



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Lander Rodrigo de Souza

ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO SOLO EM
FRAGMENTO DE FLORESTA OMBRÓFILA DENSA DO PARQUE ESTADUAL DA
SERRA DO TABULEIRO - SC

Florianópolis
2020

Lander Rodrigo de Souza

ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO SOLO EM
FRAGMENTO DE FLORESTA OMBRÓFILA DENSA DO PARQUE ESTADUAL DA
SERRA DO TABULEIRO - SC

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências; área de concentração
Microbiologia

Orientador: Prof. Admir José Giachini, PhD.

Coorientador: Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Lander Rodrigo de

Estrutura de comunidades de bactérias e fungos do solo em fragmento de floresta ombrófila densa do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro - SC / Lander Rodrigo de Souza ; orientador, Admir José Giachini, coorientador, Rubens Tadeu Delgado Duarte, 2020.

65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. comunidades bacterianas . 3. comunidades fúngicas. 4. PCR-DGGE . I. Giachini, Admir José . II. Duarte, Rubens Tadeu Delgado . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Lander Rodrigo de Souza
ESTRUTURA DE COMUNIDADES DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO SOLO EM
FRAGMENTO DE FLORESTA OMBRÓFILA DENSA DO PARQUE ESTADUAL DA
SERRA DO TABULEIRO - SC

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Diogo Robl, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Glauber Wagner, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Admir José Giachini, PhD.
Orientador

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado ao meu pai Zulmar (*in memoriam*), meus filhos Marcos e Ana Laura e minha esposa Ana Clara por sempre acreditarem no meu sucesso e pelo amor!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Admir Giachini, por sua orientação, apoio, liberdade para trabalhar e principalmente por acreditar em mim.

Ao meu co-orientador Professor Rubens Delgado Duarte, por seu apoio e ensinamentos com os testes.

À minha esposa Ana Clara pelo apoio, companheirismo e esforço no cuidado com as crianças, sem os quais não seria possível seguir até aqui.

Aos meus pais, Zilma e Zulmar (*in memoriam*) pelo incentivo, amor e tudo que me ensinaram.

Aos meus irmãos Marcos e Tiago, pelo exemplo que são e pelo amor.

Ao Ednilson, pela amizade e auxílio com as análises no R, sempre com chimarrão.

À Manu, pela amizade e auxílio em utilizar o LAMEB.

Aos colegas de laboratório, Sheila, André, Andressa, Anabel, Carol, Shantal, Joana, Renata, Dani e Lucas pelo companheirismo e ajuda em todos os momentos.

Ao Antonio, pelo apoio, companheirismo desde a graduação e ajuda nos projetos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina pelo financiamento do projeto e bolsa, o que permitiu a realização deste trabalho.

Ao LAMEB e os TAEs, em especial ao Dênis, Vanessa e Máisa pelo profissionalismo e auxílio no uso dos equipamentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, pelo aprendizado que me foi proporcionado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela qualidade de ensino e oportunidades apresentadas desde a graduação.

Agradecimento especial àqueles que estão sempre comigo!

*” After climbing a great hill, one only finds
that there are many more hills to climb”.*

Nelson Mandela

RESUMO

O Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST) é uma unidade de conservação de proteção integral dentro do ameaçado bioma Mata Atlântica, sendo a floresta ombrófila densa submontana (FOD) o ecossistema de maior área dentre os 84.130 ha do PEST. Uma importante estratégia conservacionista é avaliar as comunidades microbianas do solo de áreas preservadas, já que bactérias e fungos, os principais constituintes, desempenham papel importante na manutenção dos ecossistemas, participando da ciclagem de nutrientes, associação com plantas e ciclos biogeoquímicos. Entretanto, não há estudos sobre avaliação de comunidades bacterianas e fúngicas do solo no PEST. Desta maneira, neste trabalho foram caracterizados atributos químicos do solo e sazonais que possuem relação com a estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas de FOD no bioma Mata Atlântica. Foram selecionadas três áreas de FOD dentro do PEST e coletadas cinco amostras em cada área na camada 0-20 cm, em períodos de inverno e verão. A partir de análise independente de cultivo (PCR-DGGE), em que foram utilizados *primers* BAC338F-GC e UN518R para amplificação por PCR da região V3 do gene RNAr 16S para bactérias e os *primers* ITS1-GC, ITS4 e ITS2 para amplificação por *nested-PCR* da região ITS I para fungos. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) em que foi determinada a estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas nas duas estações do ano e avaliadas por PCoA e ANOSIM. A estrutura das comunidades bacterianas apresentou distinção entre as áreas de inverno e verão, entretanto, apresentaram pouca distinção entre os grupos de mesma estação. Já a estrutura das comunidades fúngicas apresentou pouca distinção entre as áreas das duas estações, em que as áreas dentro das estações se mostraram semelhantes. Na análise pela dbRDA, a matéria orgânica do solo (MOS), o Al e o Ca demonstraram serem os melhores preditores das estruturas de comunidades de bactérias. Para a estrutura das comunidades fúngicas, a MOS, o P e o Mg apresentaram serem os melhores preditores. Deste modo, este trabalho demonstrou que além da influência dos atributos químicos já citados, possivelmente a pluviosidade e a temperatura também influenciam a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas do solo de FOD no PEST.

Palavras-chave: comunidades bacterianas 1. comunidades fúngicas 2. PCR-DGGE 3.

ABSTRACT

The Serra do Tabuleiro State Park (PEST) is a conservation unit of integral protection within the threatened Atlantic Forest biome, with the dense low-montane ombrophilous forest (FOD) being the largest ecosystem area among 84,130 ha of PEST. An important conservation strategy is to evaluate soil microbial communities in preserved areas, once bacteria and fungi are the main constituents and play an important role in maintaining ecosystems, as nutrient cycling controllers, plant association and biogeochemical cycles. However, there are no studies on the assessment of soil bacterial and fungal communities in the PEST. Thus, the edaphic and seasonal factors which are related to the structure of soil bacterial and fungal communities in FOD of the Atlantic Forest biome were characterized in this work. Three areas of FOD were selected within the PEST and five soil samples were collected in each area in the 0-20 cm layer, in winter and summer periods. As from culture-independent analysis (PCR-DGGE), in which primers BAC338F-GC and UN518R were used for PCR amplification of the V3 region of the rRNA 16S gene from bacteria and the primers ITS1-GC, ITS4 and ITS2 for nested-PCR amplification of the ITS I region from fungi. The amplicons samples were subjected to denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in which the structure of soil bacterial and fungal communities was determined in both seasons and evaluated by PCoA and ANOSIM. The structure of soil bacterial communities showed distinction between winter and summer areas, however, there is little distinction between groups from the same season. The structure of fungal communities showed little distinction between the areas of the two seasons, where the areas within the stations were similar. In the dbRDA analysis, soil organic matter (MOS), Al and Ca showed to be the best predictors of bacterial community structure. For the fungal community structure, MOS, P and Mg appeared to be the best predictors. Thus, this work demonstrated that besides the influence of the edaphic factors which was already mentioned, possibly rainfall and temperature also influence the structure of soil bacterial and fungal communities' structures of the FOD soil at PEST.

Keywords: bacterial community 1. fungal community 2. PCR-DGGE 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro e dos pontos de coleta.	30
Figura 2. Esquema de coleta das amostras de solo por ponto de amostragem.	30
Figura 3. Atributos físico-químicos do solo da floresta ombrófila densa submontana (FOD) do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST).....	38
Figura 4. Dendrograma baseado nos perfis de bandas da região V3 do gene RNAr 16S de Bactérias do solo de FOD do PEST nos períodos de inverno e verão utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e o método de agrupamento UPGMA.	41
Figura 5. Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na estrutura de comunidades bacterianas obtidas por PCR-DGGE nas três áreas (A, B e C) de FOD do PEST nos períodos de inverno e verão utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e intervalo de confiança de 95%.....	42
Figura 6. Diagrama de Venn obtido da comparação das bandas da PCR-DGGE de bactérias das áreas A, B e C de FOD do PEST coletadas nos períodos de inverno e verão.....	43
Figura 7. Dendrograma baseado nos perfis de bandas da região ITS I de fungos do solo de FOD do PEST no período de verão utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e o método de agrupamento UPGMA.	45
Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na estrutura de comunidades fúngicas obtidas por PCR-DGGE nas três áreas (A, B e C) de FOD do PEST nos períodos de inverno e verão, utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e intervalo de confiança de 95%.	46
Figura 9. Diagrama de Venn obtido da comparação de bandas da PCR-DGGE de fungos das áreas A, B e C de FOD do PEST coletadas nos períodos de inverno e verão.	47
Figura 10. Análise de redundância baseada em distância (dbRDA) das áreas de FOD do PEST correlacionando a estrutura de comunidades bacterianas determinadas por PCR-DGGE com os atributos físico-químicos do solo, utilizando o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice.	51
Figura 11. Análise de redundância baseada em distância (dbRDA) das áreas de FOD do PEST, correlacionando a estrutura de comunidades fúngicas determinadas por PCR-DGGE com os atributos físico-químicos do solo, utilizando o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta do solo realizados no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST) em duas estações do ano (Verão e Inverno) em área de floresta ombrófila densa submontana (FOD). Áreas A, B e C.....	31
Tabela 2. Relação dos <i>primers</i> , região alvo, sentido e sequência utilizados na amplificação do DNA total extraído das amostras de solo do PEST.....	34
Tabela 3. Resultado do teste de ANOSIM por Pairwise baseado na PCR-DGGE de bactérias de amostras de solo de FOD do PEST coletadas no inverno e no verão utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice e cálculo do valor de p realizado com 9999 permutações.....	42
Tabela 4. Resultado do teste de ANOSIM por Pairwise baseado na PCR-DGGE de fungos de amostras de solo de FOD do PEST coletadas no inverno e no verão utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice e cálculo do valor de p realizado com 9999 permutações.....	47

LISTA DE SIGLAS

ANOSIM	Análise de similaridade
dbRDA	Análise de redundância baseada em distâncias
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribunucleico
dNTP	Didesoxinucleotídeo trifosfato
FAPESC	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina
FECM	Fungos ectomicorrízicos
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
FOD	Floresta ombrófila densa submontana
MOS	Matéria orgânica do solo
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PERMANOVA	Análise de variância permutacional não paramétrica
PEST	Parque Estadual da Serra do Tabuleiro
RNA	Ácido ribunucleico
RNAr	RNA ribossomal
SC	Santa Catarina
TAE	Tampão Tris-Acetato EDTA
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
UPGMA	Método da ligação média entre grupos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	A Mata Atlântica	20
3.2	O PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO TABULEIRO	21
3.3	IMPORTÂNCIA E ESTRUTURAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NO SOLO	23
3.4	TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS NO SOLO	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	SELEÇÃO DAS ÁREAS E AMOSTRAGEM	29
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO	31
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	32
4.3.1	Extração do DNA total	32
4.3.2	Análise de PCR-DGGE	32
4.3.3	Análises Estatísticas	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO	36
5.2	ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	38
5.2.1	Estrutura das Comunidades Bacterianas.....	38
5.2.2	Estrutura das Comunidades Fúngicas.....	43
5.2.3	Correlação entre a estrutura das comunidades microbianas e os atributos físico-químicos do solo	47
6	CONCLUSÕES	53
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos biomas mais biodiversos e ameaçados do mundo, com elevado grau de endemismo e sendo por isso reconhecido como *hotspot* de biodiversidade (MITTERMEIER et al., 2011). Estende-se pelo litoral brasileiro, com interiorização para o oeste na parte sul do Brasil. Sua vegetação é caracterizada principalmente por floresta ombrófila, que possui variações deste tipo florestal, e também outros ecossistemas associados a esse bioma, que possui hoje menos de 8% do tamanho original em áreas maiores de 100 ha (CAMPANILI; SCHAFFER, 2010).

O bioma abriga hoje em sua área mais de 100 milhões de pessoas, superior a 60% da população brasileira (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014), sendo que a ocupação humana ocorre desde o início da colonização. Além da urbanização, o bioma é ocupado para atividades agropecuárias e também fragmentado por estradas.

O estado de Santa Catarina está inserido no bioma Mata Atlântica e possui cobertura de cerca 10% de FOD em áreas preservadas (VIBRANS et al., 2013). As famílias de Orchidaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Melastomataceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Bromeliaceae, Piperaceae e Lauraceae representam o maior número de espécies em FOD, sendo que 8 espécies constam na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2008; GASPER et al., 2014).

Nesse sentido, a criação do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST) em Santa Catarina (SC) em 1975 foi uma forma de proteger áreas naturais nativas de Mata Atlântica e que estavam em risco por conta da exploração madeireira na época, além de proteger mananciais importantes para o abastecimento da Grande Florianópolis e sul do estado (KLEIN, 1981). Essa ação possibilitou a abertura da área para o estudo científico. Desde então, muitos estudos sobre a flora e fauna no PEST foram realizados, entretanto, não há estudos sobre a diversidade de microrganismos do solo no PEST.

Os microrganismos são elementos fundamentais para a manutenção da vida do planeta e estão intimamente ligados a todos os seres vivos por conta de suas atividades metabólicas. Participam dos ciclos biogeoquímicos, ciclagem de matéria orgânica, fertilidade e estruturação dos solos, em que as bactérias e os fungos são os microrganismos que mais se destacam (RASTOGI; SANI, 2011; DOCHERTY; GUTKNECHT, 2012).

Os fungos possuem atividades metabólicas importantes para os ecossistemas naturais, pois degradam celulose, lignina, hemicelulose e compostos aromáticos. Possuem papel

importante no ciclo do carbono (C), decomposição dos nutrientes do solo e estão intimamente associados a maioria das plantas. Essas associações simbióticas podem ocorrer por fungos endofíticos, que habitam o interior das plantas e estão relacionados ao biocontrole de doenças e como promotores de crescimento (PETRINI, 1991), ou por micorrízicos, em que alguns fungos favorecem a absorção de fósforo, água e outros nutrientes pelas plantas através das raízes, que fornecem em troca açúcares e aminoácidos para os fungos.

As bactérias atuam nos solos principalmente como saprófitas e destacam-se no ciclo do C e na decomposição da biomassa vegetal. Por possuírem atividade metabólica diversificada, produzem enzimas muito importantes da degradação de madeira e outros resíduos vegetais mortos. Os produtos das suas atividades metabólicas podem ser empregados pela indústria para diversos usos, como enzimas e biocatalizadores de uso biotecnológico. As bactérias destacam-se também no ciclo do nitrogênio (N), em que representam cerca de 95% do N fixado no ambiente, seja por bactérias de vida livre ou simbióticas (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011).

Nos últimos anos, principalmente, muitos estudos vêm buscando identificar fatores que possam causar alterações na estrutura e diversidade de comunidades microbianas e entendê-las, seja em ambientes naturais preservados, solos de uso agrícolas ou áreas degradadas. Alguns parâmetros estabelecidos como o pH no solo, matéria orgânica, composição da vegetação e fatores climáticos (LAUBER et al., 2009; ROUSK et al., 2010; TEDERSOO et al., 2016; ZHOU et al., 2016), possuem influência para o entendimento das distribuições locais e globais dos microrganismos do solo, o que vem sendo confirmado em vários trabalhos (TEDERSOO et al., 2016; BAHRAM et al., 2018),

Para a identificação dos microrganismos do solo, as técnicas independentes de cultura possibilitam o alcance de uma maior diversidade microbiana nos ecossistemas, que normalmente os meios de cultura tradicionais não permitem. São baseadas na extração de DNA e na reação em cadeia da polimerase (PCR). Adicionalmente, a técnica de *fingerprint* chamada eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), é uma ferramenta de biologia molecular bem estabelecida que permite realizar a caracterização das estruturas de comunidades microbianas do solo (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993), como nas áreas do PEST.

