambos ambientes. Este corresponde ao maior grupo de fungos e podem ter hábito de vida saprofíticos, endofíticos, simbioses mutualistas em líquens e associações micorrízicas e, também, patógenos biotróficos e necrotróficos de plantas e animais em diversos ambientes (WEBSTER & WEBER, 2007).

Foi observado um maior percentual de incidência de ascomicetos fitopatogênicos, já relatados em Rondônia, na pastagem do que na floresta, ao passo que na floresta houve maior incidência do gênero biocontrolador *Trichoderma* em relação à pastagem. Os organismos que compõem os ecossistemas naturais, normalmente possuem um estado de equilíbrio ou um balanço populacional que se deve, em parte, à presença de inimigos naturais (ELLISON & EVANS, 1996). Nesse sentido, os microrganismos do solo, auxiliam no controle natural de doenças e pragas (MOREIRA et al, 2010). Entretanto, as mudanças ambientais causadas por atividades antrópicas, podem afetar a composição e as funções microbianas (MENDES et al., 2015a), levando à perda deste controle natural e à dominância de certos organismos que se tornam potenciais causadores de danos (ELLISON & EVANS, 1996).

Fungos do gênero *Trichoderma* tem sido os mais amplamente utilizados para o bioncontrole devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antibiótica, exercer competição e parasitismo perante outros fungos, além de serem indutores de resistência em plantas e, promotores do crescimento vegetal (MENDOZA et al., 2015; MACHADO & SILVA, 2013; WALUNJ et al., 2015). Uma possível redução e perda de organismos deste gênero pela conversão de ambientes florestais em pastagem, pode ser uma das explicações para o aumento de organismos com potencial fitopatogênico na pastagem, como foi observado neste trabalho. Um exemplo disso é o gênero *Fusarium*, cuja elevada abundância na pastagem (Figura S1), pode ser reflexo da redução da incidência de *Trichoderma*, já relatado como inibidor *in vitro* do crescimento de *Fusarium* (HOFFMANN et al., 2015; MOHANDAS et al., 2010).

Entretanto, outros fatores como a composição vegetal pode ter influenciado a distribuição destes gêneros e, a elevada incidência de *Fusarium* pode ter relação com o fato de os exudatos liberados pelas raízes de gramínea auxiliarem na quebra da dormência deste fungo (THORNTON, 1960) verificar. Além disso, alguns organismos deste o

gênero, como o *Fusarium culmorum*, são decompositores e podem ser encontrados na superfície e córtex de raízes de gramínea em decomposição, o que pode justificar seu maior percentual na pastagem (THORNTON, 1960).

Vale ressaltar, porém, que nem todos os fungos dos gêneros de Ascomycota mencionados como fitopatogênicos causam doença e nem todas as espécies de *Trichoderma* são biocontroladoras e, por isso, estas inferências são preliminares.

Fracetto et al. (2013), demonstraram que áreas florestais possuem menor diversidade de filos de fungos, predominando Zygomycota, do que áreas de pastagem. Este resultado condiz com o que foi aqui observado, uma vez que os ambientes de Floresta apresentaram menor quantidade de filos e alta incidência de Zygomycota (Figuras 4 e 5). O mesmo foi observado em solos de florestas naturais e de araucária da Austrália, onde houve predominância deste filo, revelando a importância deste filo para aquelas florestas (HE et al., 2005).

A função de Zygomycota nos ambientes florestais certamente está relacionada à ciclagem de matéria orgânica (FRACETTO et al., 2013), como foi observado por Osono et al. (2006), onde a presença de Zygomycota, especialmente do gênero *Umbelopsis*, estava ligada à decomposição da camada de serapilheira de ambientes florestais. No nosso trabalho, *Umbelopsis* foi o gênero mais abundante dentre os Zygomycota e o segundo mais abundante dentre todos os gêneros na floresta, com cerca de 17.864 sequências (24% do total) ao passo que na pastagem apenas apresentou 154 sequências (0,3% do total) (dados não apresentados).

A baixa incidência de organismos do filo Glomeromycota pode ser em função do *primer* e do banco de dados aqui utilizados. Moora et al. (2014) em estudo de diversidade de Glomeromycota em diferentes formas de uso da terra, sugerem a utilização dos pares de *primer* do rRNA da subunidade menor do ribossomo (SSU) NS31 e AML2, uma vez que o sequenciamento desta região fornece um conjunto de dados que pode ser comparado a bancos de dados mais específicos para Glomeromycota. Apesar disso, a ocorrência, mesmo que em baixa quantidade, deste filo apenas em pastagem, pode ter relação com a menor estabilidade e equilíbrio do ambiente.

Pereira et al. (2014) estudando a composição de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) - Glomeromycota de áreas de floresta atlântica e diferentes culturas agrícolas, demonstraram que em áreas preservadas, como florestas, ocorre uma menor diversidade de FMA devido ao fato de haver maior estabilidade do ambiente, menor concorrência por nichos e maior incidência de espécies endêmicas e estrategistas K, que possuem um

hábito de vida mais vegetativo. Em contrapartida, áreas constantemente alteradas, como as áreas sujeitas à rotação de culturas, contêm maior diversidade de FMA devido à intensa modificação do ambiente que estimula a constante geração de propágulos (PEREIRA et al., 2014). Além disso, ambientes alterados contêm espécies mais generalistas (estrategistas R), cujo hábito de vida prevalece à sobrevivência por rápido crescimento e alta taxa de esporulação, ao invés de uma melhor eficiência na interação com o hospedeiro (PEREIRA et al., 2014). Resultado semelhante foi encontrado por Leal et al. (2009) em regiões amazônicas onde uma maior densidade de esporos de FMA foi obtida na pastagem em relação à floresta (LEAL et al., 2009). Estes autores afirmam que o predomínio de espécies de gramíneas altamente micotróficas como *Brachiaria* pode favorecer a maior geração de propágulos nestes ambientes (LEAL et al., 2009). A possível ocorrência de uma maior densidade de esporos na pastagem, pode ter sido um dos fatores que facilitaram a detecção de Glomeromycota neste tipo de ambiente no nosso trabalho.

Essa maior diversidade de FMA encontrada em áreas sobre constante estresse, evidencia que esta associação simbiótica entre fungos e plantas é uma estratégia para a superação dos estresses bióticos e abióticos do solo (PEREIRA et al., 2014). É importante mencionar que, para ambos os trabalhos citados acima (PEREIRA et al., 2014; LEAL et al., 2009), esta análise da diversidade foi feita a partir da contagem de esporos, e o aumento da diversidade de FMA pode ser enviesada pela própria técnica, uma vez que, ambientes como a pastagem, que sofrem constante distúrbios, estimulam maior produção de esporos. Porém, Moora et al. (2014), utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração, também encontraram maior diversidade de FMA em ambientes de pastagem do que na floresta.

O filo Basidiomycota apresentou baixa incidência em ambos os tipos de ambiente estudados, sendo mais abundantes em ambientes de pastagem. Fracetto et al. (2013), demonstraram a presença de Basidiomycota apenas em solos de pastagem da região Amazônica. Entretanto, em estudo realizados por Lauber et al. (2008), houve maior abundância deste filo em ambientes de floresta do que em pastagem e isso é corroborado pelo fato de que muitos fungos basidiomicetos estão associados a decomposição de serapilheira e madeira em ambiente florestais, além de serem patógenos de diferentes espécies arbóreas e formarem associações simbióticas ectomicorrízicas com raízes de árvores de bosques (WEBSTER & WEBER, 2007). Uma análise mais aprofundada em nível de gênero, família, ordem e classe, pode facilitar a compreensão das relações ecológicas deste filo, visto a pequena diferença percentual na incidência de Basidiomycota entre floresta e pastagem. Em adição, a utilização de outros *primers* pode

contribuir para melhores respostas. Lauber et al. (2008) obteve grande quantidade de sequências de Basidiomycota através dos pares EF4 e Fung5 (rRNA 18S).

Os fungos responderam de forma semelhante ao já relatado para bactérias, havendo aumento da diversidade alfa na pastagem e uma possível relação deste aumento com os componentes físico-químicos do solo (Tabela 4, Figura 6 e 7), resultado semelhante ao encontrado por Mueller (2013). Os pontos de floresta, em geral menos diversos, estão mais positivamente relacionados à potencial acidez do solo ($H + Al$), à concentração e ao percentual de saturação por alumínio (m) e à concentração de fósforo (P) (Figura 6). Este padrão se assemelha ao encontrado nos estudos que demonstraram redução da diversidade bacteriana neste tipo de ambientes (MENDES et al., 2015a; RODRIGUES et al., 2013; JESUS et al. 2009). Desse modo, a menor diversidade média na floresta, pode ter relação com a elevação média destes componentes (Tabela S4). De fato, houve uma correlação significativa entre redução da diversidade alfa (índice de Shannon) e aumento da potencial acidez, da concentração e saturação por alumínio e da concentração de fósforo (Figura S2).

Os pontos de pastagem, em geral mais diversos, por sua vez, estavam positivamente relacionados com a concentração de Fe , com o percentual de saturação por bases (V) e com o pH (Figura 6). Portanto, a maior diversidade média neste ambiente, pode ter relação com o aumento médio destes componentes (Tabela S4) e, de fato, é observada uma correlação significativa entre aumento na alfa diversidade (índice de Shannon) e aumento no pH , na saturação por bases e na concentração de Ferro (Figura S3).

A mudança na composição vegetal pode estar influenciando a composição fúngica, porém de modo diferente ao pensado inicialmente. As gramíneas, possuem alta densidade de raízes no solo da pastagem e influenciam continuamente este ambiente que por isso pode ser considerado um solo rizosférico em toda sua extensão (THORNTON, 1960). Isto de algum modo pode ter favorecido o aumento da diversidade de fungos na pastagem.

Os resultados corroboraram a hipótese de que a retirada de espécies vegetais das florestas para formar pastagens poderia levar à homogeneização biótica destes ambientes, reduzindo a dissimilaridade entre diferentes pontos. Uma análise de dissimilaridade pela matriz Bray-curtis gerada pelo QIIME e aplicada no software Canoco mostrou que os pontos de pastagem estão mais agrupados entre si do que os pontos de floresta. Nesta matriz, as comunidades menos dissimilares entre si apresentam índices mais próximos a zero (Quadro S3). Os ambientes de pastagem foram menos dissimilares entre si e isso pode ser indício de uma homogeneização. Como a cobertura vegetal é mais homogênea

na pastagem, uma homogeneização na composição dos fungos nestes ambientes pode ser consequência disso.

Conclui-se que a conversão de floresta para pastagem altera a composição dos filos de fungos, eleva a diversidade alfa, que pode ser influenciada pelas características físico-químicas do solo, em especial o aumento da concentração de Ferro, do percentual de saturação por bases (V), e redução da acidez do solo e, eleva a homogeneização dos ambientes de pastagem, que se tornam menos dissimilares entre si, em comparação à floresta. Diferenças nas categorias funcionais exigem um maior detalhamento das proteínas envolvidas em cada categoria para que sejam elucidadas. A observação das alterações na composição taxonômica e dos dois componentes da diversidade contribuiu para uma melhor compreensão dos efeitos gerados pela ação antrópica em ambientes florestais.

