
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Eucalyptus tereticornis* E *Bambusa vulgaris* NA FLORESTA ESTADUAL EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE, RIO CLARO, SP

CAROLINE JONAS DE ANDRADE

**Rio Claro - SP
2021**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Microbiologia Aplicada)**

DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Eucalyptus tereticornis* E *Bambusa vulgaris* NA FLORESTA ESTADUAL EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE, RIO CLARO, SP

CAROLINE JONAS DE ANDRADE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Dra. Derlene Attili de Angelis.

**Rio Claro - SP
2021**

A553d

Andrade, Caroline Jonas de

Diversidade de fungos associados a *Eucalyptus tereticornis* e *Bambusa vulgaris* da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade, Rio Claro, SP / Caroline Jonas de Andrade. -- Rio Claro, 2021

125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Derlene Attili de Angelis

1. Bioeconomia. 2. Coleções de culturas. 3. Diversidade fúngica. 4. Espécies crípticas. 5. Fungos melanizados. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

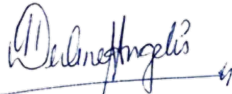
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE DE CHAETOTHYRIALES EM AMOSTRAS DE *Eucalyptus tereticornis* E *Bambusa vulgaris* DA FLORESTA ESTADUAL EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE, RIO CLARO, SP

AUTORA: CAROLINE JONAS DE ANDRADE

ORIENTADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA (Participação Virtual)
Centro de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. QUIMI VIDAURRE MONTOYA (Participação Virtual)
Pós-Doutorando do Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Rio Claro, 21 de setembro de 2021

Título alterado para: "DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Eucalyptus tereticornis* E *Bambusa vulgaris* DA FLORESTA ESTADUAL EDMUNDO NAVARRO DE ANDRADE, RIO CLARO, SP"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Primeiramente, aos meus pais Valéria Jonas e Edilson Martinez, por possibilitarem o meu ingresso na universidade e me incentivarem a continuar investindo na minha formação. Sou grata por serem tão bons para mim, pela confiança, por nunca terem me desamparado e por sempre apoiarem minhas decisões.

À minha família: Meus avós, Josefa Martinez, Gerci de Andrade e Aparecida Graciano, por fazerem parte do meu crescimento, por tornarem tudo mais leve e me fazerem mais feliz. Aos meus irmãos, Murilo Amorim e Manuella Jonas, por serem crianças incríveis, trazerem paz e alegria em meio às turbulências da vida. À Eliene Amorim, pelas conversas, apoio e amizade que desenvolvemos.

Aos meus amigos, Letícia Affonso e Victor Bertolani, por sempre terem apoiado meus planos, terem vibrado com cada conquista minha e estarem comigo independente da distância.

À Gabrielle Alves pela amizade e parceria. Sou grata pelo apoio que me deu ao longo do mestrado, e por estarmos juntas nessa trajetória desde a iniciação científica.

Ao Lucas Bueno, por estar comigo desde o início da jornada acadêmica, por me apoiar e ensinar tanta coisa. Sou grata pela nossa amizade.

Ao meu amigo e companheiro Lucas Loureiro, por me apoiar desde a graduação, me fazer enxergar que sou capaz, ser paz em meio ao caos e por fazer tudo isso valer a pena.

Aos presentes que o mestrado me proporcionou, Thaís Tiemi, Charles Freire e Morgana Turunday, agradeço por termos cruzado nossos caminhos, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade que construímos.

Às parceiras de laboratório e amigas, Natália Ferraz e Fernanda Correia, pelo apoio, conversas e momentos compartilhados. Vocês tornaram a caminhada mais leve.

Aos professores que tive durante a graduação e pós-graduação, por estimularem o meu interesse pela ciência, crescimento e criticidade.

À professora Derlene Attili de Angelis, por confiar em meu trabalho, pela orientação, paciência, conversas e por todos os ensinamentos durante esse período. Sou grata por tudo.

À professora Vânia Aparecida Vicente e à Maria Eduarda Grisolia (UFPR) pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Florestal (IF) e Comissão Técnico-Científica do Instituto Florestal (COTEC) por aprovarem e permitirem a execução deste projeto (Processo SIMA nº 260108 –

008.598/2019).

Ao Robson Carlos Bega da FEENA, pela prestatividade no acompanhamento de amostras.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA)/Táxon (UNESP/Rio Claro) e Laboratório de Microbiologia Molecular (DRM/CPQBA/UNICAMP) pela infraestrutura fornecida para realização deste trabalho.

Ao Gilberto Victor Coradi e à Milena Binatti Ferreira, por me receberem bem e por compartilharem o conhecimento de vocês, indispensáveis para o trabalho em questão.

À Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP/Rio Claro) pelo espaço de aprendizagem e infraestrutura oferecidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Num mundo inundado por informações irrelevantes, clareza é poder. E a censura não funciona bloqueando o fluxo de informações, e, sim, inundando as pessoas com desinformação".

(Yuval Noah Harari)

RESUMO

Os fungos em geral apresentam características ecológicas muito diversas, permitindo-lhes adaptação a uma ampla gama de condições ambientais, inclusive adversas. Espécies dematiáceas (melanizadas) estão associadas a uma grande amplitude de nichos naturais e artificiais, como saunas, máquinas de lavar louça, oficinas mecânicas, rochas, monumentos, geleiras, vegetais, animais endotérmicos e ectotérmicos. Plantas como eucalipto e bambu foram relatadas como potenciais fontes de fungos dematiáceos, dentre outros, curiosamente revelando a presença de espécies oportunistas. A Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade”, localizada em Rio Claro, SP, foi o berço da introdução do *Eucalyptus* no Brasil e ainda hoje abriga várias espécies de importância econômica. Objetivando contribuir para o conhecimento da diversidade fúngica associada a *Eucalyptus tereticornis* e *Bambusa vulgaris*, com ênfase em um grupo de fungos melanizados, métodos independentes (metataxonomia) e dependentes de cultivo (isolamento seletivo) foram utilizados. Solo rizosférico e córtex vegetal foram estudados, em um total de 12 amostras. A metataxonomia revelou 3104 Unidades Operacionais Taxonômicas (OTUs) de ITS e classificou 354 gêneros, 196 famílias e 8 filos pertencentes ao Reino Fungi. Também classificou 15 espécies, 12 gêneros e 3 famílias pertencentes à ordem Chaetothyriales. Observou-se que muitos apresentam importância clínica e biotecnológica. O isolamento seletivo resultou em 69 culturas de fungos dematiáceos, as quais foram preservadas no acervo de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental/Táxon, CEA-Unesp Rio Claro. Dentre os isolados, 22 foram sequenciados e identificados molecularmente, evidenciando a ocorrência dos táxons *Cladosporium* spp., *Cyphellophora musae*, *Exophiala* spp. e *Exophiala pisciphila*. Das amostras analisadas, o solo rizosférico demonstrou maior diversidade e riqueza de fungos, em especial a região do talhão de eucalipto 29, área sul da floresta. Esse estudo mostrou ainda que o local de estudos constitui um importante reduto do patrimônio genético nacional e, em especial, *Eucalyptus* e *Bambusa* abrigam comunidades fúngicas com grande potencial de aplicação na área médica e para bioeconomia.

Palavras-chave: Bioeconomia, Coleções de culturas; Diversidade fúngica; Espécies crípticas; Fungos melanizados; Metataxonomia; Oportunismo.