Adicionalmente, a obtenção de dados em diferentes estações do ano e de fatores edáficos permitem caracterizar as comunidades microbianas neste ecossistema, bem como entender e preservar a biodiversidade que está intimamente associada pela cadeia trófica e,

consequentemente, a biodiversidade do bioma Mata Atlântica. Neste sentido, este trabalho tem por objetivo determinar a estrutura de comunidades de bactérias e fungos do solo de floresta ombrófila densa do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas do solo e sua variação sazonal em uma unidade de floresta ombrófila densa submontana do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a estrutura de comunidades de bactérias e fungos do solo por PCR-DGGE.
- Verificar a similaridade entre a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas do solo em três áreas de FOD do PEST.
- Comparar a estrutura das comunidades microbianas com os períodos de verão e inverno nas áreas do ecossistema.
- Correlacionar a estrutura das comunidades microbianas com os atributos químicos do solo de FOD do PEST.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica ocupa cerca de 13% do território nacional e 95% da sua área ocorre no Brasil, com o restante da área ocupando parte da Argentina e Paraguai (STEHMANN et al., 2009). Originalmente estendia-se desde o Rio Grande do Norte até Rio Grande do Sul e é reconhecida como Reserva da Biosfera pela UNESCO (ICMBIO, 2009). O elevado número de espécies endêmicas e a grande redução de sua área original, fazem a Mata Atlântica ser considerada um dos 34 *hotspot* de biodiversidade (MITTERMEIER et al., 2011), com elevada porcentagem de endemismo para plantas, algas e fungos, cerca de 39,5% (FORZZA et al., 2012) e 32% para mamíferos (FONSECA; HERRMANN; LEITE, 1999).

A chegada dos colonizadores e o estabelecimento da população brasileira ocorreram a partir do litoral no bioma Mata Atlântica. Devido a expansão humana, a maioria das áreas de Mata Atlântica atualmente formam arquipélagos de pequenos fragmentos florestais cercados por pastagens, campos agrícolas, florestas cultivadas (*Eucalyptus* spp. ou *Pinus* spp.) ou áreas urbanas (RIBEIRO et al., 2009; JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014). As maiores cidades brasileiras localizam-se nesse bioma, em que vivem atualmente mais de 100 milhões de brasileiros, superior a 60% da população (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014). Esse ambiente, contribui com cerca de 70% do produto interno bruto (PIB) e 2/3 da produção industrial (MARTINELLI et al., 2013), além de produzir nesse bioma mais da metade da produção da horticultura nacional (PINTO et al., 2012).

A Mata Atlântica é caracterizada por um conjunto de vários ecossistemas que se distinguem em sua composição de fauna e flora, conduzida pela variabilidade dos solos, topografia e condições climáticas ao longo da grande área de ocorrência no Brasil (RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Nos fragmentos florestais da Mata Atlântica, o tamanho, a forma, o grau de isolamento e as perturbações são os fatores que mais afetam a estrutura e dinâmica de ecossistemas (VIANA; TABANEZ; MARTINS, 1992). Atualmente, na área original da Mata Atlântica, é encontrada cerca de 27% da vegetação nativa, em que menos de 8% em áreas contínuas maiores que 100 ha (CAMPANILI; SCHAFFER, 2010).

Acredita-se que a biodiversidade na Mata Atlântica, com base no atual nível de degradação, já esteja comprometida, pois muitas espécies foram extintas antes mesmo de serem descritas (REIS et al., 1992) e projeções de cenários climáticos futuros indicam a redução na

distribuição de importantes espécies vegetais, como o palmito juçara (*Euterpe edulis*) e a leguminosa arbórea ingá (*Inga sessilis*), além das mudanças de distribuição para o sul do país (COLOMBO; JOLY, 2010).

O estado de Santa Catarina está inserido totalmente no bioma Mata Atlântica, possuindo 95.346 km² e sendo o terceiro do país em área neste bioma. Atualmente possui cobertura de 27,8% da área por florestas, com 40,4% deste percentual de floresta ombrófila densa (VIBRANS et al., 2013). A floresta ombrófila densa da Mata Atlântica catarinense compreende diferentes formações florestais de acordo com a variação altitudinal, sendo elas: floresta ombrófila densa das terras baixas (< 30 m), floresta ombrófila densa submontana (30–400 m), floresta ombrófila densa montana (400–1000 m) e floresta ombrófila densa alto montana (> 1000) (IBGE, 2012).

O Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina, que avaliou todo o estado, registrou neste ecossistema um total de 1.473 espécies, sendo que 8 espécies constam na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção: *Aechmea blumenavii*, *Araucaria angustifolia*, *Billbergia alfonsojoannis*, *Euterpe edulis*, *Heliconia farinosa*, *Ocotea catharinensis*, *O. odorifera* e *O. porosa* (MMA, 2008; GASPER et al., 2014). As famílias que apresentaram maior número de espécies foram: Orchidaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Melastomataceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Bromeliaceae, Piperaceae e Lauraceae (GASPER et al., 2014).

A floresta ombrófila densa submontana caracteriza-se pela maior riqueza entre as formações florestais de floresta ombrófila densa no estado em relação às espécies do componente arbóreo-arbustivo, o que pode ser explicado por incluir espécies das formações florestais vizinhas (KLEIN, 1980; LINGNER et al., 2015).

3.2 O PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO TABULEIRO

A criação de um sistema representativo de unidades de conservação é um dos mecanismos mais eficientes e tradicionais para a conservação da biodiversidade *in situ* (FONSECA; HERRMANN; LEITE, 1999), com a função de preservar o patrimônio biológico existente, assegurando representatividade de amostras significativas e ecologicamente viáveis das diferentes populações, habitats e ecossistemas do território nacional e das águas jurisdicionais (MMA, 2020). No estado de SC destaca-se o PEST, que é a maior Unidade de

Conservação (UC) de proteção integral do estado com área aproximada de 84.130 ha, ocupando quase 1% do território catarinense.

O PEST foi criado em 1975 pelo Decreto Estadual nº 1.260/1975 e a partir dos estudos científicos do Padre Raulino Reitz e de Roberto Miguel Klein (OLIVEIRA, 2005). O parque está localizado em uma região estratégica, com o objetivo de proteger a biodiversidade e os mananciais que abastecem a Grande Florianópolis e as cidades do sul do estado (KLEIN, 1981), além da preocupação com os avanços da exploração madeireira para o litoral, já que os recursos florestais do planalto estavam se esgotando pela intensa atividade desde os anos 40 e 50 (SCHMITZ, 2003). É importante lembrar que na época da criação do PEST existia cerca de 70 serrarias dentro e no entorno do parque, utilizando madeira quase que exclusivamente das terras do parque (GAIO, 2005).

Sua área abrange os municípios de Florianópolis, Palhoça, Santo Amaro da Imperatriz, Águas Mornas, São Bonifácio, São Martinho, Imaruí e Paulo Lopes. Além disso, fazem parte do parque as ilhas do Siriú, dos Cardos, do Largo, do Andrade e do Coral, e os arquipélagos das Três Irmãs e Moleques do Sul (KLEIN, 1981).

O PEST possui cinco das seis grandes formações florestais deste bioma encontradas no estado: manguezal, restinga, floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista e campos altitude, caracterizando muito bem estes cinco ecossistemas, além de contemplar uma ampla diversidade de habitats. Por essa razão, abriga uma biodiversidade ainda maior que seus 84.130 hectares poderiam sugerir (ROSÁRIO, 2003), sendo que cada ecossistema apresenta sua fauna e flora características, assim como suas espécies dominantes.

Dentre os tipos de solo encontrados no PEST há o predomínio do tipo Cambissolo Háplico que representa cerca de 79,5% da área total do parque. Esses incluem solos rasos e localizados em áreas declivosas. Os afloramentos rochosos ocupam 7,9% da área, com distribuição na parte norte. Os Neossolos Litólicos ocupam 5,5% da área, situados na parte oeste. Outros predomínios ocorrem em menor proporção, como Argissolos, Neossolos Quartzarênicos, Gleissolos Háplicos, solos indiscriminados de mangue, Organossolos Mésicos, dunas e areias de praias, além de corpos hídricos e ilhas (EMBRAPA, 2004; IMA, 2018).

No entanto, embora muitas informações sobre diversidade vegetal e de animais da Mata Atlântica, inclusive no PEST, estejam disponíveis, não há estudos sobre a diversidade de microrganismos do solo no PEST.

3.3 IMPORTÂNCIA E ESTRUTURAÇÃO DOS MICRORGANISMOS NO SOLO

A biodiversidade microbiana cumpre funções importantes em praticamente todos os ecossistemas terrestres e possuem forte influência nos principais processos ecológicos (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016). No solo, os microrganismos são fundamentais na supressão de doenças em plantas, promovem o crescimento das plantas e estimulam mudanças na vegetação (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004). A atividade metabólica dos microrganismos está intimamente ligada à existência e a diversidade de seres vivos em todo planeta (MANFIO, 2003).

Nos solos de FOD os processos metabólicos possuem alta eficiência e são exercidos em grande parte pelas comunidades microbianas (HANSEL et al., 2008; KASPARI et al., 2008), já que comumente os solos de florestas caracterizam-se pela baixa fertilidade, mas com alto índice de decomposição de matéria orgânica, perda de nutrientes pouco efetiva por lixiviação e ciclo de nutrientes elevado (SILVA et al., 2007). Em áreas de FOD em Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Miranda; Canellas; Trindade Nascimento (2007) encontraram solos com fertilidade muito baixa e matéria orgânica composta em menos de 50% por substâncias húmicas, indicando a serapilheira como fator principal na nutrição de plantas e microrganismos, além de solos com acidez elevada, como também verificada por Benites et al. (2010).

Dentre os principais microrganismos, destacam-se fungos e bactérias, que dominam os habitats do solo em termos de biodiversidade, biomassa e influência sobre processos essenciais do solo (BARDGETT; VAN DER PUTTEN, 2014), atuando na transformação de compostos orgânicos e inorgânicos complexos, tornando-os acessíveis ou inofensivos para outros organismos. Estes microrganismos participam da ciclagem de matéria orgânica, dos ciclos biogeoquímicos e da manutenção da fertilidade e estrutura dos solos (RASTOGI; SANI, 2011; DOCHERTY; GUTKNECHT, 2012). Segundo Wagg et al. (2014), a perda de biodiversidade do solo e a simplificação da composição das comunidades prejudicam várias funções do ecossistema, incluindo diversidade de plantas, decomposição, retenção de nutrientes e ciclagem de nutrientes.

Muitos fungos são saprofiticos e atuam na degradação de compostos aromáticos, lignina, celulose e hemicelulose e na formação e manutenção estrutural do solo. Alguns estudos apontam que a diversidade de fungos no solo possui importante influência nas propriedades do solo e das plantas (ROUSK et al., 2010; VAN DER HEIJDEN; HARTMANN, 2016), em que

a diversidade elevada de fungos e comunidades de composição complexas aumentam a taxa de decomposição dos nutrientes do solo, o que promove a absorção e a ciclagem de nutrientes (HISCOX et al., 2015; YAO et al., 2017). Nos estudos de Peay; Baraloto; Fine (2013), o aumento da riqueza de plantas está correlacionado à riqueza de fungos em ecossistemas de floresta tropical.

Os basidiomicetos possuem relevante papel no ciclo do C terrestre, sendo os decompositores dominantes da matéria orgânica recalcitrante em ecossistemas (BALDRIAN, 2016). Elementos desse grupo também já demonstraram em estudo de campo a habilidade em transferir N de madeira em decomposição para o solo (PHILPOTT et al., 2014). Adicionalmente, os fungos produzem substâncias antimicrobianas, como a descoberta do cientista Alexander Fleming em 1928, em que verificou a inibição do crescimento de uma cultura de *Staphylococcus aureus* por um fungo filamentosso do gênero *Penicillium* (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

As bactérias, além de atuar como saprófitas, possuem grupos que são importantes fixadoras de N, sejam simbióticas ou de vida livre, representando cerca de 95% do N fixado em ambientes naturais (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). Essas bactérias atuam como decompositoras de madeira morta no solo, aumentando os níveis de N (HOPPE et al., 2015). As bactérias simbióticas, caracterizadas como bactérias fixadoras de nitrogênio, penetram às raízes de plantas da família das leguminosas e formam nódulos, em que o nitrogênio atmosférico (N_2) é reduzido em nitrogênio amoniacal (NH_3) sendo disponibilizado à planta simbiote. Em contrapartida, a planta fornece metabólitos para que o processo possa ser realizado por esses microrganismos (MUNIZ; WORDELL; SACCOL, 2012). As bactérias atuam também com destaque na regulação do fluxo de C nos solos pela decomposição da biomassa de plantas mortas (XIA; PREGITZER, 2015), pela presença importante de endocelulases, exocelulases e β -glucosidases, além de um grupo diverso de hemicelulases, que hidrolisam outros polímeros presentes na biomassa das plantas (RYTIOJA et al., 2014).

Atribuições indispensáveis para a sustentabilidade e o funcionamento dos ecossistemas florestais são conferidas aos fungos, em que ocorre na forma simbiótica. Uma delas, é a associação denominada micorriza, que ocorre entre alguns fungos que circundam ou mesmo penetram as raízes da maioria das plantas, favorecendo a absorção de água e nutrientes como zinco, manganês e cobre, mas principalmente fósforo, recebendo da planta simbiótica, em contrapartida certos açúcares e aminoácidos que precisam para sobreviver. Os fungos

micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao Filo Glomeromycota, podem desenvolver relações simbióticas com a maioria das espécies de plantas (SPATAFORA et al., 2016).

Outra relação simbiótica importante, é a interação entre microrganismos endofíticos com as plantas, principalmente fungos e bactérias. Estes microrganismos vivem no interior das plantas, sem causar prejuízos ao hospedeiro (PETRINI, 1991) e estão relacionados ao controle biológico de fitopatógenos e pragas em plantas e como promotores de crescimento de plantas (HALLMAN et al., 1997; AZEVEDO et al., 2000).

Muitos estudos indicam que as propriedades físico-químicas do solo contribuem para diferenças na composição de comunidades bacterianas e fúngicas no solo. Dentre os fatores que modulam a estrutura das comunidades microbianas, o pH aparece com destaque para as comunidades bacterianas, em que a diversidade está correlacionada mais fortemente com o gradiente de pH do que outros fatores ambientais (LAUBER, 2009), podendo esta influência estar diretamente relacionada à tolerância de crescimento relativamente estreita da maioria dos táxons bacterianos (ROUSK et al., 2010). Entretanto, outros fatores também mostraram que podem influenciar significativamente a composição de comunidades bacterianas, como a disponibilidade de nutrientes (LEFF et al., 2015).

Do mesmo modo, fatores como o tipo de vegetação, inclusive na Mata Atlântica, (LAMBAIS et al., 2014; PROBER et al., 2015) e temperatura (ZHOU et al., 2016) mostraram que também podem moldar comunidades bacterianas. Igualmente, fatores climáticos e a vegetação tiveram influência significativa na composição de comunidades fúngicas (TEDERSOO et al., 2014, 2016). O estudo de Yang et al. (2017) encontrou no carbono orgânico e na riqueza de plantas fatores significativos para explicar a diversidade de fungos. Em estudo na Mata Atlântica, os FMA tiveram como fator principal na determinação da estrutura de comunidades a fitofisionomia dos ecossistemas amostrados (DUARTE et al., 2018).

Além de tendências sazonais gerais, a atividade microbiana do solo é muito sensível e acaba sendo altamente inconsistente em uma escala de tempo mais curta por conta de momentos específicos, como as chuvas, o derretimento de neve (não é o caso para a maioria dos locais do Brasil), os ciclos de congelamento e descongelamento, as atividades de animais e de raízes (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015).

Embora a importância dos microrganismos na conservação e manutenção dos ecossistemas, nos ciclos biogeoquímicos seja reconhecida, a preservação do bioma e o conhecimento dos microrganismos possibilitam a realização de pesquisas para a obtenção de biomoléculas de uso nas diversas áreas da biotecnologia. Nestas pesquisas pode-se identificar

compostos para obtenção de novos biocatalizadores, novos antibióticos, medicina personalizada e biorremediação. Há uma ampla demanda por novas enzimas e biocatalizadores, por exemplo as celulases, que catalisam a hidrólise de celulose e são usadas para reciclagem de papel, processamento do algodão, extração de suco, entre outros usos.

A prospecção de enzimas como amilases, lipases, proteases e xilanases com tolerâncias a certas características específicas, como pH ácido ou alcalino, temperaturas extremas, entre outras, a partir da utilização de técnicas independentes de cultura passou a ser uma abordagem promissora para o avanço da biotecnologia. Da mesma forma, a produção de biosurfactantes e antibióticos trouxe esperança para problemas de vazamento de petróleo e resistência a antibióticos (BASHIR; PRADEEP SINGH; KUMAR KONWAR, 2014).

Embora a importância desses organismos seja amplamente reconhecida, estudos de levantamento de espécies e de esclarecimento dos seus papéis funcionais ainda são reduzidos (MUMMEY et al., 2010).