- ALLEN, S. E. How Does Conversion of Natural Tropical Rainforest Ecosystem Affect Soil Microbial Communities? *Microbial Ecology*, v. 52, n. 2, p. 226-238, 2006.
- ALVES, M. J. M.; MATSON, P. A. The influence of tropical plant diversity and land use on soil microbial communities. *Microbial Ecology*, v. 52, n. 2, p. 226-238, 2006.
- CECCILIANI, R. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin, Roraima, Brazilian de Ciência do Solo, v. 33, n. 4, p. 907-916, 2009.
- DA CUNHA, E. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME journal*, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, 2009.
- DE CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agricultural fields. *Archives of microbiology*, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.
- ELLISON, C. A.; EVANS, H. C. Amazon-ingly useful fungi—A biological control candidate? *Mycologist*, v. 10, n. 1, p. 11-13, 1996.
- FERNANDES, C. de F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; DA SILVA, D. S. G. *Fitopatogenos associados a culturas em Ponta Velha, Rondônia*. Empresa Rondônia, Circular Técnica, 2007.
- FERRIRA, M. G. A.; DE SOUZA, M. G.; MENDES, A. M. Levantamento das doenças fúngicas que atacam as principais culturas no Estado de Rondônia. Empresa Rondônia, 2009.
- FRACETTO, G. G. M. et al. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. *Scientia Agricola*, v. 70, n. 2, p. 59-67, 2013a.
- FRACETTO, G. G. M. et al. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. *Scientia Agricola*, v. 70, n. 2, p. 59-67, 2013b.
- HE, J.; XU, Z.; HUGHES, J. Analysis of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rDNA genes. *PNMS Microbiology Letters*, v. 247, n. 1, p. 91-100, 2005.
- HOFFMANN, C. A. et al. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o fungo do *Fusarium* sp. in vitro. Potencial of isolated antagonists of *Trichoderma* against isolated from *Fusarium* sp. in vitro. p. 236-243, 2015.
- KHAILAL, G. B. et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. p. 5271-5277, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALELE, P. O. et al. How Does Conversion of Natural Tropical Rainforest Ecosystems Affect Soil Bacterial and Fungal Communities in the Nile River Watershed of Uganda? **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104818, 2014.
- ALMEIDA, L. M.; MENEGHEL, L.; SOJA, E. Diversidade Genética do Complexo *Diaporthe* / *Phomopsis* em Soja, no Brasil. 2003.
- ARAGÃO, J.L.; PFEIFER, L.F.M.; BORRERO, M.A.V. Ocupação tardia e o desenvolvimento da agropecuária no Estado de Rondônia: Uma história da bovinocultura no desenvolvimento regional* Delayed occupation and the development of agriculture in the state of Rondônia. **Semina-Revista dos Pós-Graduandos em História da UPF**, v. 13, n. 1, 2014.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.
- CARNEY, K. M.; MATSON, P. A. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 226–238, 2006.
- CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 907–916, 2009.
- DA C JESUS, E. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME journal**, v. 3, n. 9, p. 1004–1011, 2009.
- DE CASTRO, A. P. et al. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129–139, 2008.
- ELLISON, C. A.; EVANS, H. C. Amazon-ingly useful fungi—A biological control cornucopia? **Mycologist**, v. 10, n. 1, p. 11–13, 1996.
- FERNANDES, C. de F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; DA SILVA, D. S. G. Fitopatógenos associados a culturas em Porto Velho, Rondônia. **Embrapa Rondônia. Circular Técnica**, 2007
- FERREIRA, M. G. A.; DE SOUZA, M. G.; MENDES, A. M. **Levantamento das doenças fúngicas que atacam as principais culturas no Estado de Rondônia**. Embrapa Rondônia, 2003.
- FRACETTO, G. G. M. et al. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 2, p. 59–67, 2013a.
- FRACETTO, G. G. M. et al. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 2, p. 59–67, 2013b.
- HE, J.; XU, Z.; HUGHES, J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 1, p. 91–100, 2005.
- HOFFMANN, C. A. et al. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro Potential of isolated antagonism of *Trichoderma* against isolated from *Fusarium* sp., in vitro. p. 236–242, 2015.
- KÖLJALG, U. et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. p. 5271–5277, 2013.

- LAUBER, C. L. et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407–2415, 2008.
- LEAL, P. L.; STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the amazon, Brazil. p. 111–121, 2009.
- MACHADO, D. F. M.; SILVA, A. C. F. Trichoderma no controle in vitro de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 182–191, 2013.
- MAGURRAN, Anne E. **Measuring biological diversity**, 2004
- MENDES, L. W. et al. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151–160, 2015b.
- MENDES, L. W. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, p. 255–265, 2015a.
- MENDOZA, J. L. H. et al. Antibiosis of trichoderma spp strains native to Northeastern Mexico against the pathogenic fungus *macrophomina phaseolina*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1093–1101, 2015.
- MOHANDAS, S. et al. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents in managing *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* infection in banana cv. Neypooovan. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 165–181, 2010.
- MOORA, M. et al. Anthropogenic land use shapes the composition and phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 3, p. 609–621, 2014.
- MUELLER, Rebecca. **The Effects of Global Changes on Fungal Communities: Measuring Biodiversity Belowground**. 2013.
- NUNES, D.D. Vulnerabilidade Natural à Erosão da bacia do Rio Mutum-Paraná – Porto Velho-RO (2009-2011). Porto Velho/RO. CNPq (MCT/CNPq/CT-Amazônia), **Relatório de Pesquisa**, 2012. 74p.
- ÖPIK, M. et al. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 223–241, 2010.
- ORGIAZZI, A. et al. 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages From Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome. **Diversity**, v. 5, n. 1, p. 73–98, 2013.
- PEAY, K. G.; BARALOTO, C.; FINE, P. V. A. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. **The ISME journal**, v. 7, n. 9, p. 1852–61, 2013.
- PEREIRA, C. M. R. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Atlantic forest areas under different land uses. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 185, p. 245–252, 2014.
- PROBER, S. M. et al. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. **Ecology Letters**, v. 18, n. 1, p. 85–95, 2015.
- PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity-Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.

- RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 988–93, 2013.
- ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. p. 1340–1351, 2010.
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 1–6, 2012.
- STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255–267, 2011.
- SUENAGA, H. Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 13–22, 2012.
- TATUSOV, R. L. et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC bioinformatics**, v. 4, p. 41, 2003.
- THORNTON, R. H. Fungi of some forest and pasture soils. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 3, n. 4, p. 699–711, 1960.
- WALUNJ, A. A.; ABHANG, P. B.; JOHN, P. In vitro evaluation of mutant and wild strain of *Trichoderma harzianum* against soil borne plant pathogen. v. 8, n. 1, p. 108–111, 2015.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. Cambridge University Press, 2007

MATERIAL SUPLEMENTAR

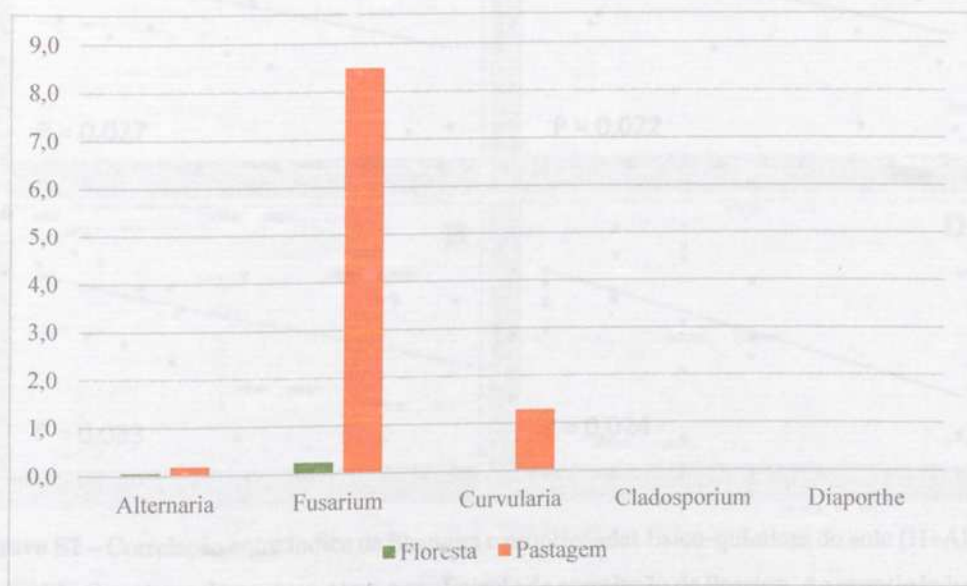


Figura S1 - Percentuais de incidência de Fitopatógenos (*Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Diaporthe*) em relação ao total de fungos.

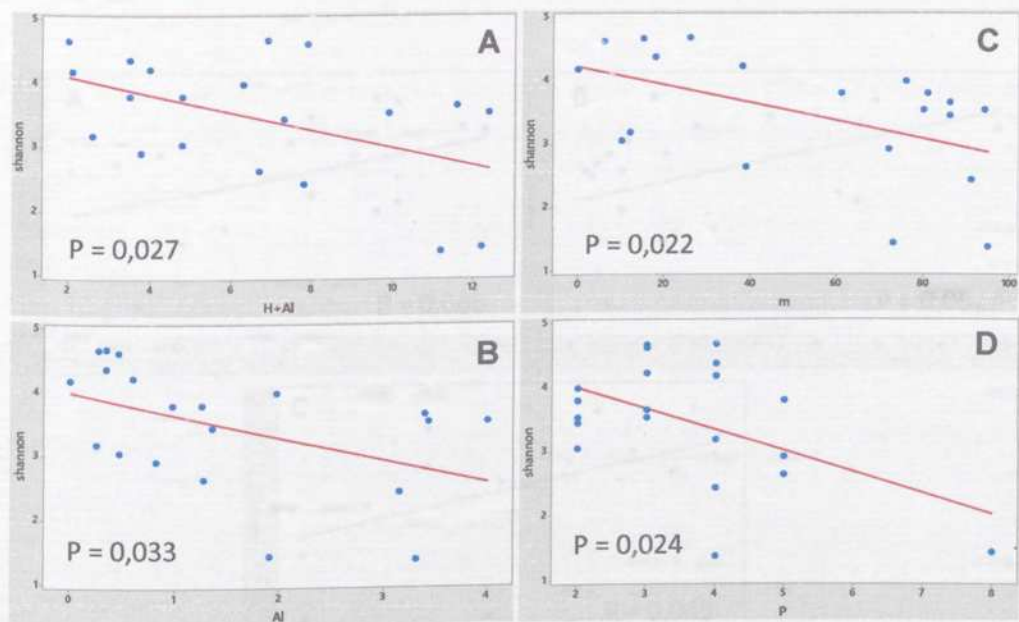


Figura S2 – Correlação entre índice de Shannon e propriedades físico-químicas do solo (H+Al, Al, m, P). Os valores de p representam o coeficiente de correlação de Pearson. As propriedades do solo apresentaram correlação significativa a 10% de significância com o índice de Shannon. Legenda: A) Shannon x H+Al; B) Shannon x Al; C) Shannon x m; D) Shannon x P. Os cálculos e os gráficos foram feitos pelo *software* Minitab (versão v.17.1.0).