ABSTRACT

Fungi in general have very diverse ecological characteristics, allowing them to adapt to a wide range of environmental conditions, including adverse ones. Dematiaceous (melanized) species are associated with a wide range of natural and artificial niches, such as saunas, dishwashers, mechanical workshops, rocks, monuments, glaciers, endothermic and ectothermic animals. Plant species such as eucalyptus and bamboo were reported as potential sources of opportunistic dematiaceous fungi, among others, curiously revealing the presence of opportunistic species. The Edmundo Navarro de Andrade State Forest, located in Rio Claro, SP, was the birthplace of the introduction of *Eucalyptus* in Brazil and still today houses several species of economic importance. Aiming to contribute to the knowledge of fungal diversity associated with *Eucalyptus tereticornis* and *Bambusa vulgaris*, with emphasis on a group of melanized fungi, independent (metataxonomy) and dependent (selective isolation) methods were used. Rhizospheric soil and plant cortex were studied, in a total of 12 samples. The metataxonomy revealed 3104 Operational Taxonomic Units (OTUs) of ITS and classified 354 genera, 196 families and 8 phyla belonging to the Kingdom Fungi. It also classified 15 species, 12 genera and 3 families belonging to the order Chaetothyriales. It was observed that many have clinical and biotechnological importance. The selective isolation resulted in 69 cultures of dematiaceous fungi, which were preserved in the collection of microorganisms of the Environmental Microbiology Laboratory/Táxon (LMA), CEA-Unesp Rio Claro. Among the isolates, 22 were sequenced and identified molecularly, showing the occurrence of the taxa *Cladosporium* spp., *Cyphellophora musae*, *Exophiala* spp. and *Exophiala pisciphila*. Of the samples analyzed, the rhizospheric soil showed greater diversity and richness of fungi, especially in the region of the eucalyptus stand 29, in the southern area of the forest. This work also showed that the study site is an important stronghold of the national genetic heritage and, in particular, *Eucalyptus* and *Bambusa* are home to fungal communities with great potential for application in the medical field and for bioeconomy.

Keywords: Bioeconomy, Culture collections; Fungal diversity; Cryptic species; Melanized fungi; Metataxonomy; Opportunism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. <i>Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade”</i>	13
2.2. <i>Fungos: características e importância</i>	14
2.3. <i>Fungos dematiáceos Eurotiomycetes</i>	16
2.4. <i>Métodos independentes e dependentes de cultivo microbiano</i>	18
3 OBJETIVOS	20
3.1. <i>Objetivo geral</i>	20
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. <i>Área de estudo e amostragem</i>	22
4.2. <i>Método independente de cultivo</i>	28
4.2.1. <i>Extração do DNA total</i>	28
4.2.2. <i>Quantificação e verificação da qualidade do DNA</i>	28
4.2.3. <i>Preparação de bibliotecas de amplicons da região ITS</i>	29
4.2.4. <i>Análise metataxonômica da diversidade fúngica</i>	30
4.2.5. <i>Alinhamento Blast/NCBI</i>	30
4.3. <i>Método dependente de cultivo</i>	31
4.3.1. <i>Isolamento e purificação dos isolados</i>	31
4.3.2. <i>Preservação das linhagens</i>	32
4.3.3. <i>Microcultivo</i>	33
4.3.4. <i>Identificação molecular dos isolados</i>	34
4.3.5. <i>Seleção dos isolados para identificação</i>	34
4.3.6. <i>Extração de DNA</i>	34
4.3.7. <i>Verificação da qualidade de DNA (eletroforese)</i>	35
4.3.8. <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	35
4.3.9. <i>Reação de sequenciamento</i>	37
4.3.10. <i>Análise filogenética</i>	38
5 RESULTADOS	40
5.1. <i>Método independente de cultivo</i>	40
5.1.1. <i>Análise metataxonômica de fungos e comparação entre espécies vegetais</i>	40
5.1.2. <i>Comparação metataxonômica entre setores</i>	43

5.1.3. Comparação metataxonômica de fungos dematiáceos entre espécies vegetais.....	46
5.1.4. Comparação metataxonômica de fungos entre tipos de solo.....	59
5.1.5. Presença de fungos de importância médica.....	62
5.2. Método dependente de cultivo.....	64
5.2.1. Isolamento e purificação dos isolados.....	64
5.2.2. Preservação das linhagens.....	67
5.2.3. Microcultivo.....	68
5.2.4. Identificação molecular dos isolados.....	69
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade” (FEENA), localizada na cidade de Rio Claro-SP, Brasil, foi o berço da introdução de mais de 60 espécies de *Eucalyptus* no Brasil (REIS; PONTALTI, 2005). Abriga também outras plantas nativas e exóticas, como os bambus, constituindo assim um ambiente de rica diversidade biológica. Apesar da diversidade vegetal e de diferentes tipos de solos presentes na FEENA, poucos estudos buscaram revelar os recursos genéticos microbianos encontrados no local.

Microrganismos surgiram na Terra há cerca de 3,8 bilhões de anos atrás, e provavelmente existirão mesmo além de eventos futuros de extinção, devido à sua imensa diversidade e capacidade de respostas às mudanças ambientais (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019). Múltiplos microrganismos que colonizam solo e plantas, como os fungos, desempenham papéis essenciais nos nichos que habitam. Possuem potencial biotecnológico aplicado à agricultura, dentre outros setores, podendo ser isolados e formulados, tornando-se novos produtos biológicos, representando o futuro da agricultura sustentável (DOS SANTOS; OLIVARES, 2021).

Ao longo da história da taxonomia dos fungos, muitas descobertas e modificações ocorreram na classificação dos grupos. Com o avanço contínuo das técnicas moleculares e sequências de DNA de estudos mais recentes, a micologia vem reconstruindo a história de vida destes seres. Segundo o trabalho de Wijayawardene e colaboradores (2020), o reino Fungi apresenta atualmente 19 filos, enquanto que informações do Catalogue Of Life (COL) (https://www.catalogueoflife.org/data/search?TAXON_ID=F&rank=phylum&status=accepted&status=provisionally%20accepted), apontam 7. É possível encontrar distintas classificações taxonômicas de fungos, reconhecidas por diferentes autores. Tal discussão científica demonstra a demanda por estudos de levantamentos de espécies fúngicas, ponto chave para preencher possíveis lacunas filogenéticas.

Dos filos aceitos, Ascomycota compõe um grupo heterogêneo conhecido por apresentar um maior número de representantes com estruturas de coloração acastanhada, como resultado da presença do pigmento melanina na parede celular. Esse pigmento constitui uma macromolécula biológica que está associada à proteção e à tolerância a condições extremas (SCHUMACHER; GORBUSHINA, 2020).

Podemos dizer que os dematiáceos formam um grupo ecologicamente notável. Apresentam crescimento meristemático (extensão celular isodiamétrica e formação de paredes

celulares espessas), capacidade de alternar entre formas leveduriformes ou filamentosas (pleomorfismo), termotolerância, osmotolerância, adesão, hidrofobicidade, produção de polissacarídeos extracelulares, metabólitos secundários ácidos ou alcalinos, sideróforos (importante na captação de ferro) e formação de corpos muriformes (AMETRANO; MUGGIA; GRUBE, 2019; CHOWDHARY; PERFECT; DE HOOG, 2015; DE HOOG, 1993; MUGGIA *et al.*, 2021; STERFLINGER, 2006).

Curiosamente, vários trabalhos observaram certa virulência ocasionada pelos fungos melanizados, a qual foi explicada mediante o conceito de “Virulência acidental” (CASADEVALL; PIROFSKI, 2007). Supõem-se que os fatores de patogenicidade e oportunismo, demonstrados são moldados por pressões de seleção externas ao hospedeiro.