3.4 TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS NO SOLO

Para a caracterização de microrganismos, técnicas de cultivo e isolamento têm sido empregadas. Porém, se mostraram pouco eficientes para caracterizar toda a comunidade de microrganismos, sendo que a maior parte dos microrganismos do solo não se desenvolvem em meios de cultura padrão e disponíveis comercialmente (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002), em que apenas os microrganismos com habilidades de desenvolvimento em meios aeróbios e com altas concentrações de nutrientes eram dessa forma selecionados (HUGENHOLTZ, 2002; RASTOGI; SANI, 2011).

A utilização de técnicas moleculares para superar as dificuldades de cultivo para a caracterização de comunidades de microrganismos no ambiente possibilitaram o alcance de uma maior diversidade microbiana nos ecossistemas. Geralmente são baseadas na extração de DNA e na PCR, utilizando iniciadores previamente desenhados e sintetizados, permitindo o estudo de comunidades e identificação dos microrganismos (RASTOGI; SANI, 2011).

Regiões do gene RNA ribossomal (RNAr) são as mais utilizadas como cronômetros moleculares, pois ocorrem em todos os organismos, com diferenças em suas sequências que permitem inferir relações filogenéticas entre os grupos. As moléculas de RNAr são pouco afetadas pela transferência horizontal de genes, o que caracteriza a presença de sequências conservadas e permite o desenho de iniciadores e sondas de hibridização específicos, a fim de

explorar taxonomicamente diferentes níveis de especificidade e descrever a filogenia da comunidade microbiana em diferentes habitats (ACINAS et al., 2004).

O gene RNAr 16S é amplamente utilizado como marcador filogenético bacteriano, pois intercala regiões conservadas e variáveis, está presente em todas as bactérias, desempenhando a mesma função, além de permitir a identificação de microrganismos pela presença de bancos de dados *online*, os quais permitem comparar as sequências e realizar afiliações filogenéticas. Outro ponto importante é o fato do gene RNAr 16S ser pouco afetado por mudanças ambientais, além de ser de fácil manipulação e possuir tamanho suficiente para ser utilizado em inferências filogenéticas (ACINAS et al., 2004; TAVARES, 2014).

Já para fungos, a região do RNAr apresenta-se em um agrupamento gênico composto pelo gene 18S/SSU, o gene 5,8S e o gene 28S/LSU, respectivamente, separados por regiões espaçadoras denominadas ITS I e ITS II. A região ITS é a mais utilizada em inferências filogenéticas, pois além de possuir uma alta variação interespecífica, é constituída por regiões alternadas de segmentos conservados, possui um grande número de cópias no genoma, as quais são relativamente curtas, facilitando sua amplificação, bem como, por ser a região do genoma fúngico com maior número de sequências depositadas em bancos de dados mundiais, permitir a classificação filogenética da maioria das sequências. Desse modo, a região ITS é aplicada na diferenciação de organismos distantemente relacionados, ou mesmo para discriminar gêneros e espécies que constituem relações filogenéticas mais próximas (LIMA, 2012).

Alternativamente, para o estudo da estrutura das comunidades microbianas em amostras ambientais utilizam-se técnicas de *fingerprint*, em que a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) é uma das técnicas mais bem estabelecidas em ecologia microbiana (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; BOON et al., 2002). Essa técnica é comumente usada para fornecer um perfil de bandas que representa a estrutura genética e a diversidade estrutural em uma comunidade microbiana de um ambiente específico, com confiabilidade, velocidade, facilidade e reprodutibilidade (MUYZER; SMALLA, 1998).

A técnica da PCR-DGGE baseia-se na amplificação por PCR de fragmentos de DNA de fita dupla com mesmo tamanho, os quais são obtidos a partir da utilização de iniciadores específicos para a região de interesse. Embora com fragmentos de tamanho idêntico, a sequência de nucleotídeos dos organismos avaliados é divergente. Estes fragmentos são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de agentes desnaturantes de ureia e formamida (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993; FAKRUDDIN; MANNAN, 2013;). Na separação das fitas de DNA no gradiente desnaturante, os fragmentos

migrarão diferencialmente de acordo com o seu teor de G+C, formando um padrão de bandejamento distinto quando houver diferença na estrutura da comunidade de determinados ambientes (RASTOGI; SANI, 2011) e também de acordo com a posição dos pares de G+C ao longo da molécula (MARZORATI et al., 2008).

A técnica de DGGE possui também limitação quanto ao tamanho, de 100 a 500 pb, que pode afetar o desenho da sonda e análises filogenéticas, enquanto a análise de *fingerprint* por DGGE assume que o número de bandas reflete a diversidade de microrganismos na amostra. (MARZORATI et al., 2008; PITERINA; PEMBROKE, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS ÁREAS E AMOSTRAGEM

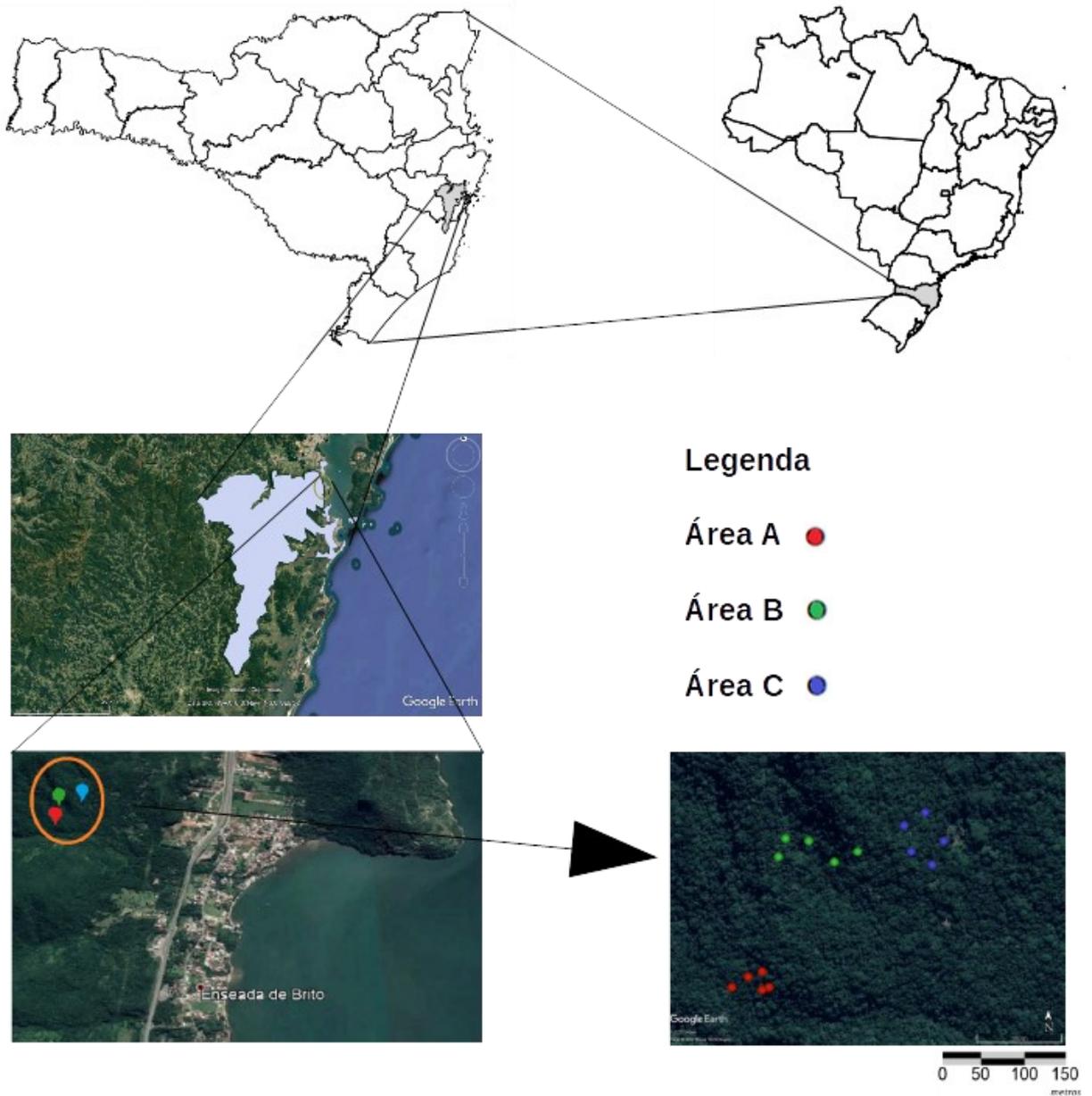
Para avaliar a estrutura das comunidades de bactérias e fungos do solo foram selecionadas três áreas representativas de floresta ombrófila densa submontana conforme classificação do IBGE (2002) no PEST, próximas ao distrito de Enseada de Brito no município de Palhoça, SC (Figura 1), com altitude variando entre 80 e 115 m. O tipo de solo característico é o Cambissolo Háplico (EMBRAPA, 2004; IMA, 2018). O local possui clima temperado úmido e com verão quente, classificado como Cfa de acordo com a classificação de Köppen-Geiger (ALVAREZ et al., 2013). A temperatura média dos 30 dias anteriores à coleta do período do verão foi de ~20 °C e do período de inverno de ~17,6 °C. Já a precipitação acumulada nos 30 dias anteriores à coleta foi de 221,9 mm no verão e de 127,9 mm no inverno (INMET, 2020)

No local de coleta foram estabelecidas 3 áreas de 100 x 100 m, nomeados por área A, B e C, com cinco pontos amostrados de maneira aleatória e georreferenciados. Os pontos de coleta de cada área foram compostos por 12 subamostras, nas quais quatro subamostras foram coletadas em um raio de 3 m e oito em um raio de 6 m do ponto central georreferenciado (Figura 2, Tabela 1), com o objetivo de obter uma amostra homogênea e representativa de cada área.

Um total de 30 amostras de solo foram analisadas neste estudo, com 5 amostras compostas para cada uma das 3 áreas no ecossistema, incluindo amostragem no inverno e no verão. As amostras foram coletadas com trado na camada de 0-20 cm, acondicionadas em sacos plásticos estéreis tipo Nasco® e mantidas a 4 °C durante o deslocamento, sendo armazenadas a -80 °C para análises moleculares e a 4 °C para as análises químicas. As coletas foram realizadas nos dias 13 de março de 2013 (verão) e 25 de junho de 2014 (inverno).

Este estudo está vinculado ao projeto de pesquisa intitulado “Diversidade e biogeografia de fungos e bactérias do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, SC: Uma visão conservacionista”, fomentado via Edital FAPESC nº 02/2012, Valorização da Biodiversidade Catarinense: Unidades de Conversação. Programa Biodiversidade do Estado de Santa Catarina.

Figura 1. Localização do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro e dos pontos de coleta.



Fonte: Adaptado do Google Earth Pro e IMA.

Figura 2. Esquema de coleta das amostras de solo por ponto de amostragem.

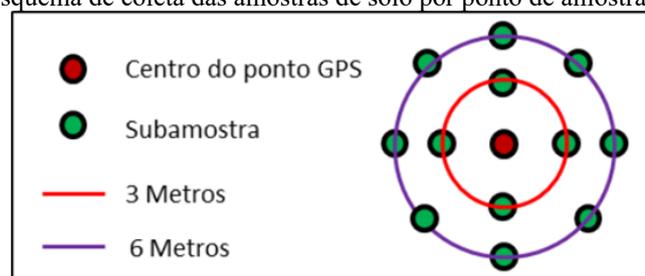


Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta do solo realizados no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST) em duas estações do ano (Verão e Inverno) em área de floresta ombrófila densa submontana (FOD). Áreas A, B e C.

Áreas	Amostras	Coordenadas geográficas
A	FOD_A1	27°46'05.5"S 48°38'31.9"W
A	FOD_A2	27°46'05.6"S 48°38'32.2"W
A	FOD_A3	27°46'04.9"S 48°38'32.2"W
A	FOD_A4	27°46'05.1"S 48°38'32.8"W
A	FOD_A5	27°46'05.5"S 48°38'33.5"W
B	FOD_B1	27°46'00.5"S 48°38'31.5"W
B	FOD_B2	27°45'59.8"S 48°38'31.2"W
B	FOD_B3	27°45'59.9"S 48°38'30.2"W
B	FOD_B4	27°46'00.7"S 48°38'29.1"W
B	FOD_B5	27°46'00.3"S 48°38'28.1"W
C	FOD_C1	27°45'59.3"S 48°38'26.1"W
C	FOD_C2	27°45'58.8"S 48°38'25.2"W
C	FOD_C3	27°46'00.3"S 48°38'25.8"W
C	FOD_C4	27°46'00.8"S 48°38'24.9"W
C	FOD_C5	27°45'59.9"S 48°38'24.4"W

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO

Para a caracterização química das amostras de solo do PEST, foram analisados os seguintes parâmetros: pH H₂O, acidez potencial (H + Al), matéria orgânica do solo (MOS), fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), alumínio (Al) e teor de argila. As análises foram realizadas previamente em parceria com o Laboratório de Análises Químicas do Solo e Calcário da UDESC/Lages.

Para realização das análises, as amostras de solo foram secas em estufa a 40 °C e peneiradas em malha de 2 mm. Foram pesados 10g de solo para determinar o pH H₂O, onde adicionou-se 25 mL de água destilada e em seguida a solução foi agitada e deixada em repouso por 40 minutos. Após esse período, a solução foi agitação novamente e realizada a leitura do pH, seguindo metodologia proposta pela EMBRAPA (2011). A determinação de H + Al seguiu o método de Vettori (1969), em que foi realizada a extração com acetato de cálcio 1,0 mol L⁻¹. A determinação do teor de MOS foi feita segundo o método Walkley-Black (ALLISON, 1965) que realiza a oxidação do Carbono (C) por K₂Cr₂O₇ e H₂SO₄ com aquecimento externo. O teor

de Argila foi determinado pelo método do densímetro (TEDESCO et al., 1995), em que foi utilizado o volume de 10 mL de solo e 15 mL de NaOH e 50 mL de água.

Para a determinação de P, Na e K utilizou-se a medida de 3 mL de solo em que foi adicionado 30 mL da solução extratora P-A (Mehlich-1). Após agitação da solução, esta foi deixada para repouso por 15 a 18 horas. O sobrenadante foi utilizado no fotômetro de chama para determinar a intensidade da emissão de Na e K, já para P a determinação foi realizada por colorimetria (TEDESCO et al., 1995; CQFS-RS/SC, 2004). A determinação de Ca, Mg e Al seguiu metodologia recomendada por Tedesco et al. (1995), em que 50 mL de KCl 1M foram adicionados ao solo, num volume final de 2,5 mL. Os frascos foram vedados, agitados por 2 horas e deixados para decantar por 24 horas, então o sobrenadante foi utilizado.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

4.3.1 Extração do DNA total

Para a extração do DNA total foi utilizando o Kit de extração “Power Soil Isolation Kit” (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X a 60 V por 45 min. e corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil). Para a obtenção das imagens dos géis foi utilizado um transiluminador KASVI UV SN (Taiwan).

4.3.2 Análise de PCR-DGGE

A análise da estrutura de comunidades de microrganismos do solo foi realizada por PCR-DGGE, por meio da amplificação de marcadores taxonômicos de bactérias e fungos. A região V3 do gene RNAr 16S de Bactéria foi amplificada utilizando-se os *primers* universais BAC338F-GC e UN518R (OVREÅS et al., 1997), em uma solução tampão para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase, 0,4 μM dos *primers* e 10 ng do DNA total numa reação final de 25 μL. As condições de amplificação foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min 55 °C e 1 min a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C.

A região ITS do RNAr de fungos foi amplificada empregando a metodologia *nested* PCR, primeiramente com os *primers* ITS1-GC e ITS4 (WHITE et al., 1990), com as concentrações nas mesmas condições que para bactérias, exceto o volume final que foi ajustado para 10 µL. As condições de amplificação foram de 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C.

Na segunda reação de PCR foram usados os iniciadores ITS1-GC e ITS2R (WHITE et al., 1990). As concentrações foram as mesmas utilizadas anteriormente, exceto pelo uso de 1 µL do produto da primeira amplificação como DNA *template* e realizada com volume final de 25 µL. Na terminação 5' dos *primers forward* foi acrescentado um grampo CG (*CG clamp*) para aumentar a estabilidade dos *amplicons* durante a corrida de DGGE (MYERS et al., 1985; MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

A verificação e a aquisição das imagens dos géis foram realizadas nas mesmas condições e aparelho para aferição e documentação do DNA total. O sentido e a sequência dos *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 2.