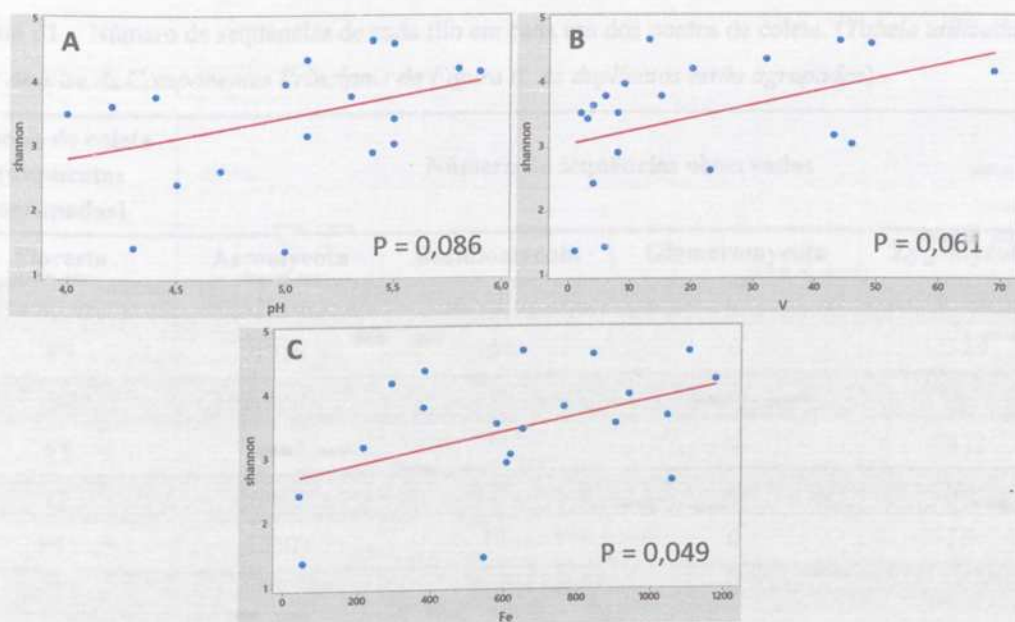


Figura S3 - Correlação entre índice de Shannon e propriedades físico-químicas do solo (pH, V e Fe). Os valores de p representam o coeficiente de correlação de Pearson. As propriedades do solo apresentaram correlação significativa a 10% de significância com o índice de Shannon. Legenda: A) Shannon x pH; B) Shannon x V; C) Shannon x Fe. Os cálculos e os gráficos foram feitos pelo *software* Minitab (versão v.17.1.0)

Tabela S1 - Número de sequências de cada filo em cada um dos pontos de coleta. (Tabela utilizada para fazer Análise de Componentes Principais da Figura 6. As duplicatas estão agrupadas)

Locais de coleta (duplicatas agrupadas)	Número de sequências observadas			
	Floresta	Ascomycota	Basidiomycota	Zygomycota
F1		3918	18	0
F2		1716	258	0
F4		1935	32	0
F8		1487	74	0
F9		6458	110	0
F11		12302	17	0
F14		4190	178	0
F16		15436	122	0
F18		2787	51	0
F20		4700	240	0
Pastagem		Ascomycota	Basidiomycota	Zygomycota
P3		3150	56	8
P5		1174	475	2
P6		4687	457	0
P7		377	39	8
P10		5540	109	4
P12		9512	181	4
P13		8991	59	0
P15		2265	87	5
P17		8816	395	0

Tabela S2 - Características Físico-químicas do solo nos diversos pontos de coleta. (Utilizada para fazer análise de componentes principais da Figura 9.)

Amostra	Cu	Fe	Mn	Zn	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	CTC	m	V
	mg dm ⁻³				Água	g kg ⁻¹	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³						%	
1F	0,08	50,34	1,79	0,92	5	31,2	4	0,11	0	0,05	11,2	3,32	11,39	95	1
2F	0,7	650,48	0,94	0,69	5,5	23,8	2	0,1	0,07	0,05	7,3	1,36	7,5	86	3
4F	0,88	608,08	53,67	2,6	5,4	11,4	5	0,14	0,03	0,16	3,8	0,83	4,14	72	8
8F	0,8	545,17	5,54	1,61	4,3	18,8	8	0,31	0,05	0,35	12,2	1,91	12,96	73	6
3P	0,53	379,76	12,99	1,31	5,3	10,4	2	0,19	0,21	0,22	3,5	0,98	4,09	61	15
5P	3,18	1.178,14	49,79	1,56	5,8	15,8	3	0,22	0,39	0,37	4	0,6	5,03	38	20
6P	4,78	1.060,22	112,04	7,59	4,7	21,3	5	0,31	0,88	0,8	6,7	1,28	8,74	39	23
7P	0,79	651,54	97,89	1,1	5,4	8,9	4	0,1	0,58	0,3	6,9	0,35	7,85	26	13
9F	0,5	764,2	6,3	0,62	4,4	10,7	5	0,09	0,11	0,09	4,8	1,26	5,08	81	6
10P	1,17	905,26	30,81	0,74	4	23,3	2	0,09	0,04	0,14	12,4	4,01	12,64	94	2
11F	2,79	617,42	6,35	0,49	5,5	32,1	2	0,51	2,72	0,88	4,8	0,47	8,89	10	46
12P	0,33	1045,42	3,96	0,65	4,2	23,3	3	0,18	0,22	0,14	11,6	3,4	12,09	86	4
13P	1,07	940,82	2,4	0,49	5	15,5	2	0,09	0,38	0,14	6,3	1,97	6,88	76	9
14F	1,81	579,22	18,63	0,66	4	25,8	3	0,16	0,44	0,28	9,9	3,44	10,78	80	8
15P	1,56	844,74	69,28	1,61	5,5	42,8	3	0,79	4,51	2,33	7,9	0,46	15,55	6	49
16F	0,14	40,07	1,84	0,73	4,5	27,2	4	0,12	0,1	0,08	7,8	3,16	8,06	91	4
17P	1,3	291,71	156,94	7,75	5,9	17	4	0,77	2,49	1,59	2,1	0	6,99	0	69
18F	0,97	381,9	158,92	4,18	5,1	17	4	0,49	0,67	0,49	3,5	0,35	5,11	18	32
19P	1,98	1105,85	37,42	1,9	5,4	13,6	3	0,43	0,74	0,41	2	0,27	3,56	15	44
20F	0,62	216,36	85,11	2,9	5,1	14,1	4	0,23	1,3	0,44	2,6	0,26	4,61	12	43

Tabela S3 - Quantidade média de proteínas em cada tipo de função às quais as categorias do KOG pertencem. A comparação de médias pelo teste t de Student a 5% de significância foi feita considerando a quantidade de proteínas em cada categoria funcional como uma repetição de cada ambiente. As categorias funcionais pertencentes a cada tipo de função estão na tabela 1.

Ambiente	Nº*	Armazenamento e processamento de informações	Nº	Sinalização e processos celulares	Nº	Metabolismo	Nº	Pobremente caracterizadas
Floresta	5	17,2 A**	10	8,80 A	8	55,8 A	3	14,3 A
Pastagem	5	16,6 A	10	14,30 A	8	71,4 A	3	23,3 A

* Número de categorias pertencente ao tipo de função. Cada categoria foi considerada uma repetição para cada ambiente.

**Valores acompanhados pela mesma letra não apresentam diferença significativa.

Tabela S4 – Média do Índice de diversidade de Shannon e das características físico-químicas do solo para Floresta e Pastagem

Ambiente	Shannon (média)	Fe	pH	P	H+Al	Al	V	m
		mg dm ⁻³	Água	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	%	%
Floresta	2,838	445,324	4,88	4,1	6,79	1,636	15,7	61,8
Pastagem	3,724	840,346	5,12	3,1	6,34	1,332	24,8	44,1

Quadro S1 - Coordenadas das amostras coletadas em duas expedições (2014 e 2015). As coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) foram utilizadas na primeira expedição (amostras F1, F2, P3, F4, P5, P6, P7 e F8) e as coordenadas geográficas na segunda (amostras F9, P10, F11, P12, P13, F14, P15, F16, P17, F18, P19 e F20). O Datum SAD 69 (South American Datum – 69) foi utilizado.

Coordenadas					
Amostras	Longitude	Latitude	Ambiente	Ano	Data da coleta
F1	2766195	8932994	Floresta	2014	26/09/14
F2	271592	8930633	Floresta		26/09/14
P3	315245	8889700	Pastagem		26/09/14
F4	315222	8889467	Floresta		26/09/14
P5	300756	8873479	Pastagem		27/09/14
P6	281411	8932601	Pastagem		28/09/14
P7	275081	8930592	Pastagem		28/09/14
F8	300141	8871757	Floresta		28/09/14
F9	64° 51' 40" W	09° 44' 26" S	Floresta	2015	25/09/15
P10	64° 53' 02" W	09° 47' 11" S	Pastagem		25/09/15
F11	65° 05' 24.3" W	09° 48' 01.8" S	Floresta		26/09/15
P12	65° 04' 07.4" W	09° 50' 58.9" S	Pastagem		26/09/15
P13	65° 09' 38.0" W	09° 42' 26.4" S	Pastagem		26/09/15
F14	65° 12' 19.7" W	09° 51' 50.3" S	Floresta		27/09/15
P15	65° 12' 14.8" W	09° 52' 03.9" S	Pastagem		27/09/15
F16	65° 21' 19.7" W	09° 42' 18.8" S	Floresta		27/09/15
P17	64° 49' 25.7" W	09° 58' 30" S	Pastagem		02/10/15
F18	64° 49' 18.2" W	09° 58' 23.5" S	Floresta		02/10/15
P19	64° 44' 28" W	10° 20' 20.1" S	Pastagem		02/10/15
F20	64° 43' 55.1" W	10° 20' 58.5" S	Floresta		02/10/15

Quadro S2 – Filos compartilhados entre e exclusivos de floresta e pastagem.

	Total	Gêneros
Floresta +Pastagem (gêneros compartilhados)	59	<i>Acremonium</i> , <i>Dactylella</i> , <i>Cinereomyces</i> , <i>Acephala</i> , <i>Pichia</i> , <i>Umbelopsis</i> , <i>Arthrographis</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Veronaea</i> , <i>Mariannaea</i> , <i>Polyporus</i> , <i>Cyphellophora</i> , <i>Lysurus</i> , <i>Schizophyllum</i> , <i>Fonsecaea</i> , <i>Ceratocystis</i> , <i>Talaromyces</i> , <i>Hypocrea</i> , <i>Vertexicola</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Cosmospora</i> , <i>Axiaria</i> , <i>Arthrobotrys</i> , <i>Ganoascus</i> , <i>Cladospodium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Westerdykella</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Massarina</i> , <i>Cladophialophora</i> , <i>Phoma</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Scytalidium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Gelasinospora</i> , <i>Microsphaeropsis</i> , <i>Pseudallescheria</i> , <i>Sporidiobolus</i> , <i>Basidiobolus</i> , <i>Candelabrochaete</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Rhodospiridium</i> , <i>Asteromella</i> , <i>Tomophagus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Gibberella</i> , <i>Cordyceps</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Farapneospira</i> , <i>Wittiporia</i> , <i>Axiogone</i> , <i>Ferreniporia</i> , <i>Bionectria</i> , <i>Coriolopsis</i> , <i>Aspergillus</i>
Gêneros exclusivos da Floresta	22	<i>Wickerhamomyces</i> , <i>Mycena</i> , <i>Taeniolella</i> , <i>Arthrimum</i> , <i>Pseudeurotium</i> , <i>Candida</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Cladorrhinum</i> , <i>Sporothrix</i> , <i>Brycekendrickomyces</i> , <i>Diaporthe</i> , <i>Pilidiella</i> , <i>Chloridium</i> , <i>Dictyosporium</i> , <i>Curvuladum</i> , <i>Gloeotinia</i> , <i>Sugiyamaella</i> , <i>Endomelanconiopsis</i> , <i>Lauriomyces</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Pseudofusicoccum</i> , <i>Lecanicillium</i>
Gêneros exclusivos da Pastagem	36	<i>Corynespora</i> , <i>Dactylella</i> , <i>Trichoglossum</i> , <i>Sordaria</i> , <i>Elaphocordyceps</i> , <i>Ambispora</i> , <i>Periconia</i> , <i>Triplosphaeria</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Sakaguchia</i> , <i>Apiosordaria</i> , <i>Podospira</i> , <i>Xylomyces</i> , <i>Gaeumannomyces</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Glomerobolus</i> , <i>Tetraplospira</i> , <i>Chaetosartoria</i> , <i>Dokmaia</i> , <i>Pisolithus</i> , <i>Microdiplodia</i> , <i>Leptodiscella</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Ceratobasidium</i> , <i>Helicoma</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Edenia</i> , <i>Hypoxylon</i> , <i>Dinemasporium</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Geosmithia</i> , <i>Myrmecridium</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Asterostroma</i>

Quadro S3- Matriz de dissimilaridade Bray-Curtis. Pontos totalmente similares entre si, ou seja, que compartilham todos gêneros encontrados, apresentam índice = 0. Pontos totalmente dissimilares entre si, ou seja, que não compartilham nenhum gênero, apresentam índice = 1.