Os fungos dematiáceos pertencem principalmente a duas classes de ascomicetos: Dothideomycetes e Eurotiomycetes (AMETRANO; MUGGIA; GRUBE, 2019, GUEIDAN *et al.*, 2011; MUGGIA *et al.*, 2021). No primeiro grupo é possível encontrar espécies melanizadas nas ordens Dothideales, Capnodiales e Pleosporales (SCHOCH *et al.*, 2020), associados a doenças em plantas. No segundo são principalmente encontrados na ordem Chaetothyriales, como saprotróficos e patogênicos (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

A ordem Chaetothyriales (Eurotiomycetes), também conhecida por “leveduras negras e espécies relacionadas” possui gêneros bem conhecidos, como *Cladophialophora*, *Exophiala*, *Fonsecaea* e *Phialophora* (pertencentes à família *Herpotrichiellaceae*), por serem de importância clínica e consideradas agentes oportunistas de doenças em humanos e vertebrados (QUAN *et al.*, 2020).

Representantes dessa ordem apresentam estilos de vida versáteis que os permitem ocupar diferentes nichos como ambientes aquáticos, rochas, insetos (como a frequente e consistente associação com formigas), em locais poluídos (potenciais agentes na biodegradação), como micoparasitas, ambientes contaminados com compostos tóxicos, em monumentos e em ambientes urbanos poluídos (GUEIDAN *et al.*, 2008; QUAN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Locais domésticos úmidos, como paredes de banheiros, tubos, filtros e drenos de chuveiros e máquinas de lavar roupas também foram relatados como fontes de isolamento desses fungos (LIAN; DE HOOG, 2010).

Os eucaliptos apresentam hidrocarbonetos (DOS REIS *et al.*, 2012), bem como outros compostos aromáticos, taninos, compostos flavônicos, cera e resina (FRANCO, 2005). Estas substâncias podem favorecer a presença de fungos dematiáceos e afins. Fungos da ordem Chaetothyriales já foram recuperados de eucaliptos, assim como em seu solo rizosférico, além de isolados melanizados das ordens Capnodiales e Pleosporales (ATTILI- ANGELIS, 2010;

JIMU *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2016; BARON, 2014).

Os bambus têm recebido atenção considerável nos últimos anos como fontes de fibra natural vegetal. Possuem rápido crescimento, até três vezes maior quando comparado com o dos eucaliptos (JUNIOR *et al.*, 2013). Fungos das ordens Chaetothyriales, Dothideales, Capnodiales e Pleosporales também foram isolados dessa espécie (YANG *et al.*, 2014; ARZANLOU; KHODAEI, 2012; ZHOU *et al.*, 2017).

Acredita-se que apenas uma pequena fração de espécies existentes de Chaetothyriales e outros dematiáceos seja conhecida, devido à representação fragmentária dessas espécies e disponibilidade limitada de sequências (QUAN *et al.*, 2020). Além de que, segundo dados do banco taxonômico NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) (SCHOCH *et al.*, 2020), existem táxons da ordem e relativos que ainda carecem de classificação a nível específico. A combinação dos métodos independente (obtenção de sequências) e dependente de cultivo (isolamento de fungos dematiáceos) acarretará no avanço do conhecimento da biodiversidade e ecologia do grupo, além de grande chance de revelar espécies ainda desconhecidas para a ciência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade”

A Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade” (FEENA) é uma Unidade de Conservação, que pertence ao grupo das Unidades de Uso Sustentável prevista na Lei Federal n.º 9.985/2000. É administrada pelo Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), órgão da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente de São Paulo-SP (GOVERNO..., 2021). A unidade está situada no Estado de São Paulo, Brasil, e abrange os municípios de Rio Claro-SP e Santa Gertrudes-SP. Apresenta notáveis características paisagísticas, como edificações históricas, lago artificial e plantios de diversas espécies arbóreas nativas e exóticas, dentre as últimas, sobretudo o eucalipto. Compõe um banco genético *ex situ* com mais de 60 espécies de *Eucalyptus*, de relevância biológica e comercial, reconhecida na área da silvicultura (REIS; PONTALTI, 2005).

Segundo o Plano de Manejo da FEENA (REIS; PONTALTI, 2005), as atividades de uso público são estimuladas, a fim de manter um elo entre a Floresta e a sociedade. Monitoria de visitantes, centro de visitantes e voluntariado para recepção do público, placas e materiais informativos, organização de eventos, promoção da Unidade em eventos externos, educação ambiental e implantação de trilhas são alguns dos tipos de atividades praticadas. As atividades de pesquisa ocorrem através da submissão do projeto ao Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), e se aprovado, o projeto passa a fazer parte do Cadastro de pesquisas aprovadas. Cerca de 75% das pesquisas cadastradas e em andamento na FEENA têm como proponente os pesquisadores da UNESP do campus de Rio Claro.

Tratando-se de fungos, existem alguns trabalhos recentes que foram realizados na Floresta Estadual, envolvendo o isolamento destes microrganismos. Baron (2014) teve como objetivo a identificação morfológica, molecular e filogenética de fungos dematiáceos selecionados previamente para estudos da avaliação de seu potencial de biodegradação do poluente tolueno, dentre eles 13 isolados provenientes de fragmentos de cascas de *Eucalyptus tereticornis*.

Outros trabalhos relevantes, como de Angelini (2016), podem ser citados. Este estudo avaliou o potencial de microrganismos isolados de solo quanto à presença das enzimas nitrila hidratase (NHase)/amidase e/ou nitrilase (Nase), e sua capacidade de converter mandelonitrila em ácido mandélico e/ou mandelamida.

Canali (2017) realizou um isolamento de fungos entomopatogênicos a partir de

rainhas jovens da formiga *Atta sexdens rubropilosa* coletadas na Floresta, para fins de aplicação em controle biológico de formigas cortadeiras. Lacerda (2018) descreveu a comunidade fúngica endofítica presente em diferentes fases foliares (frescas e em serapilheira em diferentes estágios de maturação) de *Eucalyptus microcorys*.

A Floresta pode ser considerada como um grande e inestimável patrimônio cultural, biológico e genético. É fundamental que esses recursos sejam explorados adequadamente, bioprospectados e conservados, de forma a divulgar e valorizar o patrimônio público e ambiental.

2.2. Fungos: características e importância

Os fungos são organismos eucarióticos, aclorofilados, heterotrófos que obtêm alimento absorvendo substâncias orgânicas dissolvidas por meio de sua superfície celular. Em geral, possuem hifas como estrutura vegetativa filamentosa básica, as quais juntas dão origem ao que se chama micélio. Suas ramificações formam praticamente uma grande “rede” de diversas interações com outros organismos da micro e mesofauna. Muitos fungos também são unicelulares como as leveduras, as quais possuem menor capacidade de penetração, colonizando superfícies de partículas (RAGHUKUMAR, 2017).

A reprodução destes organismos acontece mediante a dispersão de esporos ou células, produzidos sexuadamente ou assexuadamente. Muitos fungos perderam a capacidade de se reproduzir sexuadamente e produzem apenas esporos assexuados. Participam da decomposição de matéria orgânica como sapróbios, sendo essenciais para a reciclagem de nutrientes na Terra (HAWKER, 2016; RAGHUKUMAR, 2017).

Representam um agrupamento polifilético (espécies apresentam dois ou mais ancestrais diferentes) (MAZZAROLO, 2005), sendo organismos extremamente diversos na árvore da vida. Essa diversidade é vista em sua ecologia, evolução, morfologia, fisiologia e filogenia. Micologistas taxonomistas descreveram apenas cerca de 135.000 a 150.000 espécies, o que estima aproximadamente 10% no máximo do número total de fungos no mundo (RAJA; OBERLIES; STADLER, 2021).