Os produtos amplificados das comunidades de bactérias e fungos foram analisados por meio de eletroforese em gel com gradiente desnaturante, utilizando um aparelho DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os géis de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) utilizados continham concentração de 8% para bactérias e 6,5% para fungos, em um gradiente de formamida (40%) e ureia (7 M) (OVREÅS et al., 1997). Os gradientes de desnaturação utilizados para as comunidades de bactérias foram de 30 a 60% e para fungos de 25 a 65%. A eletroforese foi realizada a 60 V e 60 °C constante por 14 horas, utilizando um tampão TAE 1X. Foi utilizado marcador de peso molecular 100 pb (Gendirex, Taiwan). Os géis foram corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e as imagens foram produzidas pelo fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, California, USA).

Tabela 2. Relação dos *primers*, região alvo, sentido e sequência utilizados na amplificação do DNA total extraído das amostras de solo do PEST.

Primer	Sentido	Região alvo	Sequência do primer
338-GC*	sense	RNAr 16S - Bactéria V3	5' E5:E9ACGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'
518	antisense	RNAr 16S - Universal V3	5' ATTACCGCGGCTGG 3'
ITS1-GC*	sense	RNAr 18S - Fungos	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS2	antisense	RNAr 5,8S - Fungos	5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3'
ITS4	antisense	RNAr 28S - Fungos	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
* Grampo GC			5' GCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGC 3'

4.3.3 Análises Estatísticas

Os perfis de bandas das comunidades bacterianas e fúngicas da DGGE foram analisadas com o programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica). As canaletas foram identificadas e as bandas com o marcador de peso molecular foram utilizadas como referência para normalização. O programa identificou as bandas por meio da intensidade, e na sequência examinadas manualmente para correção quando necessário. No programa BioNumerics 7.6 foi gerado uma matriz de presença e ausência para as análises estatísticas.

A relação entre as estruturas das comunidades das unidades amostrais foi comparada entre os grupos e nas estações verão e inverno por meio de uma análise de coordenadas principais (PCoA). O pacote “vegan” (OKSANEN et al., 2013) foi utilizado para a análise por PCoA e o pacote “ggplot2” para geração dos gráficos no programa estatístico R. Foi utilizado também o pacote “vegan” para construir o dendrograma a partir da similaridade das bandas, utilizando-se o índice de Sorensen-Dice e o modelo de agrupamento por UPGMA.

Para discriminação dos grupos foram analisadas as diferenças entre o valor médio de similaridade entre as amostras dentro dos grupos e entre os grupos, a partir da análise de similaridade (ANOSIM) usando o programa PAST v. 3.26b (HAMMER et al., 2013), em que R assume valores que indicam as diferenças que separam as estruturas de comunidades microbianas que variam numa escala de 0 a 1. De acordo com o manual do programa *Primer5* (CLARKE; GORLEY, 2001), os valores de $R > 0,75$ indicam grupos significativamente diferentes, $R > 0,50$ grupos com sobreposição, mas diferenciados, $R < 0,50$ grupos com elevada sobreposição e $R < 0,25$ grupos pouco distintos.

A correlação entre a estrutura de comunidades e as variáveis físico-químicas do solo foram avaliadas pela análise de redundância baseada em distância (dbRDA) (LEGENDRE; ANDERSON, 1999). Utilizou-se a standardização dos dados físico-químicos do solo antes de

rodar a dbRDA no programa R, pacote “vegan”. As variáveis físico-químicas foram selecionadas utilizando o valor do VIF (*Variance Inflation Factor*) abaixo de 10 e analisadas quanto ao efeito sobre a estrutura de comunidades de bactérias e fungos do solo utilizando uma PERMANOVA (BORCARD; GILLET; LEGENDRE, 2011; OKSANEN et al., 2016). O gráfico foi gerado com auxílio do pacote ggplot2.

Os intervalos de confiança para as variáveis físico-químicas do solo foram gerados no programa R v 3.6.1 (R Development Core Team, 2008) com o pacote Rmisc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATRIBUTOS FÍSICO-QUÍMICOS DO SOLO

As amostras apresentaram valor de pH em água baixo (< 4) não diferindo entre as áreas, nem entre as estações, evidenciando acidez elevada nas duas estações nos locais amostrados. Em outros trabalhos em áreas de FOD em Mata Atlântica também foram observados solos de pH baixos (MIRANDA; CANELLAS; TRINDADE NASCIMENTO, 2007; BENITES et al., 2010), demonstrando que esses ambientes têm uma tendência de apresentarem solos com acidez pronunciada. O Al é o metal encontrado em maior quantidade nos solos brasileiros e sua toxicidade é elevada em solos com pH abaixo de 5,0, mas a toxicidade pode também estar relacionada à carência de Ca^{+2} e Mg^{+2} , além da baixa disponibilidade de P (MIGUEL et al., 2010). Os níveis de Al não diferiram entre as áreas nem entre as estações do ano e foram considerados altos, o que é esperado para solos Cambissolos háplicos (DADALTO; FULLIN, 2001; SÁ, 2007; SOBRAL et al., 2015).

Os teores de Na não diferiram entre as áreas nem entre as estações do ano, sendo os teores de sódio nos solos baixos em áreas de alto intemperismo (SOBRAL et al., 2015). Em locais onde os teores de sódio são mais altos, esses estão relacionados à redução de algumas espécies vegetais, de acordo com a tolerância da espécie e a redução da fertilidade do solo (FERREIRA et al., 2001; D'ALMEIDA et al., 2005), o que não ocorre nas áreas estudadas neste trabalho.

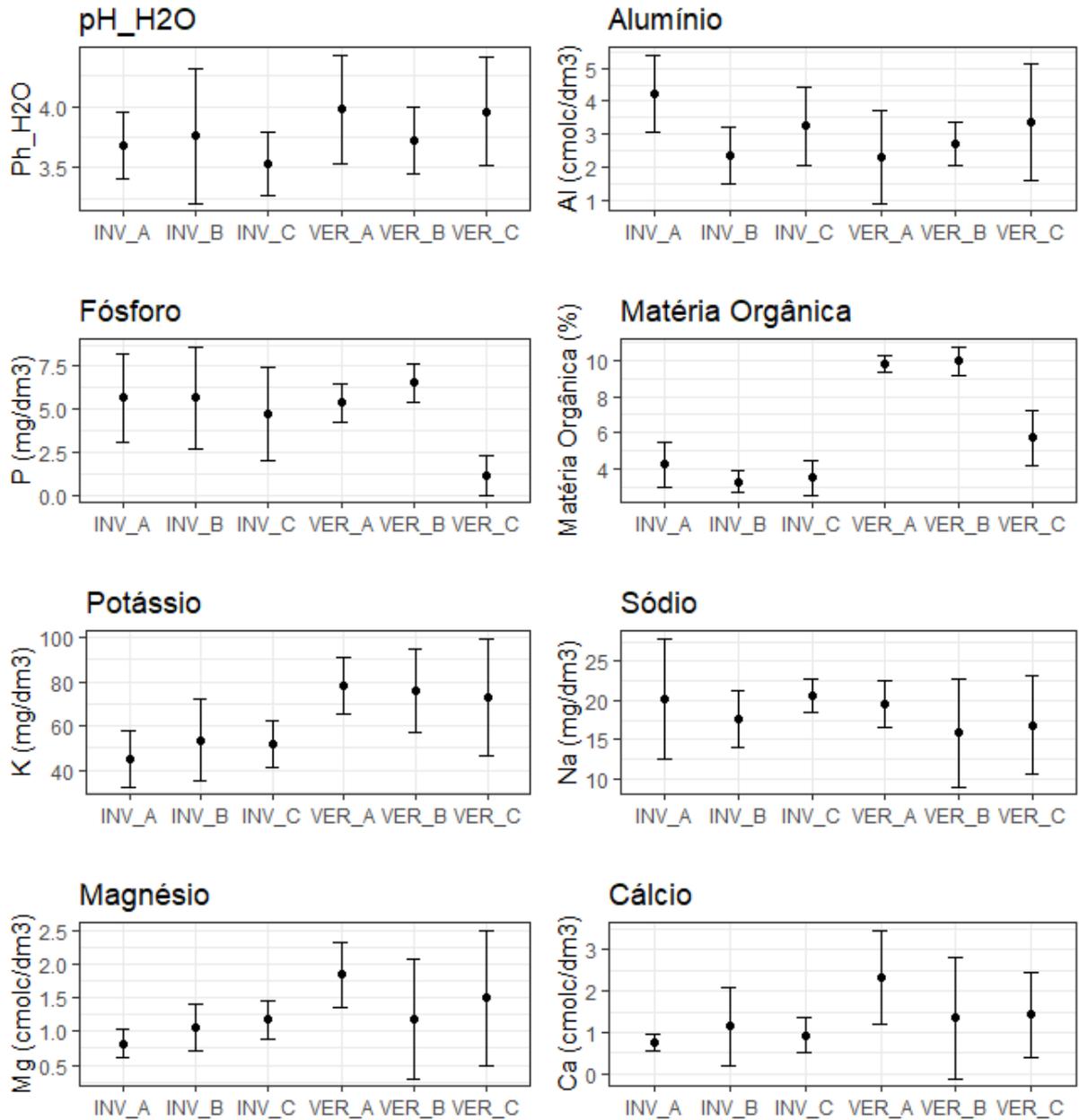
Neste estudo o teor de MOS (%) diferiu entre o verão (entre 5,9 e 10%) e o inverno (~4%), em que no verão o teor de MOS foi considerado alto e no inverno médio. A MOS é abastecida principalmente por plantas, com destaque para as folhas, mas também por raízes, sementes e galhos (FRESCHE et al., 2013) e na mesma época do ano em que há alto teor de MOS e que possui temperaturas mais elevadas ocorre também uma maior decomposição da MOS pela atividade microbiana (ZHU; CHENG, 2010). Estudos realizados em áreas de FOD apresentaram elevadas taxas de deposição e decomposição de serapilheira nos períodos de temperatura mais elevada e maior índice de precipitação (BIANCHIN et al., 2016; SANTOS, 2017), sendo então incorporados ao solo e corroborando os teores de MOS apresentados por este trabalho no período de temperatura mais elevada.

O teor de P apresentou diferença entre as áreas de verão, mas não diferiu nas áreas de inverno, sendo considerado baixo em quase todas as áreas, já que o solo possui classe textural

3 de acordo com o teor de argila (CQFS-RS/SC, 2004). Cerca de 80 % do estoque de P em florestas tropicais encontra-se na serapilheira, que necessita da mineralização para o fornecimento aos microrganismos e plantas, além de ser o segundo elemento em maior quantidade na MOS (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O teor do K apresentou similaridade entre as 3 áreas, mas diferiu entre as duas estações. O índice apresentado no verão foi considerado alto e no inverno considerado médio (CQFS-RS/SC, 2004).

O teor de Mg apresentou diferença na área A entre o período de inverno e verão, mas não diferiu no restante das áreas, sendo considerado teor médio apenas na área A de inverno e alto no restante das áreas no inverno e verão (CQFS-RS/SC, 2004). O teor de Ca apresentou diferença na área A entre o período de inverno e verão e não diferiu no restante das áreas, sendo considerado o teor na área A de verão médio e baixo no restante das áreas nas duas estações (CQFS-RS/SC, 2004). O total de bases trocáveis disponível no solo, como Mg e Ca estão associadas à qualidade da serapilheira (LLADÓ; LÓPEZ-MONDÉJAR; BALDRIAN, 2018) (Figura 3). Além dos atributos físico-químicos do solo já mencionados anteriormente, o índice SMP, CTC efetiva, saturação por bases (%), carbono orgânico, relação Ca:Mg e saturação por Al tiveram seus índices analisado, mas foram retirados do teste de correlação com as estruturas de comunidades bacterianas e fúngicas por possuírem $VIF > 10$, o que indica colinearidade entre si (BORCARD; GILLET; LEGENDRE, 2011).

Figura 3. Atributos físico-químicos do solo da floresta ombrófila densa submontana (FOD) do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST).



Legenda. Médias de cada área com intervalo de confiança a 95%.

5.2 ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

5.2.1 Estrutura das Comunidades Bacterianas

A partir do dendrograma produzido pelo perfil de bandas da PCR-DGGE foi possível identificar agrupamentos na estrutura das comunidades bacterianas dentro das áreas B e C no

período de verão e nas áreas A e C no inverno. No entanto, as áreas possuíam maior similaridade no período do inverno que no verão. As amostras da área A de inverno apresentaram maior similaridade entre si em relação às outras áreas das duas estações. Já a área A de verão foi a que apresentou maior heterogeneidade entre as áreas nas duas estações (Figura 4).

A PCoA e o teste de ANOSIM foram utilizados para comparar as diferenças entre as estruturas das comunidades bacterianas (Figura 5 e Tabela 3). Na PCoA foi identificado que a primeira coordenada explicou 17% e a segunda 9,1% das variações entre as estruturas de comunidades. A primeira coordenada da PCoA separa os grupos de inverno e de verão, o que pode ser confirmado pelo teste de ANOSIM com o valor de R global igual a 0,55, em que apresenta grupos com sobreposição de bandas, mas distintos. Quando comparadas as áreas entre as estações por *Pairwise*, a área C (R=0,36) foi a que apresentou maior similaridade entre as estações, enquanto a área B (R=0,95) foi a mais distinta. A segunda coordenada da PCoA separa os grupos B e C do grupo A no inverno e quando testados por *Pairwise* os grupos B e A (R=0,44) apresentam elevada sobreposição de bandas, mas os grupos C e A (R=0,83) indicam grupos significativamente distintos. Em relação as áreas de verão, a segunda coordenada da PCoA apresenta separação das áreas A e C da área B e quando testadas por *Pairwise* as áreas A e B (R=0,60) apresentam sobreposição de bandas, mas diferentes. Já as áreas C e B (R=0,40) indicam grupos com elevada sobreposição de bandas, assim como as áreas A e C (R=0,32).

A composição das comunidades microbianas presentes no solo é influenciada por diversos fatores descritos na literatura, em que a cobertura vegetal local pode ser um importante fator neste processo, onde as comunidades microbianas são influenciadas por associações com as plantas, composição da serapilheira e também por exsudados liberados pelas raízes. As plantas liberam parte do produto da fotossíntese no solo e se beneficiam da interação com os microrganismos, em que há aumento na disponibilidade de nutrientes, produção de hormônios vegetais, degradação de compostos fitotóxicos e supressão de patógenos no solo (BAIS et al., 2006; HAICHAR et al., 2008). Alguns estudos indicam que os exsudados das raízes das plantas moldam a estrutura de comunidades bacterianas na região da rizosfera (KOWALCHUK et al., 2002; BAIS, 2006), além de participar ativamente no incremento de MOS, influenciando assim as comunidades bacterianas de acordo com a especificidade da planta (BAIS et al., 2006; COSTA et al., 2006).

No presente trabalho há indícios da influência das diferentes espécies de plantas que compõe a FOD na diferenciação da estrutura das comunidades bacterianas, por conta da separação entre as áreas amostradas na mesma estação (Figura 5), já que este trabalho se ateuve

a mesma fitofisionomia e não a especificidade da cobertura vegetal. Isso se dá pelo fato das plantas, juntamente com os atributos químicos do solo, moldarem o teor de matéria orgânica e a diversidade microbiana do solo (WALDROP et al., 2017). Semelhante a este estudo, as estruturas de comunidades de duas áreas de FOD em Mata Atlântica no estado de São Paulo também apresentaram sobreposição moderada quando comparadas as estruturas de comunidades bacterianas por PCR-DGGE no mesmo período do ano, mas em altitudes diferentes entre elas (LIMA-PERIM et al., 2016).

Mesmo havendo diferenças entre as estruturas de comunidades de bactérias, grande parte das bandas encontradas foram comuns às duas estações analisadas, num total de 68 bandas compartilhadas. As áreas de inverno apresentaram 10 bandas exclusivas contra 2 do período de verão (Figura 6).