	P3	P2	F4	P7	P5	FR	P9	P13	F18	F1	P10	P6	P12	F20	P15	P17	P19	F11	F16	F14
P3	0	0,5540	0,5540	0,8920	0,8667	0,9908	0,9839	0,8437	0,9264	1	0,8736	0,8782	0,8483	0,9724	0,9080	0,8046	0,8345	0,9862	0,9977	0,9839
P2	0,5540	0	0,7287	0,9701	0,9425	0,5885	0,9149	0,9540	0,9425	0,5632	0,9747	0,9448	0,9310	0,9701	0,9747	0,9977	0,9425	0,9379	0,9448	0,9678
F4	0,5540	0,7287	0	0,9080	0,8897	0,7402	0,9724	0,9494	0,9494	0,7494	0,9517	0,9632	0,9494	0,9816	0,8989	0,9563	0,9425	0,9883	0,9977	0,9839
P7	0,8920	0,9701	0,9080	0	0,9057	0,9839	0,9931	0,7333	0,9425	1	0,9149	0,9402	0,7218	0,9883	0,8920	0,7862	0,8345	0,9883	0,9954	0,9862
P5	0,8667	0,9425	0,8897	0,9057	0	0,9931	0,9908	0,9011	0,9747	1	0,9034	0,8345	0,9540	0,9747	0,9333	0,9678	0,7724	0,9931	0,9977	0,9977
FR	0,9908	0,5885	0,7402	0,9839	0,9931	0	0,9333	0,9885	0,9379	0,9011	0,9793	0,9908	0,9793	0,9793	0,9747	1	0,9839	0,9517	0,9770	0,9517
P9	0,9839	0,9149	0,9724	0,9931	0,9908	0,9333	0	0,5678	0,9931	0,9517	0,9747	0,9977	0,9241	0,6713	0,9402	0,9977	0,9586	0,6667	0,7793	0,5103
P13	0,8437	0,9540	0,9494	0,7333	0,9011	0,9885	0,9678	0	0,9448	0,9908	0,7885	0,9517	0,4736	0,9862	0,8621	0,6437	0,7193	0,9839	0,9747	0,9793
F18	0,9264	0,9425	0,9494	0,9425	0,9747	0,9379	0,9931	0,9448	0	0,9885	0,9287	0,9862	0,9149	0,7011	0,9057	0,9678	0,9195	0,7609	0,9034	0,7264
F1	1	0,5632	0,7494	1	1	0,3011	0,9517	0,9908	0,9885	0	0,9977	1	0,9747	0,9883	1	1	0,9908	0,9770	0,7862	0,9793
P10	0,8736	0,9747	0,9517	0,9149	0,9034	0,9793	0,9747	0,7885	0,9287	0,9977	0	0,9747	0,8322	0,9563	0,7425	0,7494	0,7724	0,9678	0,9816	0,9563
P6	0,8782	0,9448	0,9632	0,9402	0,8345	0,9908	0,9977	0,9517	0,9862	1	0,9747	0	0,9517	0,9883	0,8586	0,9793	0,8966	0,9954	1	0,9931
P12	0,8483	0,9310	0,9494	0,7218	0,9540	0,9793	0,9241	0,4736	0,9149	0,9747	0,8322	0,9517	0	0,9563	0,8299	0,6329	0,7563	0,9540	0,9287	0,9494
F20	0,9724	0,9701	0,9816	0,9885	0,9747	0,9793	0,6713	0,9862	0,7011	0,9885	0,9563	0,9885	0,9563	0	0,9241	0,9839	0,9540	0,8598	0,9425	0,8575
P15	0,9080	0,9747	0,8989	0,8920	0,9311	0,9747	0,9402	0,8621	0,9057	1	0,7425	0,9586	0,8299	0,9241	0	0,8667	0,7931	0,9402	0,9793	0,9241
P17	0,8046	0,9977	0,9563	0,7862	0,9678	1	0,9977	0,6437	0,9678	1	0,7494	0,9793	0,6529	0,9839	0,8667	0	0,7770	1	1	0,9931
P19	0,8345	0,9425	0,9425	0,8345	0,7724	0,9839	0,9586	0,7193	0,9195	0,9908	0,7724	0,8966	0,7563	0,9540	0,7931	0,7770	0	0,9701	0,9609	0,9563
F11	0,9862	0,9379	0,9883	0,9883	0,9931	0,9517	0,6667	0,9839	0,7609	0,9770	0,9678	0,9954	0,9540	0,8598	0,9402	1	0,9701	0	0,8989	0,5632
F16	0,9977	0,9448	0,9977	0,9954	0,9977	0,9770	0,7793	0,9747	0,9034	0,7862	0,9816	1	0,9287	0,9425	0,9793	1	0,9609	0,8989	0	0,8897
F14	0,9839	0,9678	0,9839	0,9862	0,9977	0,9517	0,5103	0,9793	0,7264	0,9793	0,9563	0,9931	0,9494	0,8575	0,9241	0,9931	0,9563	0,5632	0,8897	0

RESUMO

CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva, MS, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016.
Capítulo 2: Potencial de fungos isolados de solos da Bacia Amazônica para o biocontrole de fitopatógenos. Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

A cultura da bananeira e do morangueiro possuem elevada importância socioeconômica no Brasil. Entretanto, estas culturas podem ser afetadas por fungos fitopatogênicos, dentre eles *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc), agente causal do mal-do-Panamá na cultura da bananeira e, *Botrytis cinera* e *Colletotrichum acutatum*, causadores do mofo cinzento e antracnose, respectivamente no morangueiro. A escassez de métodos de controle menos danosos ao ambiente e de cultivares resistentes, levam a aplicação de fungicidas que podem causar danos ambientais, à saúde do homem, além da seleção de indivíduos resistentes na população. . Neste contexto, a prospecção de microrganismos representa um importante aspecto para a obtenção de novos biocontroladores de doenças e pragas agrícolas e florestais. Com o avanço da pecuária sobre as áreas das bacias hidrográficas do Rio Mutum-Paraná-RO, está ocorrendo uma conversão da floresta ombrófila aberta em áreas de pastagem. A alteração da microbiota acarretada por este processo pode levar à perda de recursos biológicos com potencial biotecnológico. Com o objetivo de isolar fungos aptos para o biocontrole de doenças, amostras de solo de regiões de pastagem e floresta do entorno da bacia do Rio Mutum-Paraná-RO, foram submetidas ao processo de diluição seriada e plaqueamento em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de antibiótico cloranfenicol e meio de Martin contendo estreptomicina. Um total de 74 isolados foram obtidos e submetidos a ensaios de cultura dupla *in vitro* frente a *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc), *B. cinera* e *C. acutatum*. Para tanto, placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram inoculadas, em um lado, com um disco de micélio do fitopatógeno e, no lado oposto, com um disco de micélio ou 5 µL de uma solução de esporos do isolado fúngico a ser avaliado. Observou-se que 23 isolados (31%) apresentaram potencial antagonista *in vitro* a pelo menos um dos fitopatógenos. Os percentuais de inibição de crescimento chegaram a cerca de 63% para *F. oxysporum*, 56% para *B. cinerea* e 64% para *C. acutatum*. Dentre as interações observadas, foram detectados isolados capazes de realizar antibiose e uma melhor competição por substrato perante os três fitopatógenos, sendo que, em alguns casos, o crescimento micelial do isolado sobre o fitopatógeno despertou atenção para um possível hiperparasitismo.

Indicativos da possível utilização destes isolados e dos seus metabólitos para o biocontrole de importantes fungos causadores de doença em bananeira e morangueiro, foram visualizados.

Abstract: The present work, 35th National Science Forum, July, 2010, Chapter 3: Potential of fungi isolated from the Amazon basin soils for the biocontrol of plant pathogens. Advisor: Cynthia Caribé da Silva, Co-Advisor: Maria Celestina Magaldi Kacava.

The banana and strawberry crops are highly economically important in Brazil. However, the plant pathogenic fungi, including *Fusicladium caryophylli* Esp. cubense (Foc), which causes Panama disease in banana and *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acrothecium*, which causes gray mold and anthracnose in strawberry, respectively, can affect the crops. The scarcity of more environmentally friendly practices and economic solutions leads to the use of pesticides that can cause environmental and human damage and select resistant microorganisms. In this context, the use of natural antagonists is an important aspect towards the elimination of pesticides in modern systems of agriculture and forestry diseases. The advancement of livestock in areas of the hydrographic basin of Mutum-Parna River in Roraima, is leading to the conversion of the open wilderness forest into pasture areas. The attraction of the microorganisms by the livestock can lead to loss of biological resources with great biotechnological potential. To verify if isolates fungi able to biocontrol of diseases, soil samples from forest and pasture areas surrounding the Mutum-Parna river basin were subjected to serial dilution and plating in Potato Dextrose Agar (PDA) medium plus antibiotic chloramphenicol and Maltin medium with streptomycin. Subsequently, aimed at screening for antagonistic fungi, 74 obtained isolates, under great in vitro double culture assays against strains *Fusicladium caryophylli* Esp. cubense, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acrothecium*. Therefore, Petri dishes containing PDA culture medium were inoculated at one side with a pathogen mycelial disc and, at the opposite side, with a mycelium disc or 5 µl of sporulation of the fungus isolate to be evaluated. It was observed that Twenty-three isolates (31%) had antagonistic potential to at least one of the plant pathogens. The percentage of growth inhibition reached 63% for Foc, 56% for *B. cinerea* e 64% for *C. acrothecium*. Among the observed interactions, it has been detected isolates capable of carrying out the antibiotic and competition for substrate against the pathogen, and, in some cases, the mycelial growth of the isolate above the phytopathogen called attraction for a possible hyperparasitism. Thereby, these results show that initial indicative of the potential use of these isolates and their metabolites for the biocontrol of phytopathogenic fungi of banana and strawberry crops, could be visualized.

ABSTRACT

CERQUEIRA, Alan Emanuel Silva, MS, Universidade Federal de Viçosa, July, 2016.
Chapter 2: Potential of fungi isolated from the Amazon basin soils for the biocontrol of plant pathogens. Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisor: Maria Catarina Megumi Kasuya.