Os fungos estão classificados atualmente em 19 filos (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020), sendo eles: Aphelidiomycota, Ascomycota, Basidiobolomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Entorrhizomycota, Glomeromycota, Kickxellomycota,

Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomyota, Rozellomycota e Zoopagomycota.

Ascomycota (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020) compreende representantes com hifas septadas e algumas leveduras. A taxonomia do filo está sendo constantemente revista nos últimos anos. Com cerca de 32.300 espécies, este filo apresenta táxons que possuem aplicações biotecnológicas diversas, como na produção de alimentos, de enzimas aplicadas em biorremediação, nas indústrias têxtil e farmacêutica (NEVALAINEN, 2020). Também há registros da ocorrência de patógenos de humanos e animais (KOHLENER; PERFECT, 2015).

Os ascomicetos dematiáceos (Pezizomycotina) estão distribuídos em duas classes, Dothideomycetes e Eurotiomycetes (Chaetothyriomycetidae) (AMETRANO; GRUBE; MUGGIA, 2019; GUEIDAN *et al.*, 2011; MUGGIA *et al.*, 2021; WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020).

Pleomorfismo constitui outra característica dos fungos melanizados, os quais podem expressar forma filamentosa ou leveduriforme, como uma resposta ao nicho ecológico que habitam. A presença de melanina favorece fungos patogênicos ou oportunistas contra respostas imunes inatas de seu hospedeiro. Este pigmento atua de forma decisiva na determinação do nível de virulência de algumas espécies, seja em animais ou em plantas (POLAK, 1990) e está associado à sobrevivência e capacidade de competição de fungos em ambientes hostis (VICENTE *et al.*, 2017).

As melaninas são divididas em três grupos principais: eumelaninas, feomelaninas e alomelaninas (GÓMEZ-MARÍN *et al.*, 2007). O 1,8-di-hidroxinaftaleno, produzido através da via DHN-melanina, foi o principal pigmento escuro detectado em *Cladosporium cladosporioides*, apesar da natureza das melaninas nesses fungos dematiáceos ser complexa (LLORENTE *et al.*, 2012).

A versatilidade ambiental de fungos melanizados sugere que eles mantêm um conjunto compartilhado de características, o que facilita a adaptação a novos habitats (AMETRANO; MUFFIA; GRUBE, 2019). A alta resistência a fatores estressantes fisiológica e biologicamente, como a escassez de água e nutrientes, temperaturas extremas, alta radiação, toxicidade, acidez e salinidade, são características marcantes encontradas nestes microrganismos (AMETRANO; MUGGIA; GRUBE, 2019; DE HOOG, 1993; MUGGIA *et al.*, 2021; STERFLINGER, 2006).

Por outro lado, alguns Chaetothyriales e Pleosporales possuem potencial de aplicação em biodegradação de hidrocarbonetos voláteis (BTEX) e aromáticos (HAP), poluentes ambientais tóxicos (BARON *et al.*, 2021). Assim, podem ser utilizados em processos de biorremediação e em estudos de bioprospecção de novos produtos naturais, como enzimas

(BARON, 2014). Existem poucas espécies oportunistas na ordem Pleosporales, o que favorece a exploração de seu potencial biotecnológico, devido à sua capacidade de degradação xenobiótica, ainda pouco estudada no grupo (BARON *et al.*, 2021). Devido às características extremofílicas de algumas espécies da ordem Pleosporales, i.e. *Cryomyces antarcticus* e *Cryomyces minteri*, pesquisadores sugerem que possam resistir a vôos interplanetários e permanecer por longo período em Marte (ONOFRI *et al.*, 2008).

Espécies da ordem Capnodiales foram encontradas associadas a rochas, como patógenas de plantas e humanos, epífitas, sapróbias, endófitas em plantas de desertos quentes, em águas hipersalinas e espécies liquenizadas (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2020; EGIDI *et al.*, 2014). Na ordem Cladosporiales, recém proposta, são encontradas como sapróbicas, endofíticas, fungícolas, liquenícolas e patogênicas (animais e vegetais) (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2020). Já na ordem Dothideales foram encontradas como endófitas ou epífitas de plantas vivas e como sapróbias, patogênicas e oportunistas, isoladas de poeira interna doméstica, rochas, ambientes com altas concentrações de sal e álcool (SCHOCH *et al.*, 2006; VICENTE *et al.*, 2008; HUMPHRIES *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2010). Pleosporales, a maior ordem de sua classe, possui espécies que habitam vários substratos. Podem ser encontradas como epífitas, endófitas, parasitas de plantas, fungos e insetos, liquenizadas, sapróbias (ZHANG *et al.*, 2012), ou ainda em fontes hidrotermais (PANG *et al.*, 2019).

2.3. Fungos dematiáceos Eurotiomycetes

Os fungos dematiáceos Eurotiomycetes são principalmente encontrados na ordem Chaetothyriales (subclasse Chaetothyriomycetidae). Outras ordens próximas são Phaeomoniellales (abriga principalmente endófitos e patógenos de plantas) (CHEN *et al.*, 2015), Pyrenulales e Verrucariales (principalmente liquenizadas e ocupam superfícies de rochas) (GEISER *et al.*, 2006; GUEIDAN *et al.*, 2008; GUEIDAN *et al.*, 2014; SCHOCH *et al.*, 2020).

Oligotrófico e diversificado, o conjunto de espécies que Chaetothyriales representa pode ser encontrado em vários substratos (GUEIDAN *et al.*, 2014). Assim como apresentam diversas adaptações, há uma ampla variedade de nichos ocupados pelo grupo, como saprotróficos e patogênicos (TEIXEIRA *et al.*, 2017). O particular interesse pela ordem Chaetothyriales está relacionado à habilidade de diversos membros causarem doenças oportunistas em humanos (QUAN *et al.*, 2021), por sua aplicação biotecnológica (DO NASCIMENTO, 2017) e por conta da falta de conhecimento acerca da taxonomia do grupo.

Algumas espécies apresentam um alto grau de especialização ecológica, particularmente notável nas que colonizam formigas (QUAN *et al.*, 2021).

A ordem Chaetothyriales demonstra elevada diversidade, sendo atualmente reconhecidas seis famílias, são elas: *Chaetothyriaceae*, *Cyphellophoraceae*, *Coccodiniaceae*, *Epibryaceae*, *Herpotrichiellaceae* e *Trichomeriaceae*. Os táxons que as representam estão divididos em 42 gêneros e 273 espécies (QUAN *et al.*, 2020).

As espécies da família *Chaetothyriaceae* são principalmente epífitas, colonizando a superfície de plantas vivas. A família *Cyphellophoraceae* apresenta ecologia principal epífita, mas também inclui oportunistas moderados de pele e unhas humanas. *Coccodiniaceae* representa uma família com poucas espécies epilíticas e epifíticas, sendo de difícil cultivo e sequenciamento. A família *Epibryaceae* apresenta várias espécies de fungos briófilos e liquenícolas, bem como espécies que habitam rochas, solo e plantas vasculares. Já a *Trichomeriaceae* é composta por espécies que habitam rochas e espécies epifíticas (CHOMNUNTI *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2014; ISOLA *et al.*, 2016; QUAN *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

A família *Herpotrichiellaceae* reúne a maioria dos fungos dematiáceos e abrange espécies consideradas clinicamente importantes, oportunistas de infecção traumática em humanos, como a cromoblastomicose, micetomas, cistos feumicóticos e feohifomicose. Investigações revelaram a existência espécies sapróbias conhecidas como agentes de cromoblastomicose e feo-hifomicose, *Cladophialophora bantiana*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Phialophora verrucosa* (VICENTE *et al.*, 2001, DE HOOG, 1993). A existência de espécies patogênicas eventualmente relatadas como sapróbias indica que fatores que promovem a virulência no hospedeiro humano, podem estar ligados à sobrevivência do fungo em seu nicho ecológico natural. Este conceito é postulado de “Virulência acidental” (CASADEVALL; PIROFSKI, 2007).