A variação temporal é outro aspecto abordado em alguns estudos em que exibem diferenças nas comunidades microbianas. Essas variações normalmente estão associadas a aspectos que conduzem a diferenças na estrutura e composição de comunidades microbianas, como as variações de temperatura, precipitação, serapilheira, comunidade vegetal, pH e outros aspectos químicos do solo (BELL et al., 2009; LAUBER et al., 2013; ZHOU et al., 2016; NOTTINGHAM et al., 2018; ZHANG et al., 2018). No presente trabalho, a influência da variação temporal na estrutura das comunidades foi perceptível na separação das áreas A, B e C entre as duas estações (Figura 5) e na diferença entre as bandas que apresentaram exclusividade em cada estação (Figura 6), em que provavelmente a maior diversidade estrutural de bactérias no período de inverno e as diferenças entre as estruturas de comunidades das duas estações deva ter ocorrido por conta da diferença da pluviosidade e temperatura entre o inverno e o verão. Comportamento semelhante visto neste estudo também foi encontrado por Lauber et al. (2013), que observaram padrões temporais significativamente distintos em comunidades bacterianas relacionados a temperatura e umidade do solo em áreas de cultivo e áreas de pradaria em estágio sucessional primário no estado de Michigan, nos EUA.

Outros estudos sugerem que a temperatura, chuvas e a umidade do solo estão associadas à maior ou menor abundância de alguns *taxa* dominantes e também diferenças na composição de comunidades bacterianas (VON REIN et al., 2016; HARTMANN et al., 2017; WARING; HAWKES, 2018) e, por conta disso, ocorra diferenças nos números de bandas entre as estações e as diferenças entre as estruturas de comunidades bacterianas (ROMANOWICZ et al., 2016; HAWKES et al., 2017). Outro aspecto que pode ter influenciado a diversidade estrutural de bactérias é a interação com os fungos, onde os resultados foram opostos em relação

à diversidade estrutural nas duas estações. A interação entre bactérias e fungos no solo foi observado por Rousk et al. (2008) e quando ocorria a inibição das comunidades bacterianas, as comunidades fúngicas eram estimuladas. Esse resultado é diferente daquele observado por De Gruyter et al. (2019), que não verificaram correlação entre bactérias e fungos do solo, mas encontraram correlação entre bactérias e protistas.

Figura 4. Dendrograma baseado nos perfis de bandas da região V3 do gene RNAr 16S de Bactérias do solo de FOD do PEST nos períodos de inverno e verão utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e o método de agrupamento UPGMA.

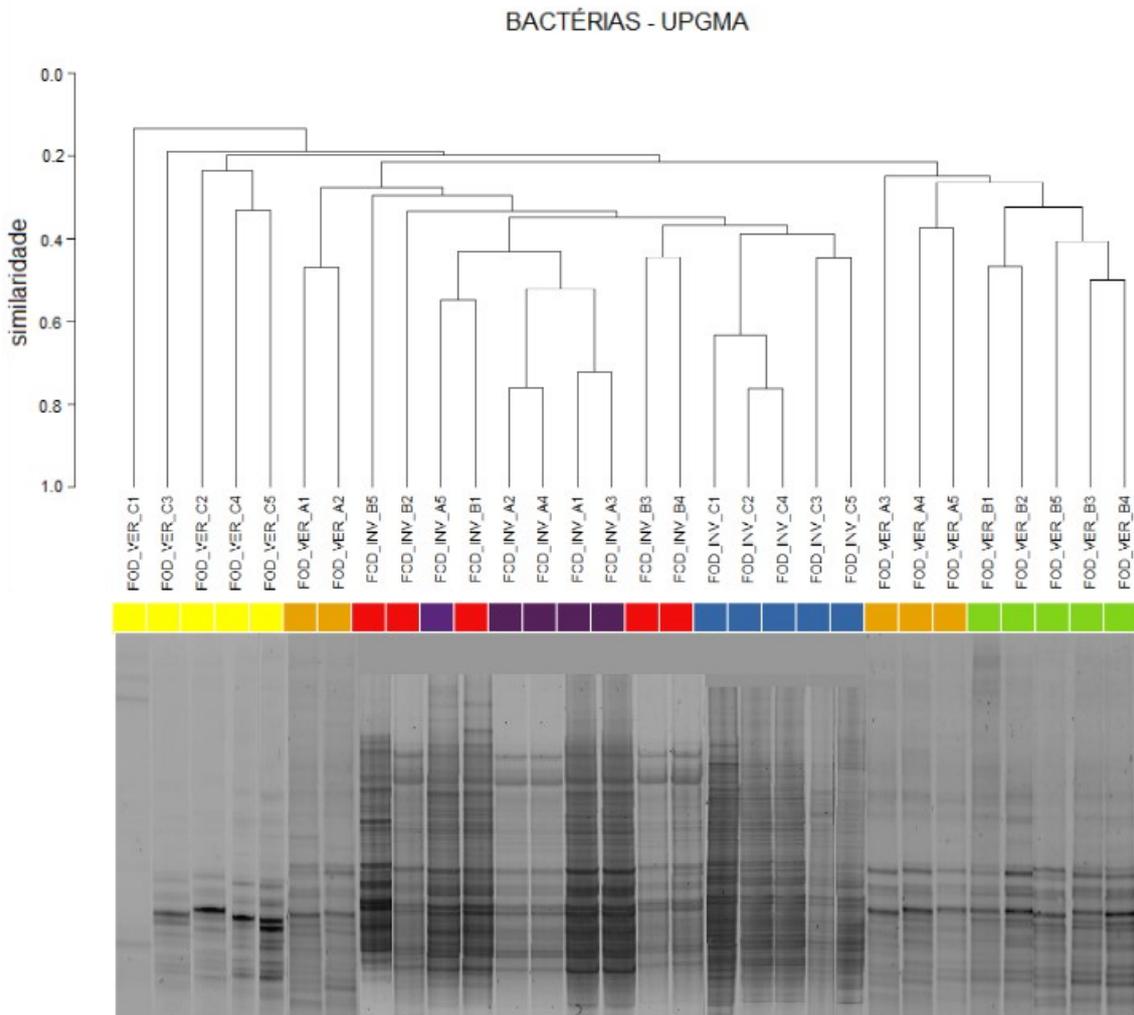


Figura 5. Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na estrutura de comunidades bacterianas obtidas por PCR-DGGE nas três áreas (A, B e C) de FOD do PEST nos períodos de inverno e verão utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e intervalo de confiança de 95%.

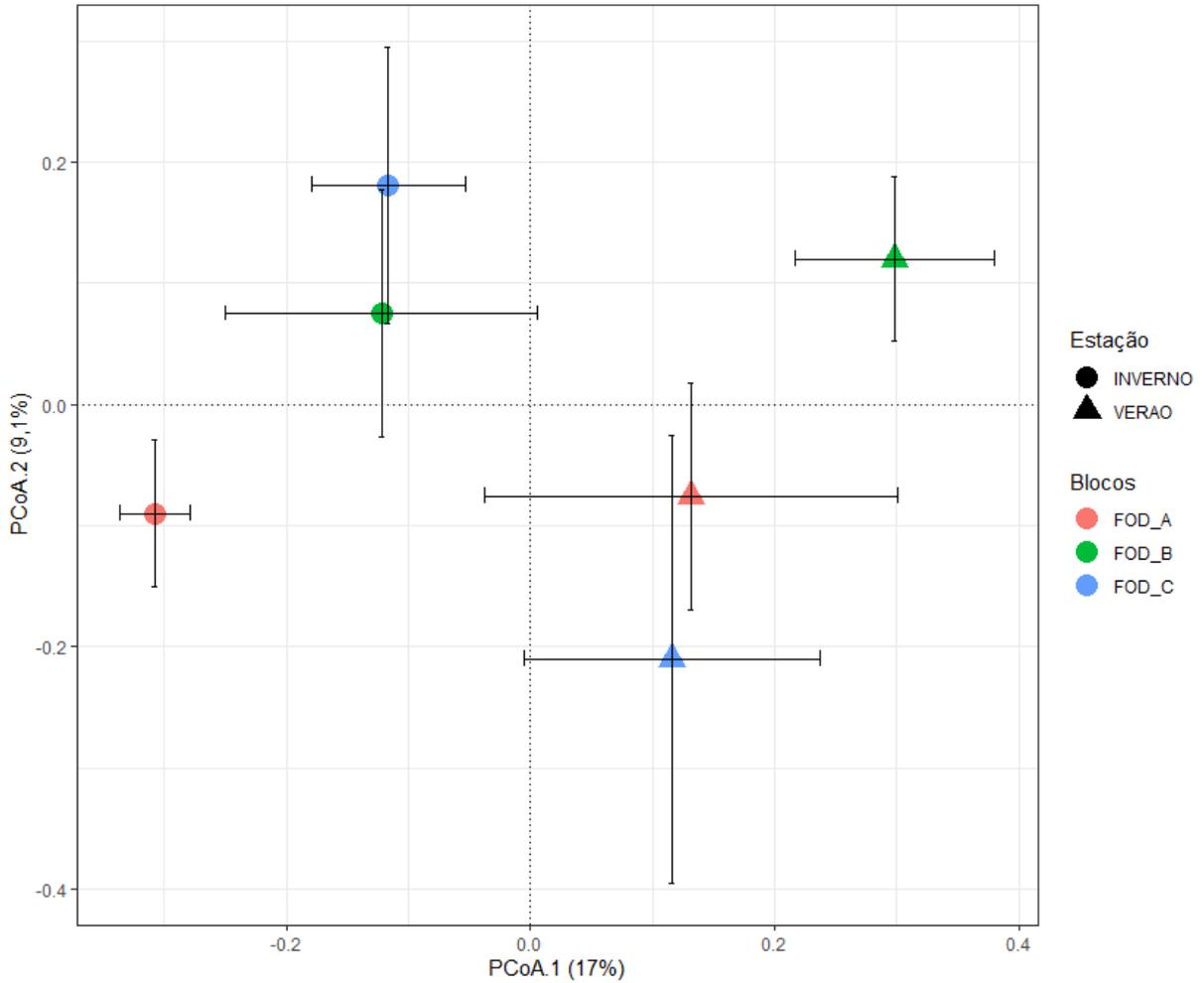


Tabela 3. Resultado do teste de ANOSIM por Pairwise baseado na PCR-DGGE de bactérias de amostras de solo de FOD do PEST coletadas no inverno e no verão utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice e cálculo do valor de p realizado com 9999 permutações.

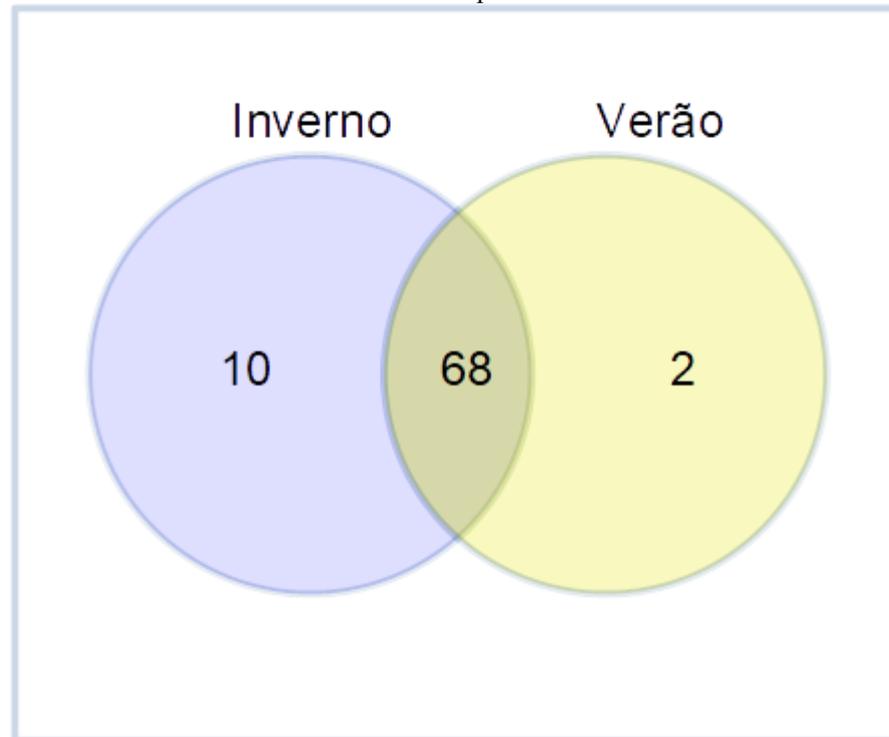
Teste de *Pairwise* Bactérias

Áreas	INV_A	INV_B	INV_C	VER_A	VER_B	VER_C
INV_A						
INV_B	0,44					
INV_C	0,83	0,22				
VER_A	0,75	0,67	0,59			
VER_B	1,00	0,95	0,91	0,60		
VER_C	0,34	0,42	0,36	0,32	0,40	-

R global=0,55; $p < 0,0001$

Resultados em negrito diferem estatisticamente.

Figura 6. Diagrama de Venn obtido da comparação das bandas da PCR-DGGE de bactérias das áreas A, B e C de FOD do PEST coletadas nos períodos de inverno e verão.



5.2.2 Estrutura das Comunidades Fúngicas

O dendrograma das estruturas de comunidades fúngicas demonstraram poucos agrupamentos dentro das áreas A, B e C nos períodos de inverno e verão. Todavia, observou-se semelhança entre a estrutura de comunidades de fungos de algumas amostras entre as três áreas de FOD dentro de cada estação, já que houve formação de pequenos agrupamentos entre unidades amostrais das diferentes áreas e consequente compartilhamento de bandas entre estas. Assim, as áreas apresentaram certa homogeneidade entre si em cada estação (Figura 7).

Assim como para bactérias, foi utilizado a PCoA e o teste de ANOSIM para verificar as diferenças entre as estruturas de comunidades fúngicas (Figura 8 e Tabela 4). Na PCoA foi identificado que a primeira coordenada explica 12,3% e a segunda 11,6% das variações entre as estruturas de comunidade. A Figura 8 demonstra que na primeira coordenada da PCoA os grupos de inverno e de verão estão separados, mas relativamente próximos, bem como no teste de ANOSIM que apresenta o valor de R global igual a 0,44, em que apresenta grupos com elevada sobreposição. A segunda coordenada da PCoA apresentou grupos similares nas áreas A, B e C, tanto entre as áreas de inverno quanto entre as áreas de verão, confirmado pelo teste

de *Pairwise* para as áreas de inverno que indicam elevada sobreposição de bandas entre si: Áreas A e B ($R=0,35$), Áreas A e C ($R=0,39$) e Áreas B e C ($R=0,40$). Para as áreas de verão os resultados diferiram estatisticamente ($p>0,05$).

Semelhante a esse estudo, os resultados de Talbot et al. (2014) mostram forte agrupamento geográfico de comunidades fúngicas, que é influenciado indiretamente pela fitofisionomia, como verificado em outros trabalhos (YANG et al., 2017; DUARTE et al., 2018). A influência das plantas deve-se principalmente pelo teor de C fornecido à MOS, sendo a fonte de C um fator determinante para as estruturas de comunidades e mudanças na riqueza nas comunidades fúngicas (HANSON et al., 2008; LIU et al., 2015). Estes dados justificam os fungos serem reconhecidos por sua importância no ciclo do C e na ciclagem de nutrientes. Adicionalmente, ajudam no entendimento sobre a sua distribuição. Neste estudo algumas unidades amostrais apresentaram similaridade com outras amostras de diferentes áreas e mesma estação. Possivelmente a determinação da estrutura de comunidades fúngicas dessas áreas similares se deu por conta da semelhança entre a MOS nessas unidades amostrais.