The banana and strawberry crops are highly socioeconomic important in Brazil. However, plant pathogenic fungi, including *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc), which causes Panama disease in banana and, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*, which causes gray mold and anthracnose in strawberry crop, respectively, can affect these crops. The scarcity of more environmentally friendly practices and resistant cultivars brings to the use of pesticides that can cause environment and human damage and select resistant microorganisms. In this context, the prospection of microorganisms is an important aspect towards the obtention of potential biocontrol agents of agricultural and forestry diseases. The advancement of livestock on areas of the hydrographic basin of Mutum-Paraná River in Rondônia, is leading to the conversion of the open ombrophilous forest into pasture areas. The alteration of the microbiota by this process can lead to loss of biological resources with great biotechnological potential. In order to isolate fungi able to biocontrol of diseases, soil samples from forest and pasture areas surrounding the Mutum-Paraná river basin were subjected to serial dilution and plating at Potato Dextrose Agar (PDA) medium plus antibiotic chloramphenicol and Martin medium with streptomycin. Subsequently, aimed at screening for antagonists fungi, 74 obtained isolates, underwent *in vitro* double culture assays against frente *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*. Therefore, Petri dishes containing PDA culture medium were inoculated at one side with a pathogen mycelial disc and, at the opposite side, with a mycelium disc or 5 µL of spore solution of the fungal isolate to be evaluated. It was observed that Twenty-three isolates (31%) had antagonistic potential to at least one of the plant pathogens. The percentage of growth inhibition reached 63% for Foc, 56% for *B. cinerea* e 64% for *C. acutatum*. Among the observed interactions, it has been detected isolates capable of carrying out the antibiosis and competition for substrate against the pathogens, and, in some cases, the mycelial growth of the isolate above the phytopathogen called attention for a possible hiperparasitism. Thereby, these results show that initial indicative of the potential use of these isolates and their metabolites for the biocontrol of phytopathogenic fungi of banana and strawberry crops, could be visualized.

INTRODUÇÃO

O controle biológico está relacionado à utilização de microrganismos não patogênicos de ocorrência natural, com capacidade de reduzir os efeitos danosos de patógenos sobre as plantas, contribuindo para a supressão da doença (ZIVKOVIC et al., 2010). Diversas pesquisas têm explorado o potencial biotecnológico dos microrganismos do solo desde a promoção do crescimento vegetal até o biocontrole (NABTI et al., 2014; EL-BENDARY; HAMED; MOHARAM, 2016; TOUMATIA et al., 2016).

Estudos realizados *in vitro* têm sido feitos com o objetivo de obter fungos filamentosos potenciais biocontroladores de fitopatógenos (PLOETZ, 2015). Os fungos são microrganismos que podem atuar como agentes biocontroladores de diferentes formas, seja através da antibiose (PAN et al., 2016), pela competição por substrato (ZIVKOVIC et al., 2010) e por meio do hiperparasitismo (LOUZADA et al., 2009).

A antibiose é um tipo de interação na qual metabólitos sintetizados por um organismo, podem causar danos sobre outro organismo (MACHADO; SILVA, 2013). Muito microrganismos são capazes de produzir compostos com atividade antibiótica perante fitopatógenos alvo *in vivo* e ou *in situ*, a exemplo da gliotoxina produzida por *Trichoderma virens* capaz de inibir o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. (PAL; MC SPADDEN GARDENER, 2006). Além disso, os microrganismos podem secretar ou excretar enzimas líticas que hidrolisam polímeros como quitina, proteínas, DNA etc, e podem suprimir as atividades de fitopatógenos através de danos às paredes celulares.

A competição constitui um mecanismo clássico de biocontrole, uma vez que os organismos competem entre si por nutrientes, água, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, luz etc (MACHADO; SILVA, 2013). Numa perspectiva microbiana, os solos e as superfícies das plantas são locais com quantidade limitada de nutrientes e, portanto, quanto mais efetivo for um microrganismo na obtenção de recursos, mais fácil ele colonizará estes ambientes (PAL; MC SPADDEN GARDENER, 2006).

A produção de banana é uma atividade com grande importância econômica no Brasil, ocupando a 11ª posição no *ranking* dos principais produtos agrícolas Brasileiros, sendo a maior produção entre as frutíferas (IBGE, 2013). Esta cultura pode ser afetada por agentes causadores de doenças, dentre eles o *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc), agente causal do mal-do-Panamá (YANG et al., 2015), doença responsável pelas maiores perdas econômicas mundiais desta cultura (GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2012). No Brasil, vem se tornando um grave problema uma vez que, na

maioria dos casos, as cultivares plantadas são susceptíveis à doença (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009).

Este fungo age através da infecção das raízes e oclusão dos vasos condutores (xilema) das plantas levando à uma descoloração pardo-avermelhada do rizoma e do pseudocaule e a uma murcha severa (LI et al., 2011). De modo geral, as medidas para o controle da doença estão relacionadas à prevenção, como por exemplo, a utilização de material de propagação livre de patógenos (como os de cultura de tecidos) e a plantação em áreas inócuas e sem incidência histórica da doença (PLOETZ, 2006). Além disso, alterações no solo por meio de fertilizantes visando a mudança do pH do ambiente e manutenção mais próximo à neutralidade, podem reduzir a sobrevivência do Foc (WANG et al., 2012; FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009).

Entretanto, poucas medidas existem no combate ao patógeno após seu estabelecimento e, visto à capacidade de Foc formar estruturas de resistência, clamidósporos, que sobrevivem na ausência do hospedeiro durante décadas no solo (MA, 2014; ZHUANG et al., 2015; BORGES et al., 2009) recomenda-se a erradicação das plantas doentes, por meio de uso herbicidas, para evitar a propagação de fontes de inóculo do patógeno para outras áreas de cultivo (FANCELLI, 2003; CORDEIRO, 2007; BORGES et al., 2009). Desse modo, o estímulo à busca de métodos de controle biológico de *Fusarium oxysporum* é vigente antes mesmo do surgimento da preocupação com as questões ambientais (FRAVEL et al., 2003).

A cultura do morangueiro também tem ampla importância econômica e social uma vez que é realizada predominantemente em pequenas propriedades rurais, através da mão de obra familiar (CAMARGO et al., 2008). Porém, assim como para a banana, o cultivo morango pode ser afetado por diversos agentes fitopatogênicos, e isso contribui para que a produção seja difícil, onerosa e necessite de medidas de manejo e controle de doenças (EMBRAPA, 2008). Dentre as principais doenças que afetam os frutos do morango, estão o mofo cinzento, ocasionado pelo fungo *Botrytis cinerea* que afeta o morango desde o campo até após a colheita (COTA et al., 2008) e a antracnose, causada por *Colletotrichum acutatum* (FREEMAN, 2008).

Botrytis cinerea é um organismo necrotrófico cujos conídios são transportados pelo ar que age produzindo uma série de enzimas, como a quitinase, capazes de degradar a parede celular dos vegetais (WILLIAMSON et al., 2007), além de liberarem metabólitos fitotóxicos (CHOQUER et al., 2007). Este fungo cosmopolita, apresenta polifagia e capacidade de ocasionar epidemias rápidas e severas sendo, assim, difícil de ser

controlado. Além disso, é capaz de formar estruturas de resistência denominadas escleródios, quando não associado a hospedeiros (MORANDI; MAFFIA, 2005).

Embora as execuções de práticas sanitárias, como a remoção de restos culturais infectados, auxiliem na prevenção à contaminação de plantas saudáveis pelos patógenos (MORANDI; MAFFIA, 2005), a ausência de variedades de morango totalmente resistentes à *Botrytis cinerea* (ANTUNES; DUARTE FILHO, 2005), fazem com que o controle do mofo cinzento seja feito majoritariamente através do uso de fungicidas (OSHIMA et al., 2002). Entretanto, há algum tempo tem se buscado novas medidas de controle de *Botrytis cinerea* visto a alta frequência de populações de indivíduos resistentes (OSHIMA et al., 2002).

Colletotrichum acutatum é um fungo fitopatogênico que ataca muitos hospedeiros, podendo causar perdas de rendimento em diversas culturas, com destaque para a cultura do morango (JÍLKOVÁ et al., 2015). Fungos deste gênero, possuem uma estratégia de infecção dividida em diversos estágios. Inicialmente o fungo forma apressório que penetra a superfície do hospedeiro combinando força e degradação enzimática. Em seguida, hifas biotróficas envolvidas pela membrana plasmática das células do hospedeiro passam a habitar o interior de células da epiderme e por fim, o fungo se torna necrotrófico pela diferenciação em hifas finas com crescimento rápido que destroem os tecidos da planta (O'CONNELL et al., 2012). A maioria dos órgãos da planta são afetadas por *Colletotrichum acutatum* e colapsam devido à podridão causada por este fungo (FREEMAN, 2008).

A presença deste fungo em plantas não consideradas hospedeiras, incluindo ervas daninhas e plantas cultivadas sem sintomas da doença, favorece a permanência deste patógeno entre as estações e serve como fonte de inóculo para a infecção do morango. Entretanto, ao contrário do *B. cinerea*, *C. acutatum* não tem estruturas de dormência específicas observadas, indicando que este fitopatógeno não se comporta como um típico fungo do solo (FREEMAN, 2008).

As medidas de controle mais efetivas de doenças causadas por *Colletotrichum* estão relacionadas ao controle cultural, utilização de cultivares resistentes e controle químico (LANDUM et al., 2016; ZIVKOVIC et al., 2010). O controle cultural, embora reduza os níveis de inóculo, não são suficientes para o combate a *C. acutatum*, sendo apenas efetivo quando aplicado em controle integrado. Além disso, linhagens resistentes/tolerantes aos patógenos não estão disponíveis para todas as culturas e a sua aplicação é cara. A medida mais utilizada para o controle de *Colletotrichum* é a utilização de fungicidas que atenuam

a severidade das doenças, mas precisam ser continuamente aplicados (LANDUM et al., 2016). Esta aplicação, entretanto, pode levar a resistência de *C. acutatum* a certos compostos, como já foi relatado por Peres (2004).

Apesar de contribuírem para o surgimento de indivíduos resistentes na população, além de problemas associados à contaminação do meio ambiente, consumidores e trabalhadores e, para a elevação do custo de produção (ZHUANG et al., 2015; WILLIAMSON et al., 2007; COTA et al., 2008; ZIVKOVIC et al., 2010; UGOLINI et al., 2014), a utilização de fungicidas tende a se estender até que alternativas viáveis para o controle sejam obtidas (HAN et al., 2015). Portanto, o controle biológico através de microrganismos antagonistas desponta como uma alternativa mais ambientalmente sustentável para o controle de patógenos de planta (HAN et al., 2015).

O controle biológico de Foc pela inoculação de microrganismos isolados de solos supressivos tem sido apontado como alternativas ao controle químico (WANG et al., 2012). Algumas formulações de agentes de controle biológico incluindo algumas bactérias, leveduras e fungos filamentosos como o *Thichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*) e *Ulocladium oudemansii* tiveram potencial para o controle de *Botrytis* (WILLIAMSON et al., 2007). Em adição, o controle *in vitro* de *C. acutatum* também já foi demonstrado (LANDUM et al., 2016; ZIVKOVIC et al., 2010).