Algumas linhagens são conhecidas por atuar na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, principalmente espécies da família *Herpotrichiellaceae*, como *Cladophialophora* e *Exophiala* (PRENAFETA-BOLDÚ; SUMMERBELL; DE HOOG, 2006). Blasi *et al.* (2016) realizaram um ensaio com *Exophiala mesophila* (CBS 120910) e *Cladophialophora immunda* (CBS 110551), isoladas de um paciente com sinusite crônica e uma amostra de solo poluída (posto de gasolina), respectivamente. Foi constatada a capacidade destas linhagens de crescer em tolueno, um hidrocarboneto aromático e poluente ambiental que está presente no petróleo e em combustíveis, evidenciando o potencial das leveduras negras em relação à biorremediação (BARON *et al.*, 2021).

A taxonomia dos Chaetothyriales é muito complexa e ainda está longe de ser elucidada. De acordo com o navegador taxonômico do NCBI (SCHOCH *et al.*, 2020), ainda existem grupos considerados como “Chaetothyriomycetidae *incertae sedis*”, “*unclassified Chaetothyriomycetidae*” e “*uncultured Chaetothyriomycetidae*”, demonstrando que o conhecimento acerca da diversidade desses táxons ainda é pouco. Utilizar técnicas independentes e dependentes de cultivo podem contribuir grandemente para a obtenção de novas sequências e isolados, colaborando com o avanço e classificação taxonômica dos Chaetothyriales.

2.4. Métodos independentes e dependentes de cultivo microbiano

A adoção de novas estratégias para estudos da diversidade microbiana tem sido muito recomendável. Atualmente, os métodos independentes de cultivo têm se mostrado uma ferramenta extremamente útil e informativa. A metataxonomia, por exemplo, ajuda a caracterizar a microbiota de uma amostra a partir de regiões específicas do genoma. Podem ser criadas árvores, demonstrando as relações entre todas as sequências obtidas. Desta forma, é possível realizar a descrição de comunidades microbianas com papéis funcionais, como o caso da microbiota de laticínios brasileiros (FRAZILIO *et al.*, 2020).

A construção de bibliotecas metagenômicas por DNAs ambientais fornece uma fonte indispensável para se conhecer os recursos genéticos presentes no ambiente, frequentemente não revelados pelas técnicas convencionais. Esses recursos ajudam os pesquisadores na prospecção *in silico* de informações (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Também é recomendada no estudo de fungos que apresentam crescimento lento em meio de cultura artificial, como várias espécies de dematiáceos. Assim, a metataxonomia se mostrou uma alternativa confiável e rápida em estudos que buscam conhecer as comunidades microbianas de um determinado substrato (DE FÁTIMA COSTA *et al.*, 2020).

As análises de comunidades microbianas usando técnicas dependentes de cultivo baseiam-se no isolamento dos microrganismos em meios de cultura artificiais. Utilizando-se diferentes meios de cultura e condições ambientais, é possível maximizar a recuperação de uma variedade de espécies (morfológica e fisiologicamente), principalmente em estudos voltados à diversidade do solo (HILL *et al.*, 2000). Apesar de serem vantajosas por permitirem coleções de culturas puras (LV *et al.*, 2015), as técnicas dependentes de cultivo apresentam limitações. Resultados de estudos independentes e dependentes de cultivo demonstraram que apenas até

10% da diversidade microbiana do solo é recuperada mediante o uso de técnicas dependentes de cultivo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A combinação de métodos independentes e dependentes de cultivo pode revelar comunidades microbianas complexas (PUŠKÁROVÁ *et al.*, 2016). Ambos os métodos devem ser vistos como abordagens complementares e integradas para uma avaliação mais confiável da amostragem de microrganismos (GARCIA, 2016).

É incontestável que aliar diferentes estratégias, principalmente tratando-se da complexidade taxonômica dos fungos dematiáceos, pode favorecer a obtenção de resultados concretos e complementares. Assim, problemas de complexidade e desconhecimento da diversidade do grupo podem ser contemplados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade de fungos, com enfoque na ordem Chaetothyriales, associados a eucalipto e bambu, cultivados na Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade”.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a diversidade de fungos em córtex vegetal e solo rizosférico de *Eucalyptus tereticornis* e *Bambusa vulgaris*, em diferentes setores da Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade” utilizando-se método independente de cultivo;
- Verificar a presença de fungos de importância médica em amostras ambientais;
- Acessar a diversidade de fungos dematiáceos cultiváveis, mediante método dependente de cultivo seletivo;
- Identificar os isolados por métodos clássicos e/ou moleculares, mediante análises morfológicas e filogenéticas;
- Levantar informações ecológicas dos grupos estudados e buscar isolados ambientais ainda não descritos para a ciência;
- Verificar, nas amostras estudadas, a ocorrência de representantes da ordem Chaetothyriales e afins, relatados como oportunistas, potenciais patogênicos, ou importantes para a bioeconomia, utilizando a combinação de técnicas;
- Incrementar o acervo de fungos do Laboratório de Microbiologia Ambiental/Táxon (LMA).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

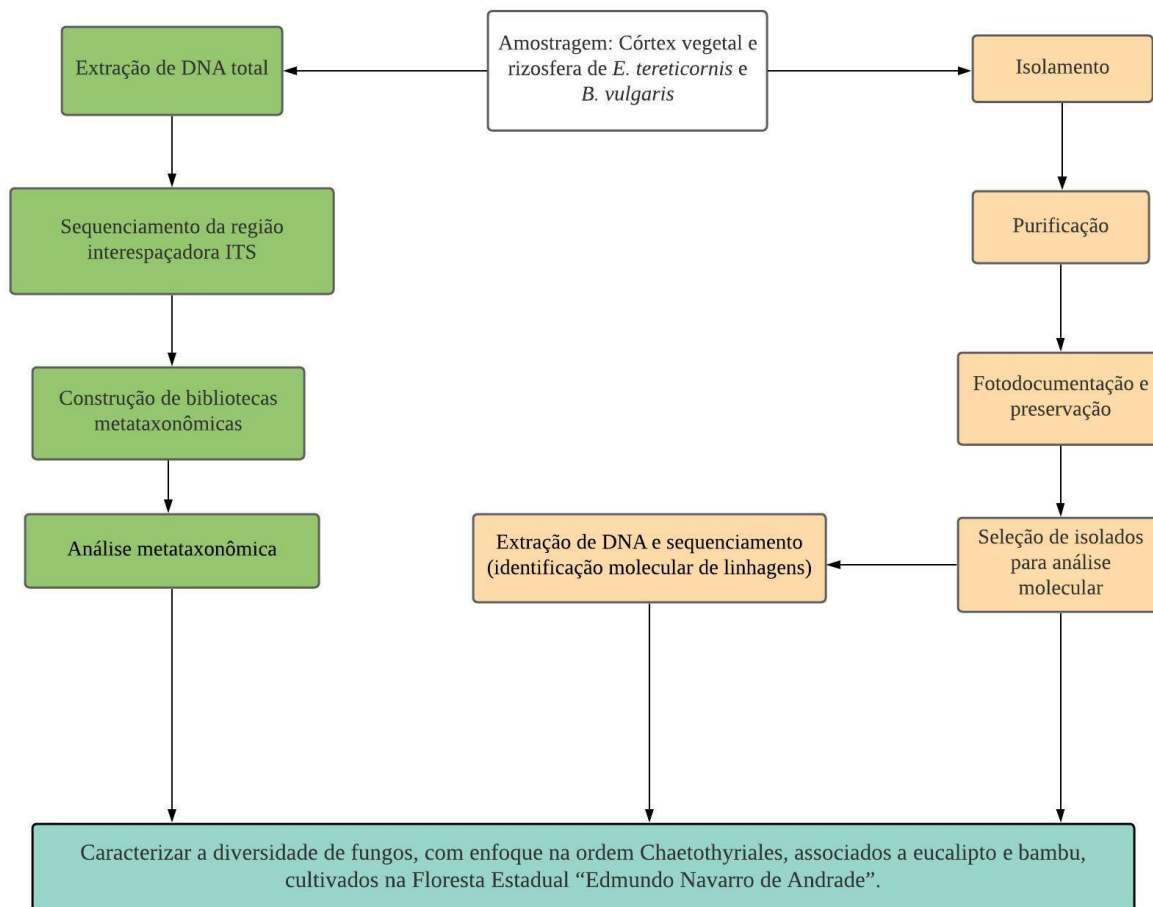
O projeto obteve aprovação pelo COTEC (Comissão Técnica Científica do Instituto Florestal), órgão que durante o período de execução do projeto (Processo SIMA nº 008.598/2019) era responsável pelas pesquisas realizadas. Atualmente, o Instituto Florestal juntamente com outros Institutos ambientais, passaram a compor o Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA).