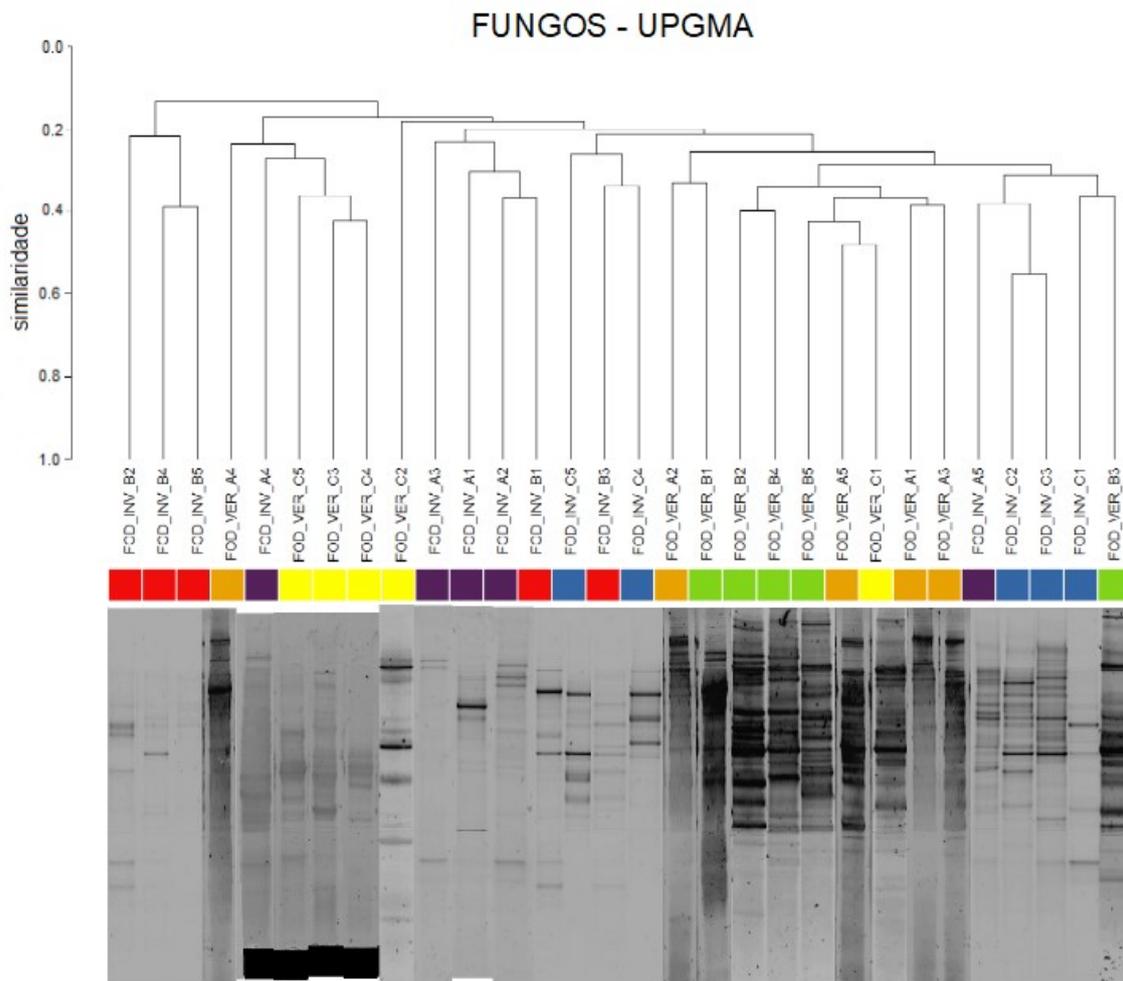
As estruturas de comunidades fúngicas das duas estações apresentaram grupos com sobreposição, o que pode estar relacionado com as características específicas dos grupos de fungos presentes nas áreas de FOD. Como observado por Bell et al. (2009), em que a estrutura de comunidades de fungos saprófitos se mantiveram consistentes ao longo das estações, independente da magnitude ou frequência de precipitações, mas diferente do ocorrido com a estrutura de comunidades de FMA, que tiveram mudanças entre as estações em áreas de campos no deserto de Chihuahan na China.

Mesmo tendo apresentando sobreposição moderada entre as estruturas de comunidades fúngicas e compartilhamento de 49 bandas, uma grande quantidade de bandas foram encontradas exclusivamente nas áreas de verão. Foram identificadas 25 bandas exclusivas no verão, com 1 banda exclusiva nas áreas de inverno (Figura 9). Essa situação é oposta à encontrada nas comunidades bacterianas. Como observado anteriormente no trabalho de Rousk et al. (2008), comunidades bacterianas quando inibidas acabam abrindo oportunidade para comunidades fúngicas prosperarem. Já De Gruyter et al. (2019) não observam correlação entre fungos e bactérias, mas correlação entre fungos e protistas.

A maior diversidade estrutural nas comunidades fúngicas no período de verão provavelmente deve ter ocorrido por conta da influência do teor de MOS, pluviosidade e temperatura mais elevadas nesta estação, assim como observado em alguns trabalhos (NEWSHAM et al., 2015; NOTTINGHAM et al., 2018), em que a temperatura foi a variável

mais consistente em relação ao aumento da diversidade de fungos do solo. Na primavera e no verão, estações de temperaturas mais elevadas, ocorrem maiores acúmulos de serapilheira e também maior taxa de decomposição de MOS em FOD (BIANCHIN et al., 2016; SANTOS, 2017) e isso auxilia a explicar as diferenças encontradas entre as estruturas de comunidades nas duas estações e também a maior diversidade estrutural observada no verão. Esse resultado tem relação com o fato dos fungos serem os principais decompositores da biomassa de plantas mortas no solo, com destaque para lignina e celulose, principalmente no primeiro estágio de quebra de polímeros de carboidratos (NOTTINGHAM et al., 2018).

Figura 7. Dendrograma baseado nos perfis de bandas da região ITS I de fungos do solo de FOD do PEST no período de verão utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e o método de agrupamento UPGMA.



A temperatura e a umidade no solo são importantes fatores que regulam a atividade e moldam comunidades microbianas (PAUL; CLARK, 1996) e os resultados obtidos neste trabalho demonstram alterações na diversidade estrutural das comunidades bacterianas e

fúngicas do solo nas duas estações estudadas e parecem estar de acordo com os resultados obtidos por Bell et al (2009), em que mudanças nas estruturas e funções das comunidades microbianas do solo faz com que os diferentes componentes da comunidade forneçam serviços ecossistêmicos semelhantes, mas com diferente resposta à temperatura e precipitação sazonais.

Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na estrutura de comunidades fúngicas obtidas por PCR-DGGE nas três áreas (A, B e C) de FOD do PEST nos períodos de inverno e verão, utilizando o coeficiente de similaridade Sorensen-Dice e intervalo de confiança de 95%.

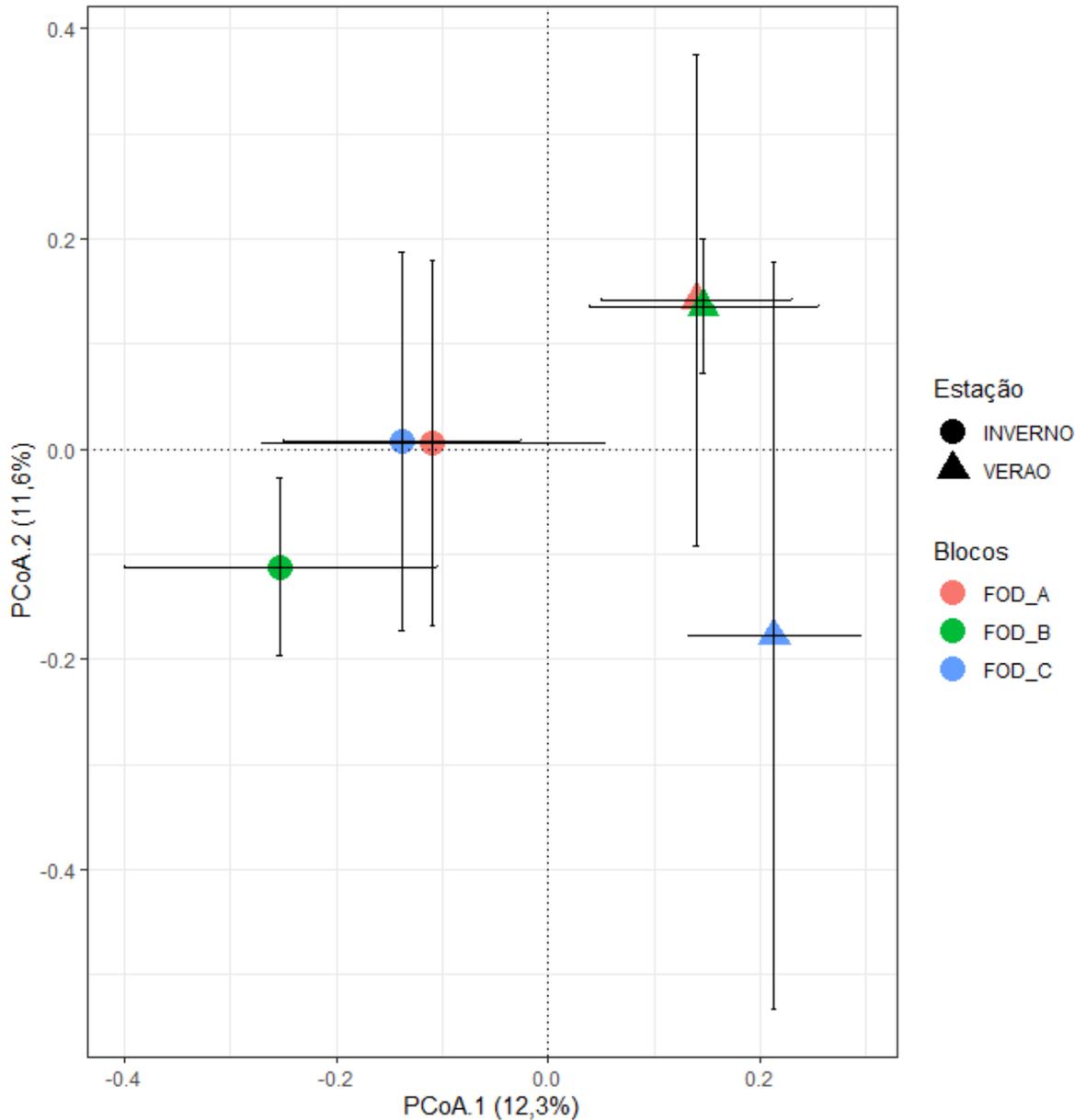
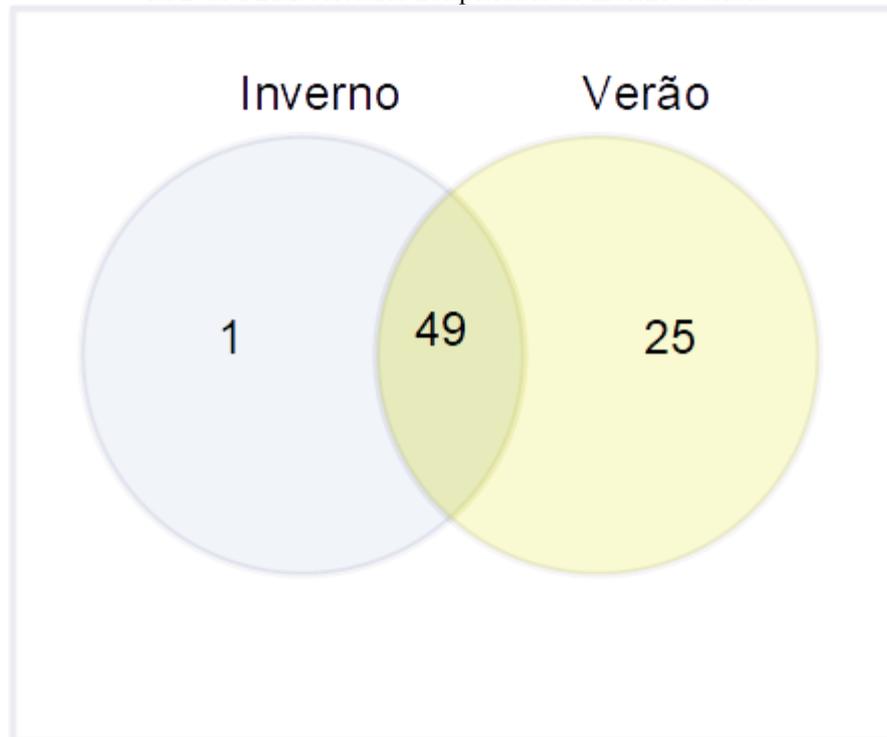


Tabela 4. Resultado do teste de ANOSIM por Pairwise baseado na PCR-DGGE de fungos de amostras de solo de FOD do PEST coletadas no inverno e no verão utilizando o coeficiente de Sorensen-Dice e cálculo do valor de p realizado com 9999 permutações.

Teste de <i>Pairwise</i> Fungos						
Áreas	INV_A	INV_B	INV_C	VER_A	VER_B	VER_C
INV_A						
INV_B	0,35					
INV_C	0,39	0,40				
VER_A	0,50	0,60	0,66			
VER_B	0,36	0,70	0,42	0,10		
VER_C	0,47	0,62	0,67	0,34	0,25	-

R global 0,44; $p < 0,001$
Resultados em negrito diferem estatisticamente.

Figura 9. Diagrama de Venn obtido da comparação de bandas da PCR-DGGE de fungos das áreas A, B e C de FOD do PEST coletadas nos períodos de inverno e verão.



5.2.3 Correlação entre a estrutura das comunidades microbianas e os atributos físico-químicos do solo

A avaliação de correlação dos atributos físico-químicos do solo e a estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas do solo nas áreas de FOD foi realizada por análise de redundância baseada em distância (dbRDA), utilizando o índice de Sorensen-Dice (Figura 10 e Figura 11). Nas comunidades bacterianas, pode-se observar correlação positiva quanto ao teor

de Al (PERMANOVA, $p < 0,03$) e a estrutura de comunidades de bactérias das áreas A, B e C de inverno e da área C de verão. Já o teor de MOS (PERMANOVA, $p < 0,01$) apresentou correlação positiva com a estrutura de comunidades nas áreas A, B e C de verão e na área A de inverno. A presença de Ca (PERMANOVA, $p < 0,01$) apresentou correlação positiva com a estrutura de comunidades nas áreas A, B e C de verão e nas áreas B e C de inverno. Os outros atributos do solo analisados não obtiveram correlação significativa para separar as amostras.

Já as estruturas de comunidades fúngicas apresentaram correlação com alguns atributos físico-químicos do solo nas áreas amostradas, sendo visualizada pela dbRDA e utilizando o índice de Sorensen-Dice. No eixo 1 da dbRDA (PERMANOVA, $p < 0,01$) a presença de P (PERMANOVA, $p < 0,04$) mostra correlação positiva com a estrutura de comunidades das áreas de inverno. O Mg (PERMANOVA, $p < 0,04$) e teor de MOS (PERMANOVA, $p < 0,01$) apresentaram correlação positiva com a estrutura de comunidades das áreas A, B e C de verão. O valor do eixo 2 não apresentou correlação significativa (PERMANOVA, $p > 0,05$). Os outros atributos do solo analisados não obtiveram correlação significativa para separar as amostras.

Alguns estudos já demonstraram que as bactérias possuem papel importante na decomposição de MOS (ŠTURSOVÁ et al., 2012; LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2016), que é provida principalmente por plantas (FRESCHET et al., 2013). No presente estudo o teor de MOS (%) apresentou porcentagem elevada no período de verão em relação ao inverno, o que colabora com os resultados observados, já que foi observada forte correlação entre o teor de MOS no verão e as estruturas de comunidades bacterianas e fúngicas, o que também é esperado por conta da maior decomposição da MOS nos períodos de temperatura mais elevada (ZHU; CHENG, 2010), além da maior deposição de serapilheira nesse período em FOD. No entanto, essa correlação não se reflete na maior diversidade estrutural nas comunidades bacterianas, já que apresentaram menor quantidade de bandas exclusivas no verão, mesmo estando no período de maior decomposição de MOS, fato esse semelhante ao observado por Gschwendtner et al. (2016) que encontraram menor diversidade de bactérias, mas oposto ao observado por Fransson et al. (2016) que encontraram maior diversidade de bactérias, ambos em períodos de maior decomposição de MOS e em floresta temperada.

Entretanto, para as comunidades fúngicas o teor mais elevado de MOS no verão está associado a um maior número de bandas exclusivas nesta estação, o que está de acordo com os resultados observados por Zhu et al. (2014), que observaram aumento da diversidade de fungos no solo em períodos com taxa de decomposição elevada, possivelmente por serem os principais

decompositores nos primeiros estágios de decomposição da serapilheira no solo (NOTTINGHAM et al., 2018).

Neste contexto, há um aumento na necessidade de Mg por parte dos microrganismos por conta dos processos biológicos essenciais da célula, como a estabilização dos ribossomos, membranas e ácidos nucleicos, além da importância às atividades enzimáticas e que garantem sua multiplicação (MADIGAN et al., 2010). Os fungos ectomicorrízicos (FECM) também fornecem Mg e outros nutrientes para a sua planta simbiote (JENTSCHKE et al., 2001; ROSENSTOCK et al., 2016). A liberação de Mg^{2+} no solo pode estar associada aos níveis mais elevados de translocação do Al por fungos e pela maior taxa de decomposição (LLADÓ; LÓPEZ-MONDÉJAR; BALDRIAN, 2018), que em FOD ocorre nos períodos de temperatura mais elevada, o que pode justificar a correlação positiva do elemento (Mg) com a estrutura de comunidades de fungos no verão.