A diversidade microbiana brasileira ainda é muito desconhecida (PYLRO et al., 2014), e as elevadas taxas de conversão do uso do solo que as regiões florestais amazônicas têm sido submetidas (MENDES et al., 2015), especialmente o desmatamento que, em Rondônia é decorrente da evolução da pecuária (ARAGÃO et al., 2014), pode afetar a estrutura e composição do solo além das comunidades microbianas (MENDES et al., 2015). Considerando que a conversão da Floresta Ombrófila Aberta em ambientes de pastagem na bacia do Rio Mutum-Paraná-RO pode levar à perda de microrganismos com potencial para aplicações biotecnológicas, este trabalho objetivou, isolar fungos originários de regiões de pastagem e floresta da bacia do Rio Mutum-Paraná-RO e, testá-los quanto à sua eficiência para o bioncotrole *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do solo na Bacia do Rio Mutum-Paraná - RO

Amostras de solo foram obtidas em áreas de diferentes usos e manejos, com ênfase para as áreas de florestas e pastagens, a partir de uma grade de 10x10 km² considerando os diferentes tipos de solos da região (NUNES, 2012). As coletas foram divididas em duas expedições, realizadas em setembro de 2014 e 2015. O solo foi obtido com uso do trado holandês de caneco entre 0-20 cm de profundidade e, cada amostra foi acondicionada em sacos plásticos. Ao todo foram obtidas 10 amostras de solo oriundas de ambientes de floresta e 10 amostras de solo de ambientes de pastagem (Figura 1, Quadro 1).

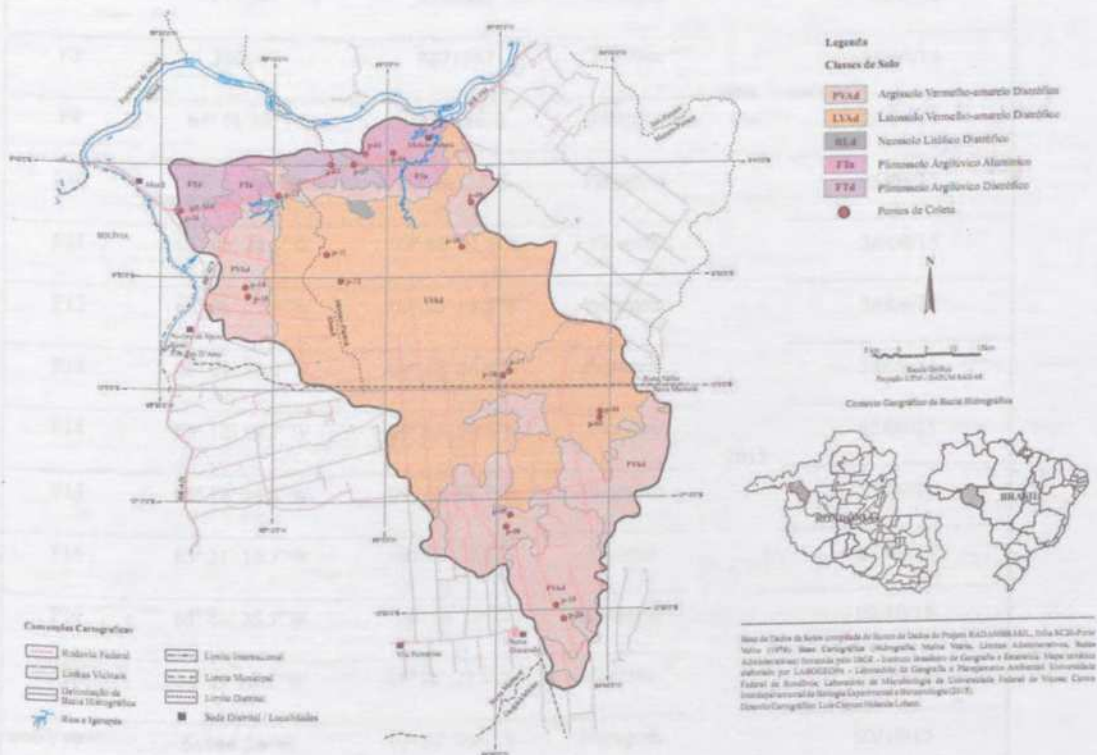


Figura 1 – Mapa da bacia Hidrográfica do rio Mutum-Paraná com localização dos 20 pontos de coleta.

Quadro 1 - Coordenadas das amostras coletadas em duas expedições (2014 e 2015). As coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) foram utilizadas na primeira expedição (amostras F1, F2, P3, F4, P5, P6, P7 e F8) e as coordenadas geográficas na segunda (amostras F9, P10, F11, P12 P13, F14, P15, F16, P17, F18, P19 e F20). O Datum SAD 69 (South American Datum – 69) foi utilizado.

Coordenadas					
Amostras	Longitude	Latitude	Ambiente	Ano	Data da coleta
F1	2766195	8932994	Floresta	2014	26/09/14
F2	271592	8930633	Floresta		26/09/14
P3	315243	8889700	Pastagem		26/09/14
F4	315222	8889467	Floresta		26/09/14
P5	300756	8873479	Pastagem		27/09/14
P6	281411	8932601	Pastagem		28/09/14
P7	275081	8930592	Pastagem		28/09/14
F8	300141	8871757	Floresta		28/09/14
F9	64° 51' 40" W	09° 44' 26" S	Floresta	2015	25/09/15
P10	64° 53' 02" W	09° 47' 11" S	Pastagem		25/09/15
F11	65° 05' 24.3" W	09° 48' 01.8" S	Floresta		26/09/15
P12	65° 04' 07.4" W	09° 50' 58.9" S	Pastagem		26/09/15
P13	65° 09' 38.0" W	09° 42' 26.4" S	Pastagem		26/09/15
F14	65° 12' 19.7" W	09° 51' 50.3" S	Floresta		27/09/15
P15	65° 12' 14.8" W	09° 52' 03.9" S	Pastagem		27/09/15
F16	65° 21' 19.7" W	09° 42' 18.8" S	Floresta		27/09/15
P17	64° 49' 25.7" W	09° 58' 30" S	Pastagem		02/10/15
F18	64° 49' 18.2" W	09° 58' 23.5" S	Floresta		02/10/15
P19	64° 44' 28" W	10° 20' 20.1" S	Pastagem		02/10/15
F20	64° 43' 55.1" W	10° 20' 58.5" S	Floresta		02/10/15

2. Isolamento de microrganismos

O isolamento de fungos do solo das áreas de floresta e pastagem da Bacia do Rio Mutum-Paraná, foi realizado a partir de um *pool* de 1g de solo, com frações de de cada amostra, adicionados à 9,0 mL de solução salina (0,9 %) esterilizada. As soluções foram homogeneizadas em *vortex*, submetidas a diluição seriada e, em seguida, uma alíquota de 0,1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-5} , foram distribuídas, em triplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescidas de antibiótico cloranfenicol (concentração final de 100 mg/L) e meio de Martin acrescido de estreptomicina (concentração final de aproximadamente 50 mg/L) espalhadas com uma alça de *Drigalski* e incubadas a 25 °C.

Para a obtenção de culturas puras, discos de micélio das colônias fúngicas desenvolvidas foram transferidos para novas placas de Petri contendo BDA. Após incubação e crescimento, os isolados foram armazenados sob três diferentes formas: a 4 °C em criotubos contendo discos de micélio imersos em água destilada esterilizada; a -20°C em criotubos contendo discos de micélio imersos em glicerol (10%) e; a 4 °C em tubos de rosca contendo o isolado crescido sobre meio BDA, após incubação durante 3-5 dias a 25 °C.

3. Prospecção dos isolados de interesse biotecnológico

3.1. Ensaio de cultura dupla (teste de pareamento) *in vitro*

Visando a triagem por fungos antagonistas, os isolados foram submetidos a ensaios de cultura dupla *in vitro* frente à *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colleotrichum acutatum* obtidos da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Para tanto, placas de Petri contendo meio BDA foram inoculadas com um disco de micélio (6 mm de diâmetro) do fitopatógeno a cerca de 1 cm de distância da borda da placa e, no lado oposto, com um disco do isolado fúngico a ser avaliado. As placas controle constituíram-se de um disco de micélio do fitopatógeno e um disco de meio BDA, não colonizado, no seu lado oposto. Os ensaios foram realizados em triplicata e, se estenderam durante oito dias, a 25 °C.

Devido a presença de alguns isolados esporulantes, em alguns casos, ao invés de discos de micélio, foram utilizadas soluções de esporos, obtidas a partir de uma raspagem de esporos de isolados crescidos em meio BDA. Os esporos foram adicionados a tubos *Eppendorf* contendo água destilada esterilizada, homogeneizados em *vórtex* e, aplicados

em 5 µL a cerca de 1 cm da borda da placa, simulando um disco de micélio. No lado oposto, um disco do isolado fúngico a ser avaliado foi inoculado. As placas controle constituíram-se de um disco de micélio do fitopatógeno e de 5 µL de água destilada esterilizada, sem esporos, inoculada no seu lado oposto. Os ensaios foram realizados em triplicata e, se estenderam durante oito dias, a 25 °C. A partir deste método impediu-se o espalhamento dos esporos, uma vez que estes ficavam retidos pela tensão superficial da água.

Para a aferição dos percentuais de inibição do crescimento de cada fitopatógeno foram realizadas medições do diâmetro radial das colônias no último dia do teste e aplicação da fórmula: $((DM - dm) / DM) \times 100$, onde DM = diâmetro médio das colônias do fitopatógeno das três replicatas do controle e dm = diâmetro das colônias do patógeno em uma das três replicadas do ensaio de cultura dupla (WALUNJ; ABHANG; JOHN, 2015). Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e os percentuais de inibição dos isolados capazes de inibir *in vitro* todos os três fitopatógenos testados foram comparados por meio do teste Tukey a 5 % utilizando o programa Minitab (versão v.17.1.0). Os percentuais de inibição de cada teste apresentados neste trabalho representaram uma média dos percentuais de inibição obtidos para cada repetição.

RESULTADOS

Foram obtidos 74 isolados a partir de solos de floresta e pastagem. Destes, 23 isolados (31%) foram capazes de realizar antagonismo *in vitro* perante pelo menos um dos fitopatógenos. Cerca de 13 isolados foram considerados potenciais antagonistas a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* com percentuais de inibição entre 14,5 e 62,7% (Figura 2); 18 a *B. cinerea* com percentuais que variam 35,1 a 56,4% (Figura 3) e 20 a *C. acutatum*, com percentuais entre 23,6 e 64,0% (Figura 4).