O estudo independente de cultivo (metataxonomia) contou com a colaboração do Laboratório de Microbiologia Molecular (LABMICRO) do Departamento de Patologia Básica, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e com o Centro de Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense Taxonline (CMRP/Taxonline), Curitiba, PR. A Método de identificação molecular dos isolados obtidos foi realizada no laboratório de biologia molecular, na Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Paulínia, SP.

A análise dependente de cultivo foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA)/Táxon, localizado no Centro de Estudos Ambientais (CEA), pertencente ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE) na Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – campus de Rio Claro, SP. Na etapa de moagem das amostras de tecidos vegetais, houve colaboração do Laboratório de Espectrometria Atômica, também no CEA/UNESP.

O fluxograma abaixo (Figura 1) esquematiza e resume as etapas do projeto, destacando a sequência do andamento das atividades.

Figura 1. Fluxograma das atividades do projeto. Em azul - objetivo geral; verde – etapas da análise independente de cultivo e laranja – etapas da análise dependente de cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1 Área de estudo e amostragem

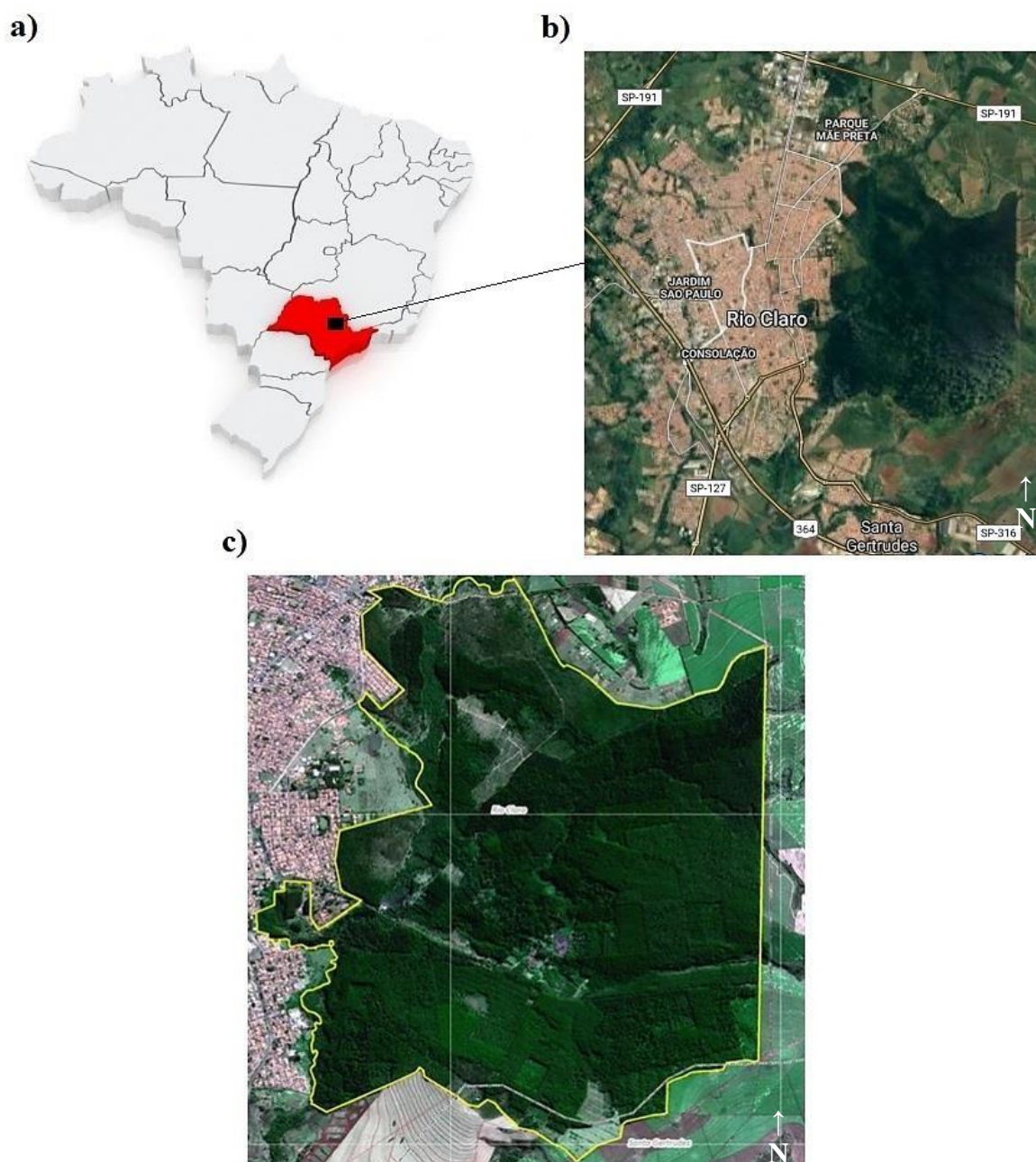
A FEENA está localizada na região centro-leste do Estado de São Paulo, Brasil, nos municípios de Rio Claro – SP e Santa Gertrudes-SP (Figura 2).

A área da Unidade corresponde a 2.230,53 hectares, sendo circundada por fazendas (predominando a cultura cana-de-açúcar), usina, centros urbanos, entre outros. O clima é caracterizado pelo verão quente e chuvoso e inverno frio e seco, não havendo um bioma padrão definido, já que a área conta com antigos plantios homogêneos de *Eucalyptus* sp. e outras essências arbóreas nativas e exóticas, com ocorrência de vegetação nativa caracterizada como sub-bosque ou regeneração natural. A FEENA está inserida na bacia hidrográfica do rio Corumbataí, mais precisamente na sub-bacia do Ribeirão Claro (REIS; PONTALTI, 2005).