Os solos de FOD em Mata Atlântica se caracterizam por acidez mais pronunciada, como demonstrado em outros trabalhos nesse bioma (MIRANDA; CANELLAS; TRINDADE NASCIMENTO, 2007; BENITES et al., 2010; FAORO et al., 2010) e nas análises realizadas por este trabalho. No entanto, o pH no solo é um fator amplamente estudado e reconhecido para a determinação da composição de comunidade bacterianas (LAUBER et al., 2009; ROUSK et al. 2010), mas considerando que houve similaridade em relação à acidez nas amostras de solo, não foi um fator determinante para diferenciar a estruturação das comunidades microbianas deste trabalho.

Entretanto, a acidez no solo influencia indiretamente sobre as comunidades microbianas, principalmente na estrutura das comunidades bacterianas neste trabalho, visto que é amplamente reconhecido que a acidez nos solos leva ao aumento da solubilidade do Al e a diminuição de Ca e Mg trocáveis (BAILEY; HORSLEY; LONG, 2005). O Al em solos ácidos eleva sua solubilidade e torna-se tóxico à microbiota do solo (PIÑA; CERVANTES, 1996), fato esse constatado por Rousk et al. (2010), que sugeriram que as alterações na biomassa microbiana no gradiente de pH ocorriam devido à influência do Al. Um fato semelhante parece ter ocorrido neste trabalho, em que foi observado, nas áreas A e C de inverno, os índices mais elevados de Al e os menores índices de Ca e Mg. Houve também correlação entre o Al e a estrutura de comunidades bacterianas nas áreas de inverno e parece que essa tenha sido influenciada pela toxicidade causada pelo elemento nos diferentes táxons bacterianos presentes. Essa condição também parece ter sido identificada por Kunito et al. (2016) que observaram a repressão das atividades enzimáticas no solo e a consequente diminuição da ciclagem de

nutrientes mediada pelas comunidades microbianas no solo causada pela toxicidade e acidez do Al. Em trabalho realizado por Faoro et al. (2010) em área de FOD de Mata Atlântica do estado do Paraná, foi encontrado comportamento semelhante ao observado no presente estudo em relação à influência do Al na diversidade das comunidades de bactérias do solo, além da influência de outros parâmetros edáficos.

O Ca apresentou correlação com a estrutura de comunidades de bactérias nas áreas de verão e inverno, exceto na área A de inverno, onde exibiu a menor média de Ca no solo das áreas amostradas. O menor índice do elemento nessa área deve ter sido provocado pelo índice elevado de Al nesta mesma área e estação, como observado por Bailey; Horsley; Long (2005). Similar aos dados observados neste estudo, Jeanbille et al. (2016) observaram que em áreas com nível mais elevado de Ca houve correlação positiva com a estrutura de comunidades bacterianas. Assim como par o Ca, Jeanbille et al. (2016) também encontraram outros fatores edáficos preditores de estruturas de comunidades bacterianas, como o Al, observado também no presente trabalho, além do pH, N e disponibilidade de nutrientes.

A relação dos fatores edáficos (MOS, Al e Ca) (Figura 10) observados neste trabalho e suas influências na estruturação das comunidades bacterianas estão de acordo com muito trabalhos encontrados na literatura (ROUSK et al., 2010; LAUBER et al., 2013; LEFF et al., 2015; PROBER et al., 2015; ZHOU et al., 2016). Contudo, a distribuição das chuvas e as diferentes temperaturas nas duas estações foram fatores de relevante importância na diferenciação entre as estruturas de comunidades bacterianas, em que foi verificado neste trabalho a separação entre os grupos de inverno e verão.

Os fungos possuem relação importante com o P, pois tem participação fundamental no ciclo do P e em distribuir para as plantas. Cerca de 75% do P disponibilizado para as plantas em florestas temperadas e boreais são realizadas por fungos micorrízicos (VAN DER HEIJDEN; BARDGETT; VAN STRAALLEN, 2008). Em estudo com fungos mineralizadores de P, Nahas; Centurion; Assis (1994) observaram, em populações de solo de floresta com pH 3,8, uma maior proporção de produtores de fosfatases, quando comparados com fungos de solo com pH 6,4. As fosfatases presentes nos fungos correlacionaram-se com a MOS, pH e P no solo. No presente trabalho foi encontrada correlação entre a estrutura de comunidades fúngicas das áreas de inverno e o elemento P, que não diferiu significativamente nas amostras de solo nas áreas de inverno. Outros trabalhos indicam resultados semelhantes, como aquele de Tedersoo et al. (2014), que concluiu que muitos grupos de fungos possuem preferência específica por este elemento no solo. De maneira análoga, He et al. (2016) indicam em seus

resultados a importância do P na determinação da estrutura de comunidades fúngicas do solo em áreas de prados alpinos em Qinghai-Tibetan Plateau, na China.

A separação entre os grupos de verão e inverno e a correlação com os atributos físico-químicos do solo (MOS, Mg e P) (Figura 11) tornam os resultados deste trabalho semelhantes aos encontrados por Tedersoo et al. (2014), em que os fatores climáticos, seguidos por fatores edáficos e de distribuição espacial são os melhores elementos para prever a riqueza e a composição de comunidades fúngicas do solo em escala global, onde apenas FECM estão relacionados com a diversidade de plantas. Os resultados encontrados por Bahram et al. (2018), em que a composição das comunidades de fungos a nível global está fortemente associada à precipitação, demonstram semelhança ao ocorrido neste trabalho, por conta da diferença dos níveis de pluviosidade sucedidos nos períodos de inverno e verão nos quais ocorreram as coletas, e as diferenças encontradas nas estruturas de comunidades entre as áreas das duas estações.

Figura 10. Análise de redundância baseada em distância (dbRDA) das áreas de FOD do PEST correlacionando a estrutura de comunidades bacterianas determinadas por PCR-DGGE com os atributos físico-químicos do solo, utilizando o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice.

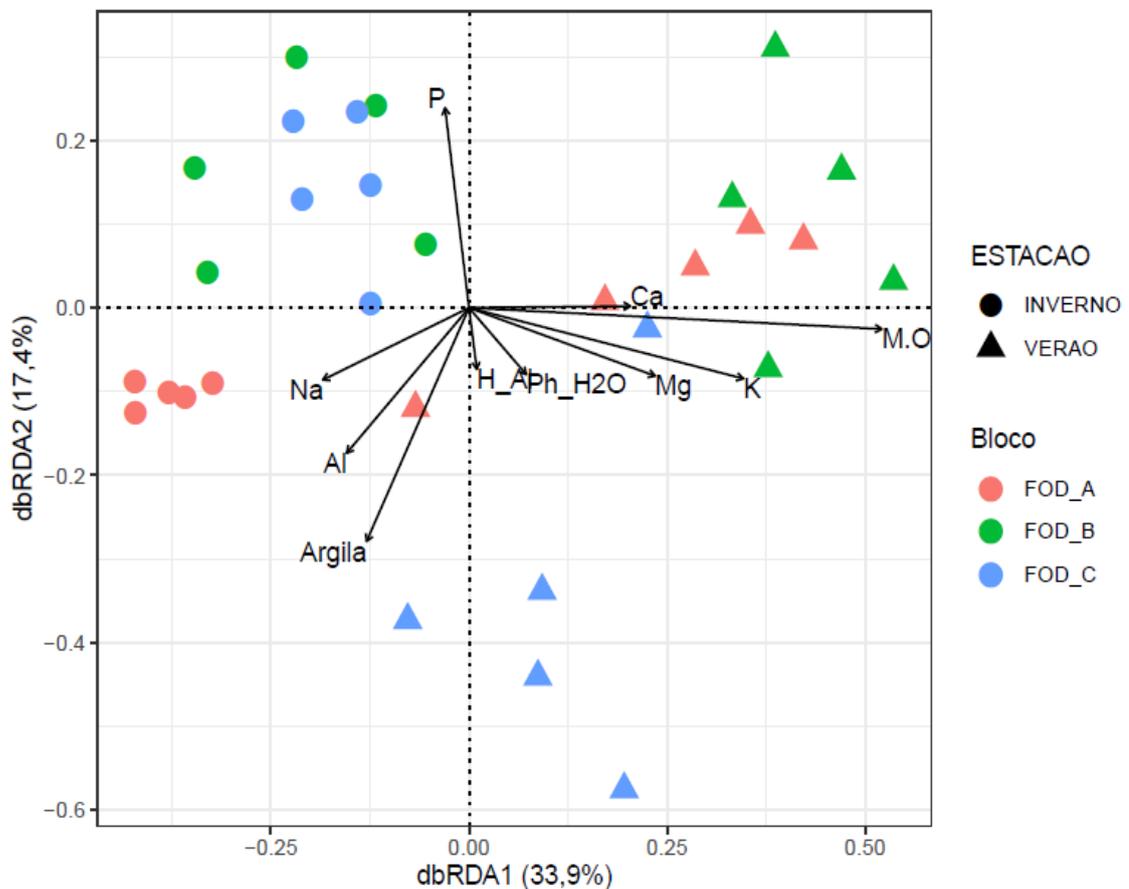
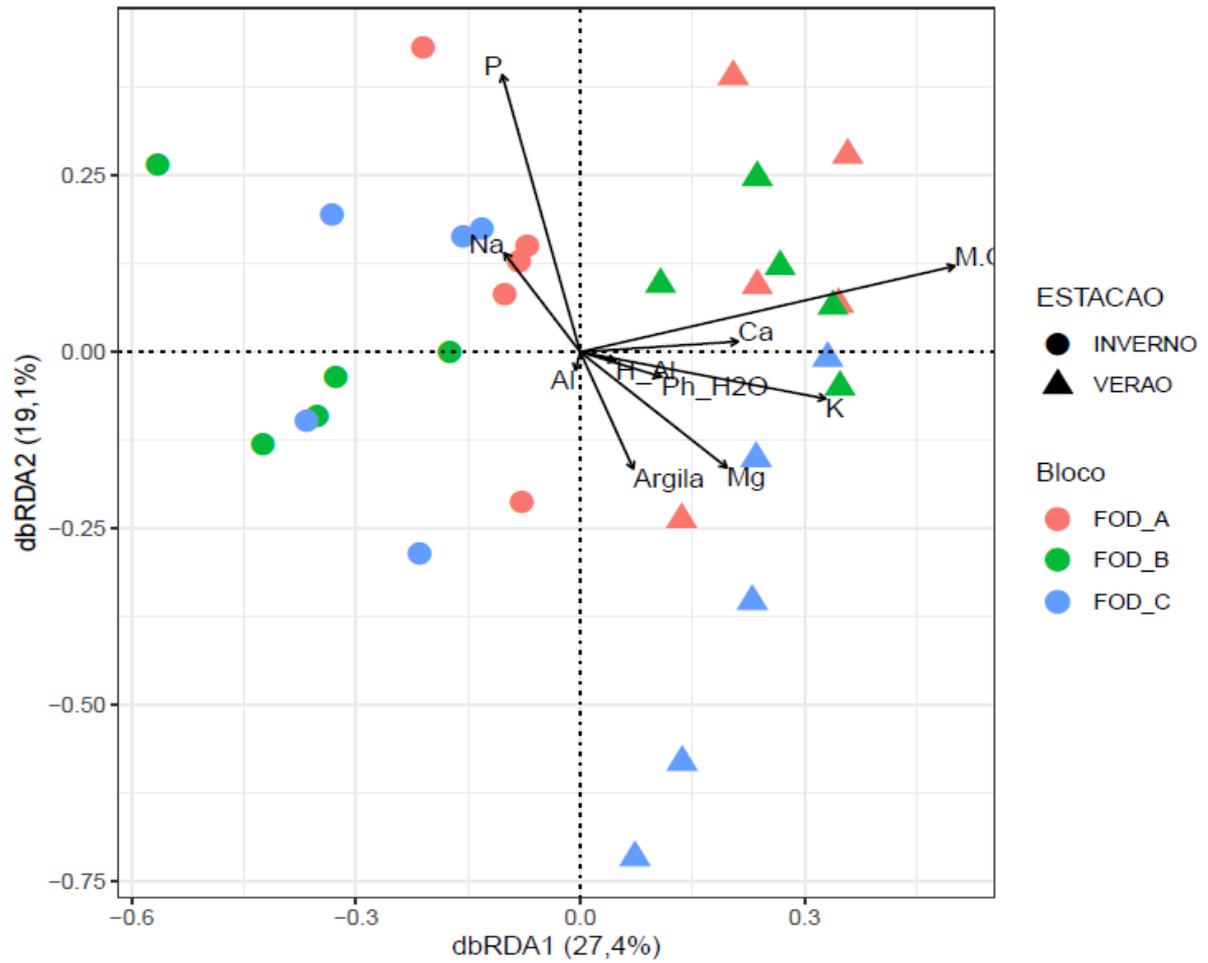


Figura 11. Análise de redundância baseada em distância (dbRDA) das áreas de FOD do PEST, correlacionando a estrutura de comunidades fúngicas determinadas por PCR-DGGE com os atributos físico-químicos do solo, utilizando o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice.



6 CONCLUSÕES

As variações de pluviosidade e temperatura apresentadas entre inverno e verão causaram diferenças na estrutura de comunidades bacterianas, indicando adaptações específicas desses microrganismos em cada estação.

As variações de pluviosidade, temperatura e teor de MOS entre verão e inverno ocasionaram certa distinção nas estruturas de comunidades fúngicas, demonstrando capacidade adaptativa desses microrganismos para sobrevivência em cada estação.

A matéria orgânica do solo, o alumínio e o cálcio demonstraram serem os melhores preditores das estruturas de comunidades bacterianas nas áreas de floresta ombrófila densa do PEST.

Os melhores preditores das estruturas de comunidades fúngicas nas áreas de floresta ombrófila densa do PEST foram a matéria orgânica do solo, o fósforo e o magnésio.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Recomenda-se a utilização de sequenciamento metagenômico das amostras de solo coletadas em áreas de floresta ombrófila densa na Mata Atlântica de SC para apresentar os grupos taxonômicos e funções metabólicas presentes nesse ecossistema.

Recomenda-se também avaliar as estruturas de comunidades de bactérias e fungos do solo dos outros ecossistemas presentes no PEST de modo a permitir uma avaliação conjunta desses indicadores da diversidade e estabilidade dos ecossistemas presentes no parque.

REFERÊNCIAS

- ACINAS, S. G. et al. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **Journal of Bacteriology**. 2004;186(9):2629-2635. 2004.
- ALLISON, L. E. Organic carbon. In: Black, C.A., Ed., **Methods of Soil Analysis**, ASA-CSSA-SSSA, Madison, 1367-1389. 1965.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582000000100004&lng=es&nrm=iso. Acessado em: maio de 2020.
- BAHRAM, M. et al. Structure and function of the global topsoil Microbiome. **Nature** 560, 233–237. 2018.
- BAILEY, S.W., HORSLEY, S.B., LONG, R.P. Thirty years of change in forest soils of the Allegheny Plateau, Pennsylvania. **Soil Science Society of America Journal** 69, 681-690. 2005.
- BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology** 57: 233–266. 2006.
- BALDRIAN, P. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics, **FEMS Microbiology Reviews**, V. 41, P. 109–130, 2017.
- BARDGETT, R. D.; VAN DER PUTTEN, W. H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature** 515, 505–511, 2014.
- BASHIR, Y.; PRADEEP SINGH, S. P.; KUMAR KONWAR, B. Metagenomics: An Application Based Perspective. **Chinese Journal of Biology**, 1–7, 2014.
- BELL, C. W. et al. Linking Microbial Community Structure and Function to Seasonal Differences in Soil Moisture and Temperature in a Chihuahuan Desert Grassland. **Microbial Ecology** 58, 827–842. 2009.
- BENITES, V. M. et al Análise discriminante de solos sob diferentes usos em área de Mata Atlântica a partir de atributos da matéria orgânica. **Revista Árvore**. vol.34, pp.685-690. 2010.
- BIANCHIN, J. E. et al. Deposição de fitomassa em formações secundárias na Floresta Atlântica do Paraná. **Floresta e Ambiente**. v. 23, n. 4. 2016.