Figura 2- Média dos percentuais de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. Legenda das barras : Rosa: Isolados competidores; Laranja: Isolados que realizaram antibiose. Asterisco (*) = Fungos inoculados através de solução de esporos

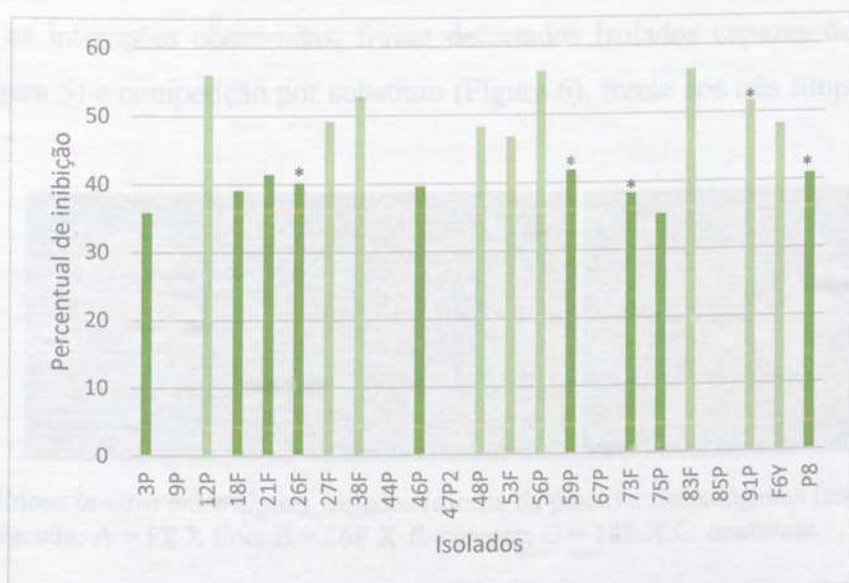


Figura 3- Média dos percentuais de inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Legenda das barras: Verde claro = Isolados competidores; Verde escuro: Isolados que realizaram antibiose. Asterisco (*) = Fungos inoculados através de solução de esporos



Figura 4 – Média dos percentuais de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Legenda das barras: Laranja = Isolados competidores; Marrom: Isolados que realizaram antibiose. Asterisco (*) = Fungos inoculados através de solução de esporos.

Dentre as interações observadas, foram detectados isolados capazes de exercer antibiose (Figura 5) e competição por substrato (Figura 6), frente aos três fitopatógenos testados.

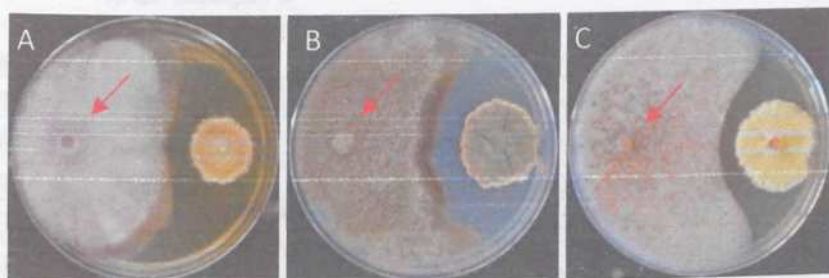


Figura 5- Antibiose *in vitro* entre alguns isolados (direita da placa) e fitopatógenos (esquerda da placa/ seta). Legenda: A = P8 X Foc; B = 26F X *B. cinerea*; C = 18F X *C. acutatum*.

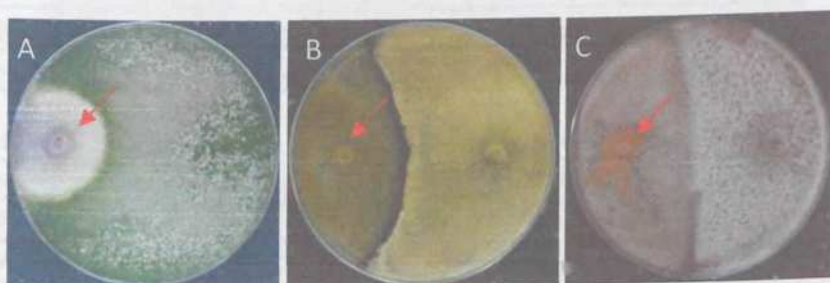


Figura 6- Competição por substrato *in vitro* entre isolados (direita da placa) e fitopatógenos (esquerda da placa/ seta). Legenda: A = 12P X Foc; B = 27F X *B. cinerea*; C = 9P X *C. acutatum*.

Em alguns casos, foi observado que a competição estava associada a um crescimento micelial do isolado sobre a colônia do fitopatógeno (Figura 7).

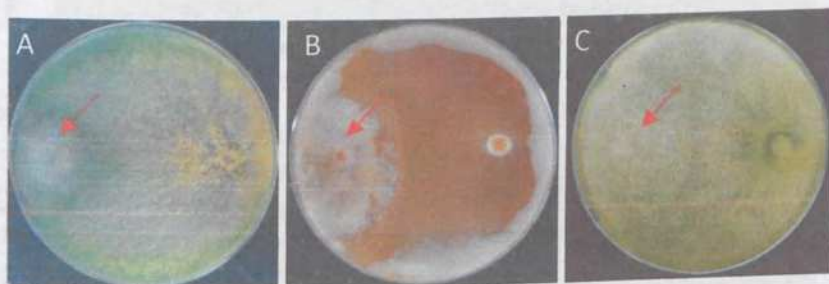


Figura 7 - Competição associada ao crescimento micelial *in vitro* de alguns isolados (direita da placa/ seta) sobre os fitopatógenos (esquerda da placa). Legenda: A = 48P X Foc; B = 83F X *B. cinerea*; C = 27F X *C. acutatum*.

Dentre os isolados mais promissores destacaram-se 83F, 38F, 48P, 53F, 56P, 12P, F6Y, 27F, 46P, e 21F uma vez que foram potenciais antagonistas aos três fitopatógenos. Os percentuais de inibição e os tipos de interação antagonista empregados por estes isolados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1- Percentuais de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* e, tipos de interação antagonista exercida pelos isolados perante os fitopatógenos.

% de inibição a <i>Fusarium oxysporum</i>		
Isolado	f. sp. <i>cubense</i>	Tipo de interação antagonista
83F	53,64 B*	Competição
38F	55,32 B	Competição
48P	56,61 AB	Competição + Crescimento micelial**
53F	41,13 C	Competição
56P	57,00 AB	Competição
12P	54,30 B	Competição
F6Y	45,33 C	Competição + Crescimento micelial
27F	62,72 A	Competição + Crescimento micelial
46P	24,08 D	Antibiose
21F	21,76 D	Antibiose
% de inibição a <i>Botrytis cinerea</i>		
Isolado	<i>Botrytis cinerea</i>	Tipo de interação antagonista
83F	56,44 A	Competição + Crescimento micelial
38F	52,78 AB	Competição + Crescimento micelial
48P	48,28 ABC	Competição + Crescimento micelial
53F	46,80 ABC	Competição
56P	56,39 A	Competição + Crescimento micelial
12P	56,03 A	Competição + Crescimento micelial
F6Y	48,28 ABC	Competição + Crescimento micelial
27F	49,14 AB	Competição
46P	39,55 C	Antibiose
21F	41,38 BC	Antibiose
% de inibição a <i>Colletotrichum</i>		
Isolado	<i>acutatum</i>	Tipo de interação antagonista
83F	64,00 A	Competição + Crescimento micelial
38F	62,49 A	Competição + Crescimento micelial
48P	60,81 AB	Competição + Crescimento micelial
53F	60,63 AB	Competição + Crescimento micelial
56P	57,86 AB	Competição + Crescimento micelial
12P	56,59 AB	Competição
F6Y	53,86 AB	Competição + Crescimento micelial
27F	48,18 AB	Competição + Crescimento micelial
46P	44,41 B	Antibiose
21F	23,64 C	Antibiose

*Agrupamento segundo teste de Tukey a 5% de significância. Os percentuais de inibição que não compartilham uma mesma letra, diferem estatisticamente.

**O tipo de relação descrita como "crescimento micelial" se refere aos casos em que o fungo antagonista cresceu sobre a colônia do fitopatógeno.

DISCUSSÃO

Para todos os fitopatógenos testados, foram encontrados isolados capazes de exercer uma melhor competição por substrato e antibiose. Em alguns casos de competição, o crescimento micelial do isolado sobre o fitopatógeno, sinalizou para uma possível ocorrência de hiperparasitismo.

Isolados capazes de realizar antibiose apresentaram menores percentuais de inibição quando comparados aos isolados competidores (Figuras 2 a 4, Tabela 1). Entretanto, devido à aparente produção de substâncias que inibem o crescimento dos fitopatógenos, estes isolados foram considerados como potenciais para o biocontrole. Os fungos 21F e 46P foram capazes de exercer antibiose perante três diferentes fungos fitopatogênicos, apontando na direção de uma possível produção de mais de um agente antibiótico. Microrganismos capazes de produzir mais de um tipo de antibiótico, podendo inibir diferentes fitopatógenos, tem maior possibilidade de serem utilizados para o biocontrole (PAL; MC SPADDEN GARDENER, 2006).

Os maiores percentuais de inibição foram obtidos por fungos competidores, devido ao seu rápido crescimento *in vitro* em relação aos fitopatógenos (Figuras 2 a 4, Tabela 1). Os isolados 83F, 38F, 56P, 12P, devido ao seu crescimento rápido, foram capazes de inibir em mais de 50%, por competição, todos os fitopatógenos aqui testados (Tabela 1). Estes fungos apresentam potencial como biocontroladores, uma vez que, a competição por nutrientes é importante para limitar a incidência e severidade das doenças, sendo a colonização das plantas e a rápida utilização dos substratos por microrganismos não patogênicos uma das formas de dificultar o crescimento de fitopatógenos (PAL & MC SPADDEN GARDENER, 2006).

Isolados como F6Y e 48P além de inibirem o crescimento em mais de 45% (chegando a 53,86% e 60,81% para *C. acutatum*, respectivamente), apresentaram crescimento micelial sobre todos os fungos fitopatogênicos (Tabela 1), apontando para um possível hiperparasitismo. Entretanto, a confirmação de tal fato apenas pode ser feita mediante observação microscópica de mudanças morfológicas tais como o enrolamento de hifas e formação de estruturas semelhantes ao apressório que auxiliam na penetração no hospedeiro (MENDOZA et al., 2015).

A obtenção de isolados com habilidade de realizar competição e ainda crescer sobre os fitopatógenos, pode representar a ocorrência de mais de um tipo de interação entre estes organismos, sendo bons indicativos para a potencial utilização destes fungos.

Os agentes de controle biológico mais efetivos aparentam possuir múltiplos mecanismos de antagonismo (PAL & MC SPADDEN GARDENER, 2006) e uma combinação entre antibiose, parasitismo, competição e até estímulo à defesa do hospedeiro é altamente recomendável na obtenção de antagonistas (MACHADO & SILVA, 2013).

Nesse sentido, isolados de *Trichoderma* são os mais amplamente utilizados devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antibiótica, exercer competição e parasitismo perante outros fungos, além de serem indutores de resistência em plantas e promotores do crescimento vegetal (MENDOZA et al., 2015; MACHADO; SILVA, 2013; WALUNJ et al., 2015). Mohandas et al., (2010) e Hoffmann et al., (2015) demonstraram a inibição *in vitro* de *Foc* por isolados de *Trichoderma harzianum*. Khan et al., (2011) relatam a utilização de preparações de *Trichoderma* como agente de biocontrole aumentando o crescimento de plantas de grão de bico inoculadas com *Botrytis cinerea*, sendo uma alternativa ao uso de compostos químicos. No que se refere ao morango, a utilização de *Trichoderma* de modo efetivo no controle do mofo cinzento (*B. cinerea*) foi observada (FREEMAN et al., 2004).

Alguns trabalhos têm relatado a utilização de outros agentes de controle biológico perante *B. cinerea*. Extratos obtidos a partir de culturas de *Chaetomium globosum* em meio líquido exercem atividade antifúngica sendo capazes de inibir em cerca de 100% o crescimento micelial *in vitro* de linhagens de *Botrytis cinerea* (PAN et al., 2016). Adicionalmente, soluções de esporo de estirpes de *Clonostachys rosea* foram relatadas para o controle do mofo cinzento em mudas de fúcsia (SILVERA-PÉREZ et al., 2010). Diferentes isolados de *C. rosea* obtidos no Brasil levaram à uma elevada supressão de *B. cinerea* em tomate, e tiveram potencial competição em eucalipto, rosa e morango, apresentando possível hiperparasitismo perante este fungo em todos estes hospedeiros (NOBRE et al., 2005).