Para o estudo foram coletadas amostras (Tabela 1) de *Eucalyptus tereticornis* (talhões 29, 58, 91 e 4a) e *Bambusa vulgaris* (dois diferentes pontos de coleta, sem identificação em talhões), dispostos em pontos distantes para uma amostragem setorial (Figura 3). Foram

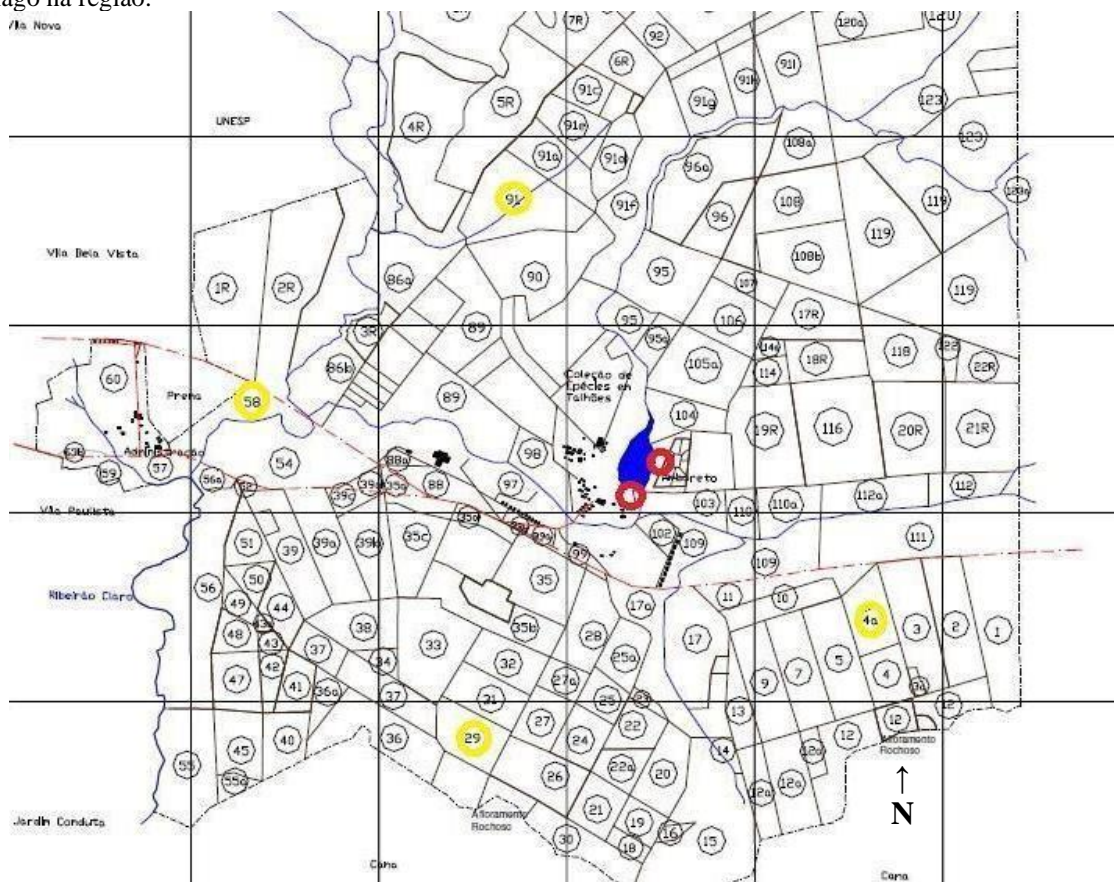
coletadas 12 amostras, sendo de córtex vegetal das plantas e do solo rizosférico (aproximadamente 15 cm de profundidade). Cada amostra foi composta por amostragem de 5 pontos diferentes (Figuras 4 e 5).

Figura 2. Localização da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA) dentro dos municípios de Rio Claro-SP e Santa Gertrudes-SP no Estado de São Paulo, Brasil.



Fonte: a) Depositphotos (<https://br.depositphotos.com/stock-photos/mapa-s%C3%A3o-paulo.html>), b) Google Maps e c) Reis e Pontalti (2005).

Figura 3. Mapa de localização dos talhões de *Eucalyptus tereticornis* (Reis *et al.*, 2005). Os destaques em amarelo indicam os talhões correspondentes aos pontos de coleta de eucaliptos (talhões 58, 91, 4a e 29), e em vermelho os pontos de coleta aproximados de *Bambusa vulgaris* (sem numeração de talhão). A área azul indica presença de um lago na região.



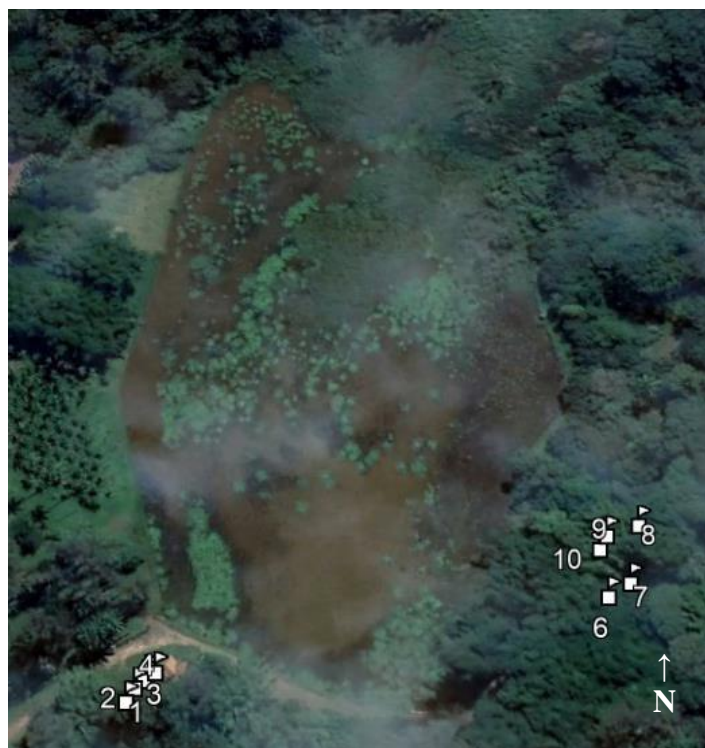
Fonte: Reis e Pontalti (2005) e editado pela autora.

Figura 4. Pontos de coleta. As quatro áreas de eucaliptos, talhões 29 (A-E), 58 (F-J), 4a (K-O) e 91 (P-T), e ao centro os pontos de coleta de bambus (1-10).



Fonte: Elaborado pela autora, fotocaptada do Google Earth.

Figura 5. Pontos de coleta de bambus. Área 1 a esquerda (1-5), e área 2 a direita (6-10). Em marrom, o lago da unidade.



Fonte: Elaborado pela autora no Google Earth.

As amostras foram coletadas com pá e/ou colher (solo rizosférico) e serra e/ou faca (córtex vegetal) esterilizados, armazenadas em tubos Falcon esterilizados (Figura 6), etiquetadas e mantidas em sacos plásticos dentro de caixa de isopor, a temperatura ambiente no Laboratório de Microbiologia Ambiental/Táxon, no CEA/UNESP.

As amostras coletadas foram identificadas com etiquetas (como segue: amostra de rizosfera do talhão de *E. tereticornis* n° 58 = ET58R; amostra de córtex vegetal da área 2 de *B. vulgaris* = BA2C] + data + nome do coletor). Dados sobre as coordenadas geográficas de cada ponto de coleta também foram coletados (Quadro 1).

Figura 6. Coleta de amostras de eucalipto. a) Coleta de solo rizosférico, b) Coleta de córtex vegetal, c) Amostras de solo e d) Amostras de córtex vegetal.



Fonte: Arquivo pessoal.

Quadro 1. Identificação das amostras coletadas.