BOON, N. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants, **FEMS Microbiology Ecology**, V. 39- 2, P. 101–112, 2002.

BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. **Numerical ecology with R**. Springer, New York. 2011.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. (Org) **Mata Atlântica: Patrimônio nacional dos brasileiros / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Núcleo Mata Atlântica e Pampa; Brasília: MMA, 2010.**

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **Primer 5:0 User Manual/Tutorial**. PRIMER-E, Plymouth, 2001.

COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest *lato sensu*: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 3, supl. p. 697-708, Oct. 2010.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFRS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. SBCS/NRS. Porto Alegre, 400p. 2004.

COSTA, R. et al. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **FEMS Microbiology Ecology** 56:236–249. 2006.

D’ALMEIDA, D. M. B. A. D.; et al. Importância relativa dos íons na salinidade de um Cambissolo na Chapada do Apodi, Ceará. **Engenharia Agrícola**, v.25, n.3, p. 615-621, 2005.

DADALTO, G. G; FULLIN, E. A. **Manual de recomendação de calagem e adubação para o Estado do Espírito Santo: 4ª aproximação**. Vitória, 180p. 2001.

DE GRUYTER, J. et al. Patterns of local, intercontinental and interseasonal variation of soil bacterial and eukaryotic microbial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, 96 (3). 2019.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. **Nature Communications** 7:10541. 2016.

DOCHERTY, K. M.; GUTKNECHT, J. L. M. The role of environmental microorganisms in ecosystem responses to global change: current state of research and future outlooks -Springer. **Biogeochemistry**, v. 109, n. 1-3, p. 1-6, 2012.

DUARTE, L. M. et al. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in soils under three phytophysiognomies of the Brazilian Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, 33(1), 50–60. 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Manual de métodos de análises de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 230p., 2011.

EMBRAPA Solos - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Solos do Estado de Santa Catarina**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n.46. 2004.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. **Ceylon Journal of Science** v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

FERREIRA, R. G. et al. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetida a estresse salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 79-88, 2001.

FRANSSON, P. et al. Ectomycorrhizal exudates and pre-exposure to elevated CO₂ affects soil bacterial growth and community structure. **Fungal Ecology**, 20, 211–224. 2016.

FRESCHET, G. T. et al. Linking litter decomposition of above- and below-ground organs to plant-soil feedbacks worldwide. **Journal of Ecology** 101:943–952. 2013.

FONSECA, G. A. B.; HERRMANN, G.; LEITE Y. L. R. Macrogeography of Brazilian mammals. In: Eisenberg, J. F.; Redford, K. H. (eds) **Mammals of the Neotropics: the central Neotropics 3**. University of Chicago Press, Chicago, pp 549–563, 1999.

FORZZA, R. C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **Bioscience Journal**, 62(1), 39–45, 2012.

GAIO, M. F. **Parque Estadual da Serra do Tabuleiro: entre um ideal e as limitações reais**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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

GASPER, A. L. et al. Floristic and Forest Inventory of Santa Catarina: species of evergreen rainforest. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 4, p. 807-816, Dec. 2014.

GSCHWENDTNER, S. et al. Nitrogen fertilization affects bacteria utilizing plant-derived carbon in the rhizosphere of beech seedlings. **Plant Soil** 407:203–215. 2016.

HAICHAR, F. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal** 2, 1221–1230. 2008.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43:895-914, 1997.

HAMMER, O. **Reference Manual PAST**. Natural History Museum, Oslo: University of Oslo. 2017.

- HANSEL, C. M et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and environmental microbiology** vol. 74,5: 1620-33, 2008.
- HANSON, C. A. et al. Fungal Taxa Target Different Carbon Sources in Forest Soil. **Ecosystems** 11, 1157–1167. 2008.
- HARTMANN, M. et al. A decade of irrigation transforms the soil microbiome of a semi-arid pine forest. **Molecular Ecology** 26:1190–1206. 2017.
- HAWKES, C.V. et al. Historical climate controls soil respiration responses to current soil moisture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, 2017.
- HE, D. et al. Composition of the soil fungal community is more sensitive to phosphorus than nitrogen addition in the alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau. **Biology and Fertility of Soils** 52, 1059–1072. 2016.
- HISCOX, J. et al. Priority effects during fungal community establishment in beech wood. **The ISME Journal** 9, 2246–2260, 2015.
- HOPPE, B. et al. A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology** 3, reviews0003.1. 2002.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.
- ICMBIO. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra do Itajaí**. Brasília, 739p. 2009.
- IMA. Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina. **Elaboração Do Plano De Manejo Do Parque Estadual Da Serra Do Tabuleiro**. Curitiba. 2018.
- IMA. Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina. **Parque Estadual da Serra do Tabuleiro**. Florianópolis, 2020. Disponível em: <http://www.ima.sc.gov.br/index.php/ecosistemas/unidades-de-conservacao/parque-estadual-da-serra-do-tabuleiro>. Acessado em: março de 2020.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. s/d. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acessado em: março de 2020.
- JEANBILLE, M. et al. Soil Parameters Drive the Structure, Diversity and Metabolic Potentials of the Bacterial Communities Across Temperate Beech Forest Soil Sequences. **Microbial Ecology**, 71(2), 482–493. 2016.

- JENTSCHKE, G. et al. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **New Phytologist** 149: 327–337. 2001.
- JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, 204(3), 459–473. 2014.
- KASPARI, M. et al. Multiple nutrients regulate litterfall and decomposition in a tropical forest. **Ecology Letters**, 11, 35–43. 2008.
- KLEIN, R. M. Ecologia da Flora e Vegetação do Vale do Itajaí. **Sellowia** v. 32, p. 1-389, 1980.
- KLEIN, R. M. Fisionomia, importância e recursos da vegetação do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. **Sellowia** 33: 5-54, 1981.
- KOWALCHUK, G. A. et al. Effects of above-ground species composition and diversity on the diversity of soilborne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek** 81: 509–520. 2002.
- KUNITO, T. et al. Aluminum and acidity suppress microbial activity and biomass in acidic forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, 97, 23–30, 2016.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. **Soil Biology and Biochemistry**, 83, 184–199. 2015.
- LAMBAIS, M. R.; LUCHETA, A. R.; CROWLEY, D. E. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. **Microbial Ecology** 68, 567–574, 2014.
- LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(15), 5111–5120, 2009.
- LAUBER, C. L. et al. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **The ISME Journal**, 7(8), 1641–1650, 2013.
- LEFF, J. W. et al. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**; 112:10967–72. 2015.
- LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. Distance-based redundancy analysis: testing multi-species responses in multifactorial ecological experiments. **Ecological Monographs**, v. 69, p. 1–24. 1999.
- LIMA, N. C. D. J. **Relações filogenéticas em *Ganoderma* p. Karst. (basidiomycota) baseadas em sequências do dna ribossomal**. 69 p. Dissertação (Mestrado) Biologia de Fungos. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2012.

LIMA-PERIM, J. E. et al Linking the composition of bacterial and archaeal communities to characteristics of flora composition in the Atlantic rainforest. **PloS One**, São Francisco, v. 11, n. 1. 2016.

LINGNER, D. V. et al Floresta ombrófila densa de Santa Catarina - Brasil: Agrupamento e ordenação baseados em amostragem sistemática. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 4, p. 933-946, Dec. 2015.

LIU, J. et al., Soil carbon content drives the biogeographical distribution of fungal communities in the black soil zone of northeast China. **Soil Biology and Biochemistry**, 83 (2015), pp. 29-39. 2015.

LLADÓ, S.; LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; BALDRIAN, P. Drivers of microbial community structure in forest soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102(10), 4331–4338. 2018.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R. et al. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific Reports** 6:25279. 2016.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed. 1160 p. 2010.

MANFIO, G. P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil: Microbiota**. Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, 2003.

MARTINELLI, G. et al. Avaliação de risco de extinção de espécies da flora brasileira. In: Martinelli, G.; Moraes, M. A. (eds) **Livro vermelho da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp 60–84, 2013.

MARZORATI, M. et al. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology, **Environmental Microbiology**, vol. 10, no. 6, pp. 1571–1581, 2008.

MIGUEL, P. S. B. et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**, v. 24, n. 1, p. 13-29. 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, MMA. **Espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Instrução normativa n.6, de 23 de setembro de 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, MMA. **Áreas Protegidas**: O que são Unidades de Conservação, Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao/o-que-sao>. Acesso em: 01 maio 2020.

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

MITTERMEIER, R. A. et al. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots In: Zachos F., Habel J. (eds) **Biodiversity Hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2a edição, Editora UFLA. 729 p. 2006.

MUMMEY, D. L. et al. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, 42: 1138-1147, 2010.

MUNIZ, A. W.; WORDELL, J. A. F.; SACCOL, E. L. S. Promoção de crescimento vegetal por rizóbios. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 25, n.3, 2012.

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 73, p. 127-141. 1998.

MYERS, R. M. et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research** 13:3131-3145. 1985.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, n.1, 1994.

NEWSHAM, K. K. et al. Relationship between soil fungal diversity and temperature in the maritime Antarctic. **Nature Climate Change**, 6(2), 182–186. 2015.

NOTTINGHAM, A. et al. Microbes follow Humboldt: temperature drives plant and soil microbial diversity patterns from the Amazon to the Andes. **bioRxiv**:79996. 2018.

OKSANEN, J. et al. **vegan:CommunityEcologyPackage**. R package version 2.3-3. 2016. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

OLIVEIRA, I. A. **Gestão de conflitos ambientais: estudo de caso do entorno nordeste do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro – Praia da Pinheira – SC**. 2005. 269 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação de Engenharia de Produção, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

OVREÅS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(9):3367-3373. 1997.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiology and Biochemistry**, second ed. Academic Press, USA. 1996.

PEAY, K.; BARALOTO, C.; FINE, P. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. **The ISME Journal** 7, 1852–1861 2013.

PETRINI, O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews J.H., Hirano S.S. (eds) **Microbial Ecology of Leaves**. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY. 1991.

PHILPOTT, T. J. et al. Nitrogen translocation and accumulation by a cord-forming fungus (*Hypholoma fasciculare*) into simulated woody debris. **Forest Ecology and Management** 315, 121–128, 2014.

PIÑA, R. G.; CERVANTES, C. Microbial interactions with aluminium. **BioMetals** 9:331-316. 1996.

PINTO, L. P. Mata Atlântica. In: Scarano, F.R. et al. (eds.) **Biomás Brasileiros: Retratos de um País Plural**. Casa da Palavra, Conservação Internacional, Rio de Janeiro, pp 16–55, 2012.

PITERINA, A. V.; PEMBROKE, J. T. Use of PCR-DGGE based molecular methods to analyse microbial community diversity and stability during the thermophilic stages of an ATAD wastewater sludge treatment process as an aid to performance monitoring **ISRN Biotechnology**, 2013.

PROBER, S. M. et al. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. **Ecology Letters**, 18(1), 85–95. 2015.

RASTOGI, G.; SANI, R. K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I. et al (Ed.). **Microbes and Microbial Technology**. California: Springer Science, p.29-57. 2011.

REED, S. C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 42: 489–512, 2011.

RIBEIRO, M. C. et al. Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142, 1141–1153. 2009.

RODRIGUES, J. L. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA; 110: 988–993, 2013.

ROMANOWICZ, K. J. et al. Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: the influence of pH and soil moisture. **FEMS Microbiology Ecology**. 92. 2016.

ROSÁRIO, L. A. **A natureza do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro**. Florianópolis: FATMA, 128 p. 2003.

ROSENSTOCK, N. P. et al. The role of phosphorus, magnesium and potassium availability in soil fungal exploration of mineral nutrient sources in Norway spruce forests. **New Phytologist** 211: 542-553. 2016.

ROUSK, J. et al. Examining the fungal and bacterial niche overlap using selective inhibitors in soil. **FEMS Microbiology Ecology** 63: 350–358. 2008.

ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, 4(10), 1340–1351. 2010.

RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 78(4):614-649. 2014.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental Microbiology**, 4(11), 654–666. 2002.

SÁ, M. F. **Os solos dos Campos Gerais**; In MELO, M. S., MORO, R. S., GUIMARÃES, G. B. (Eds.), Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná, Editora UEPG, Brasil, p.73-83, 2007.

SANTOS, E. **Relações entre a dinâmica da serapilheira e a biota do solo em floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas**. Tese de doutorado em Engenharia Florestal – Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. 2017.

SANTOS, E. C. et al. Artificial neural network modeling of microbial Community structures in the Atlantic Forest of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**. 69: 101–109. 2014.

SCHMITZ, R. J. Histórico. In: **A natureza do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro**. Florianópolis: FATMA, 128 p., 2003.

SILVA, R. C. et al. Alterações nas propriedades químicas e físicas de um Chenossolo com diferentes coberturas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v31, p. 101-107, 2007.

SOBRAL, L. F. et al. **Guia prático para interpretação de resultados de análises de solos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 13 p., 2015.

SPATAFORA, J. W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia** 108: 1028–1046. 2016.

STEHMANN, J. R. et al. **Plantas da Floresta Atlântica**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

- ŠTURSOVÁ, M. et al. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiol Ecol** 80:735–746. 2012.
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, vol.31, 2008.
- TALBOT, J. M. et al. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111(17), 6341–6346. 2014.
- TAVARES, T. C. L. **Estrutura e diversidade taxonômica e funcional das assembleias de archaea e bactéria associadas a sedimentos portuários da plataforma continental do Ceará, NE – Brasil**. 145 p. Tese (Doutorado) Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos. Universidade federal do Ceará, Fortaleza. 2014.
- TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science** 346: 1078, 2014.
- TEDERSOO, L. et al. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. **The ISME Journal**, 10(2), 346–362, 2016.
- TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, p. 16-70, 1995.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**; 11:296–310. 2008.
- VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; HARTMANN, M. Networking in the Plant Microbiome. **PLoS Biology**, 14(2), 2016.
- VETTORI, L. **Métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Boletim Técnico, 9. 24p. 1969.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.A.J.; MARTINS, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: Congresso nacional sobre essências nativas, 2, São Paulo, 1992. **Anais**. São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo, p. 400-407. 1992.
- VIBRANS, A. C. et al Amostragem dos remanescentes florestais da floresta ombrófila mista. In: VIBRANS, A.C. et al (Eds.). **Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina: Floresta Ombrófila Mista**. Blumenau: Edifurb, v. 3, p. 33-93, 2013.
- VON REIN, I. et al. Forest understory plant and soilmicrobial response to an experimentally induced drought and heat-pulse event: the importance of maintaining the continuum. **Global Change Biology** 22:2861–2874. 2016.
- WAGG, C. et al. Soil biodiversity and community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 111, 5266–5270, 2014.

WALDROP, M. P. et al. The interacting roles of climate, soils and plant production on soil microbial communities at a continental scale. **Ecology** 98:1957–1967. 2017.

WARING, B.; HAWKES, C. V. Ecological mechanisms underlying soil bacterial responses to rainfall along a steep natural precipitation gradient. **FEMS Microbiology Ecology**, 2018.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York, N.Y: Academic Press, Inc.; p. 315–322. 1990.

XIA, M.; TALHELM; A. F.; PREGITZER, K. S. Fine roots are the dominant source of recalcitrant plant litter in sugar maple-dominated northern hardwood forests. **New Phytologist**, 208: 715-726. 2015.

YANG, F. et al. Soil bacterial community composition and diversity in relation to edaphic properties and plant traits in grasslands of southern China. **Applied Soil Ecology**. 128:43–53. 2018.

YANG, Y. et al. Links between Soil Fungal Diversity and Plant and Soil Properties on the Loess Plateau. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2017.

YAO, Q. et al. Three years of biochar amendment alters soil physiochemical properties and fungal community composition in a black soil of northeast China. **Soil Biology and Biochemistry**. V. 110, P. 56-67, 2017.

ZHANG, J. et al. Seasonal variation rather than stand age determines bacterial diversity in the rhizosphere of wolfberry (*Lycium barbarum* L.) associated with soil degradation. **Journal Soils Sediments**. 18:1518–29. 2018.

ZHOU, J. et al. Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils. **Nature Communications** 7:1–10. 2016.

ZHU, B. et al. Rhizosphere priming effects on soil carbon and nitrogen mineralization. **Soil Biology and Biochemistry**. 76, 183–192. 2014.

ZHU, B.; CHENG, W. Rhizosphere priming effect increases the temperature sensitivity of soil organic matter decomposition. **Global Change Biology**, 17(6), 2172–2183. 2010.