No que concerne à *Colletotrichum acutatum*, Landum et al. (2016) destacaram isolados de *Aspergillus niger* e *Nigrospora oryze* dentre as espécies com maior potencial de inibição *in vitro* deste fungo, com percentuais de 86,3% e 66,7%, respectivamente. *A. niger* realizou inibição por meio do contato direto com o patógeno, e *N. oryzae* por inibição mútua (LANDUM et al., 2016). Adicionalmente, a utilização de *Trichoderma* para o controle da antracnose do morango (*C. acutatum*) em condições de laboratório e de estufa, já foi relatada (FREEMAN et al., 2004).

Isolados de *T. harzianum* e *Gliocadium roseum*, foram avaliados por testes similares aos aqui realizados e constatados como aptos ao controle *in vitro* perante *C. acutatum*. Os percentuais de inibição chegaram a 38% para *T. harzianum* e 43% para *G. roseum* (ZIVKOVIC et al., 2010). Entretanto, como os isolados de *C. acutatum* foram plaqueados 3 dias antes da inoculação com *T. harzianum*, a fim de compensar o crescimento mais lento deste patógeno em relação ao antagonista, isto pode ter levado à obtenção de percentuais de inibição sensivelmente mais baixos do que os obtidos para alguns isolados aqui estudados. No nosso trabalho, preferiu-se padronizar a inoculação simultânea dos fitopatógenos e antagonistas devido ao amplo número de isolados e suas diferentes velocidades de crescimento *in vitro*.

Algumas estirpes podem diferir quanto ao potencial para o biocontrole devido às diferentes demandas por nutrientes, temperatura, umidade etc, e, por isso, a combinação de diferentes estirpes pode favorecer a colonização da planta em diferentes estágios de desenvolvimento (NOBRE et al., 2005). Nesse sentido, a utilização de uma mistura de diferentes estirpes de *C. rosea* em morangueiros eleva a eficiência do controle do mofo cinzento (COTA et al., 2008).

A aplicação conjunta dos isolados de *T. harzianum* e de fungos micorrízicos arbusculares da espécie *Glomus mosseae* promoveram o aumento do crescimento e uma menor infecção de bananeiras inoculadas com Foc em condições de campo. Este resultado pode ser decorrente do espessamento da parede celular da raiz de banana (que dificulta a penetração do Foc e protege a planta uma vez que os sítios de infecção do fungo estão ocupados), além da indução da resistência e promoção de crescimento da planta (MOHANDAS et al., 2010).

Entretanto, a aplicação conjunta pode ter um limite, especialmente quando se utiliza diferentes tipos de microrganismo. A utilização de apenas dois agentes de biocontrole, *T. harzianum* + *G. mosseae*, foi mais eficiente que três, *T. harzianum* + *G. mosseae* + *Pseudomonas fluorescens*, em bananeiras inoculadas com Foc em condições de campo (MOHANDAS et al., 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho são reforçados pelos estudos mencionados anteriormente, nos quais se apresentam a possibilidade de utilização de fungos para o biocontrole de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*. Conclui-se, portanto, que isolados obtidos da Bacia Amazônica possuem potencial para o biocontrole, uma vez que são capazes de exercer atividades antagônicas perante diferentes fitopatógenos.

Considerando que a diversidade microbiana brasileira é ainda pouco conhecida (PYLRO et al., 2014) e que os ambientes amazônicos representam locais de alta diversidade de microrganismos (CENCIANI et al., 2009), a identificação, já em processo, dos isolados obtidos neste trabalho permitirá verificar se, além de fungos conhecidos, foram obtidos novos fungos com potencial para o biocontrole dos fitopatógenos aqui testados.

Posteriormente, a análise microscópica dos tipos de interação entre os isolados e os fitopatógenos e, a extração de metabólitos dos fungos seguida de novos testes de inibição, vão ampliar o conhecimento sobre os isolados e contribuirão para uma futura utilização destes fungos e seus produtos em condições de casa de vegetação e campo.

Adicionalmente, visto que há possibilidade de utilização aditiva e/ou sinérgica de microrganismos diferentes para o biocontrole e que fungos antagonistas são capazes de realizar diversos tipos de interação perante um fungo fitopatogênico, a obtenção, neste trabalho, de fungos competidores e aparentemente hiperparasitas, e de fungos produtores de metabólitos com atividade antifúngica *in vitro*, representa um primeiro passo importante para uma futura utilização em conjunto ou individual de inóculos e metabólitos dos isolados para o controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. Sistema de produção do morango. **Embrapa Clima Temperado, Sistema de Produção**, v. 5, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/index.htm>>. Acesso em: 05 out. 2015.
- ARAGÃO, J.L.; PFEIFER, L.F.M.; BORRERO, M.A.V. Ocupação tardia e o desenvolvimento da agropecuária no Estado de Rondônia: Uma história da bovinocultura no desenvolvimento regional* Delayed occupation and the development of agriculture in the state of Rondônia. **Semina-Revista dos Pós-Graduandos em História da UPF**, v. 13, n. 1, 2014.
- BORGES, A.L. et al. Sistema de produção da bananeira irrigada. Embrapa Semiárido, 2009 (**Embrapa Semiárido, Sistema de Produção**, 4). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/doencas.htm#murchasvasculares>>. Acesso em: 05 out. 2015
- CAMARGO, L. K. P. Produtividade e qualidade de cultivares de morangueiro em sistemas orgânico e convencional na região de Guarapuava - PR. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual do Centro Oeste/UNICENTRO, Guarapuava/PR, 2008.
- CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 907-916, 2009.
- CHOQUER, M. et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 1, p. 1-10, 2007.
- CORDEIRO, Z.J.M. Sistema de produção de banana para o Estado do Pará. Cruz das Almas, 2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaPara/doencas.htm>> Acesso em: 05 out. 2015
- COTA, L. V. et al. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, v. 46, n. 3, p. 515-522, 2008.
- EL-BENDARY, M. A.; HAMED, H. A.; MOHARAM, M. E. Potential of *Bacillus* isolates as bio-control agents against some fungal phytopathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 173-178, 2016.
- EMBRAPA – Incidência de Doenças de Pós-Colheita em Frutos de Morango. **Embrapa Hortaliças**. ISSN 1677 - 2229, Agosto, 2008.
- FANCELLI, M. Cultivo da banana para o estado do Amazonas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4 p. (Sistema de produção, 6) Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaAmazonas/doencas.htm#3>> Acesso em: 05 out. 2015
- FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 493-502, 2003.
- FREEMAN, S. et al. Trichoderma biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 4, p. 361-370, 2004.
- FREEMAN, S. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **HortScience**, v. 43, n. 1, p. 66-68, 2008.

- GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of fusarium wilt resistance in transgenic banana plants. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.
- GROENEWALD, S. et al. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Mycological Research**, v. 110, n. 3, p. 297–305, 2006.
- HAN, J. et al. Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. **The plant pathology journal**, v. 31, n. 2, p. 165–175, 2015.
- HOFFMANN, C. A. et al. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro Potential of isolated antagonism of *Trichoderma* against isolated from *Fusarium* sp., in vitro. p. 236–242, 2015.
- JÍLKOVÁ, B. et al. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates to selected fungicides. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 63, n. 4, p. 1111–1119, 2015.
- KHAN, M. R.; ANWER, M. A.; SHAHID, S. Management of gray mold of chickpea, *Botrytis cinerea* with bacterial and fungal biopesticides using different modes of inoculation and application. **Biological Control**, v. 57, n. 1, p. 13–23, 2011.
- LANDUM, M. C. et al. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological Research**, v. 183, p. 100–108, 2016.
- LI, C. et al. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 2, p. 327–340, 2011.
- LOUZADA, G. A. DE S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 145–149, 2009.
- MA, L. J. Horizontal chromosome transfer and rational strategies to manage *Fusarium* vascular wilt diseases. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 8, p. 763–766, 2014.
- MACHADO, D. F. M.; SILVA, A. C. F. *Trichoderma* no controle in vitro de fungos presentes em diásporos de *Gochnatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 182–191, 2013.
- MENDES, L. W. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, p. 255–265, 2015.
- MENDOZA, J. L. H. et al. Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to Northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1093–1101, 2015.
- MOHANDAS, S. et al. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents in managing *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infection in banana cv. Neypooan. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 165–181, 2010.
- MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A. Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2005. 35p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 44).
- NABTI, E. et al. Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. **European Journal of Soil Biology**, v. 61, p. 20–26, 2014.

- NOBRE, S. A. M. et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 34, n. 2, p. 132–143, 2005.
- NUNES, D.D. Vulnerabilidade Natural à Erosão da bacia do Rio Mutum-Paraná – Porto Velho-RO (2009-2011). Porto Velho/RO. CNPq (MCT/CNPq/CT-Amazônia), **Relatório de Pesquisa**, 2012. 74p.
- O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060–5, 2012.
- OSHIMA, M. et al. A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 92, n. 1, p. 75–80, 2002.
- PAL, K. K.; MC SPADDEN GARDENER, B. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1–25, 2006.
- PAN, F. et al. Endophytic fungus strain 28 isolated from *Houttuynia cordata* possesses wide-spectrum antifungal activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 4–12, 2016.
- PERES, N. A. R. et al. Benomyl Sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125–130, 2004.
- PLOETZ, R. C. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 653–656, 2006.
- PLOETZ, R. C. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 2015, p. 1 – 9, 2015.
- PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity-Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.
- SILVERA-PÉREZ, A. E. et al. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 3, p. 163–169, 2010.
- TOUMATIA, O. et al. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 234–239, 2016.
- UGOLINI, L. et al. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. **Postharvest Biology and Technology**, v. 90, p. 34–39, 2014.
- WALUNJ, A. A.; ABHANG, P. B.; JOHN, P. In vitro evaluation of mutant and wild strain of *Trichoderma harzianum* against soil borne plant pathogen. v. 8, n. 1, p. 108–111, 2015.
- WANG, W. et al. Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to *Fusarium* wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.). **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 451–459, 2012.
- WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561–580, 2007.
- YANG, L. L. et al. Development of a single-tube duplex real-time fluorescence method for the rapid quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (FOC1) and race 4 (FOC4) using TaqMan probes. **Crop Protection**, v. 68, p. 27–35, 2015.
- ZHUANG, J. et al. The antagonistic effect of *Banana bunchy top virus* multifunctional protein B4 against *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, p. n/a–n/a, 2015.

ZIVKOVIC, S. et al. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 611–623, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

- Diferenças nas categorias funcionais entre floresta e pastagem são pequenas e exigem um maior detalhamento das proteínas envolvidas em cada categoria;
- Ambientes de floresta e pastagem apresentam diferenças na composição fúngica;
- Ambientes de pastagem possuem maior diversidade alfa e os componentes físico-químicos do solo podem contribuir para isto;
- Ambientes de pastagem tendem a sofrer homogeneização biótica e isto pode estar associado a uma composição vegetal mais homogênea nestes locais;
- Fungos isolados da bacia do Rio Mutum-Paraná – RO, têm potencial para o biocontrole, visto a capacidade de exercer antibiose, competição e aparente hiperparasitismo *in vitro* perante *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum*.