Código	Espécie	Amostra	Data	Local	Coordenadas geográficas	Tipo de solo
ET29C	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Córtex vegetal	02/08/2019 e 19/02/2020	Talhão 29 de <i>Eucalyptus</i>	22°25'28.70"S 47°31'55.73"O	Argissolo Vermelho Eutrófico
ET58C	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Córtex vegetal	02/08/2019 e 19/02/2020	Talhão 58 de <i>Eucalyptus</i>	22°24'34.37"S 47°32'28.98"O	Argissolo Vermelho Eutrófico
ET4aC	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Córtex vegetal	02/08/2019 e 19/02/2020	Talhão 4a de <i>Eucalyptus</i>	22°25'12.13"S 47°30'40.81"O	Argissolo Vermelho Eutrófico
ET91C	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Córtex vegetal	02/08/2019 e 19/02/2020	Talhão 91 de <i>Eucalyptus</i>	22°24'6.96"S 47°31'51.57"O	Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico
BA1C	<i>Bambusa vulgaris</i>	Córtex vegetal	02/08/2019 e 19/02/2020	Área 1 de <i>Bambusa</i>	22°24'51.55"S 47°31'22.73"O	Gleissolo Háptico Tb Distrófico
BA2C	<i>Bambusa vulgaris</i>	Córtex vegetal	02/08/2019	Área 2 de <i>Bambusa</i>	22°24'50.29"S 47°31'16.18"O	Gleissolo Háptico Tb Distrófico
ET29R	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Solo rizosférico	02/08/2019	Talhão 29 de <i>Eucalyptus</i>	22°25'28.70"S 47°31'55.73"O	Argissolo Vermelho Eutrófico
ET58R	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Solo rizosférico	02/08/2019	Talhão 58 de <i>Eucalyptus</i>	22°24'34.37"S 47°32'28.98"O	Argissolo Vermelho Eutrófico
ET4aR	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Solo rizosférico	02/08/2019	Talhão 4a de <i>Eucalyptus</i>	22°25'12.13"S 47°30'40.81"O	Argissolo Vermelho Eutrófico
ET91R	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Solo rizosférico	02/08/2019	Talhão 91 de <i>Eucalyptus</i>	22°24'6.96"S 47°31'51.57"O	Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico
BA1R	<i>Bambusa vulgaris</i>	Solo rizosférico	02/08/2019	Área 1 de <i>Bambusa</i>	22°24'51.55"S 47°31'22.73"O	Gleissolo Háptico Tb Distrófico

BA2R	<i>Bambusa vulgaris</i>	Solo rizosférico	02/08/2019	Área 2 de <i>Bambusa</i>	22°24'50.29"S 47°31'16.18"O	Gleissolo Háptico Tb Distrófico
------	-------------------------	------------------	------------	--------------------------	--------------------------------	---------------------------------

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2. Método independente de cultivo

Além de possibilitar um panorama da diversidade fúngica, os resultados da análise independente de cultivo foram utilizados para orientar a análise dependente de cultivo para fungos dematiáceos.

4.2.1. Extração do DNA total

A extração do DNA total da comunidade microbiana das amostras (córtex vegetal e solo rizosférico) foi realizada utilizando o kit E.Z.N.A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-tek), de acordo com as instruções do fabricante.

Para o aumento da superfície de contato das amostras mais resistentes (tecidos vegetais) foi feita a pulverização das amostras, utilizando um moinho criogênico programável (marca: Spex Sample Prep.; linha: Freezer Mill 6875), o qual resfria o conteúdo da amostra a temperaturas criogênicas num frasco de moagem imerso em nitrogênio líquido, moendo e pulverizando-as por indução magnética. O programa utilizado foi: Tempo de resfriamento: 1 minuto; Número de ciclos: 3; Tempo de ciclo: 1 minuto e Taxa de ciclos por segundo (número de vezes que a barra metálica se choca com a amostra): 15.

4.2.2. Quantificação e verificação da qualidade do DNA

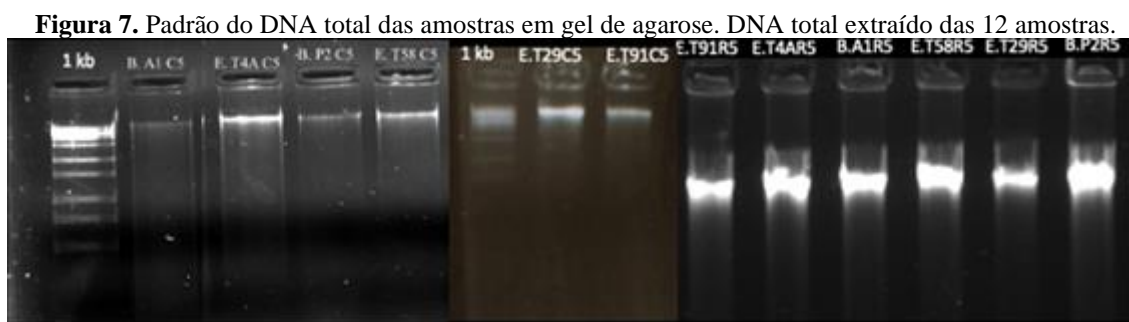
A quantificação de DNA foi medida por espectrofotometria, através da leitura da quantidade de luz absorvida pelo DNA em solução (comprimento de onda de 260:280 nm e 260:230 nm). Quanto maior a absorção de luz nesses comprimentos de ondas, maior a concentração de DNA na solução. Sabendo que o valor de absorbância (A) de 1,0 corresponde a uma concentração de 50 µg de DNA por mL, é possível calcular a concentração do DNA obtido das amostras e descartar amostras de ácido nucleico que estejam contaminadas com outras moléculas (proteínas, compostos orgânicos, outros). O cálculo da relação de 260 nm:

280 nm indica que valores entre 1,4 e 2,0 indicam pureza adequada das extrações de DNA, enquanto valores abaixo de 1,4 podem significar a presença de proteínas ou outros contaminantes.

A concentração de DNA total das amostras foi determinada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. O padrão da relação considerado como puro foi o de ~1,8.

A concentração de DNA também foi determinada por quantificação fluorimétrica através do fluorímetro Qubit da Thermo Fisher Scientific. O sistema utilizado foi “Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit”, seguindo-se as recomendações do fabricante.

A confirmação da qualidade e integridade do DNA extraído de cada amostra foi visual, realizada através de eletroforese em gel de agarose e visualizado em luz Ultravioleta (UV) (Figura 7).



Fonte: Maria Eduarda Glisolia

4.2.3. Preparação de bibliotecas de amplicons da região ITS

A construção das bibliotecas metataxonômicas foram realizadas a partir do sequenciamento da região inter espaçadora (ITS2) para fungos. As bibliotecas foram construídas a partir dos fragmentos sequenciados obtidos por amplificação via PCR das amostras.

A região ITS2 foi amplificada a partir das amostras purificadas utilizando os primers ‘ITS_3F’ (5’- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC -3’) e ‘ITS_4R’ (5’- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTC CTC CGC TTA TTG ATA TGC - 3’).

Os amplicons obtidos das amostras foram anelados aos amplicons do index Illumina Nextera, e foram sequenciados na plataforma MiSeq da Illumina Inc. seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.4. Análise metataxonômica da diversidade fúngica

Para a análise foi gerado um arquivo de metadados incluindo todas as informações e descrição das amostras, categoria de cada dado, numérico ou categórico, conforme apresentado no anexo I. As sequências foram analisadas utilizando o programa Qiime2 (v.2017.6.0), Quantitative Insights Into Microbial Ecology, seguindo o pipeline *Casava 1.8 paired-end demultiplexed fastq* e o “Atacama soil microbiome tutorial”. A classificação taxonômica foi feita utilizando o feature-classifier *classify-sklearn* (PEDREGOSA *et al.*, 2011), que utiliza VSEARCH global alignment, e o banco UNITE v8.2020 (04/02/2020) foi utilizado para a classificação.

Também foi realizada a comparação por sondas, pequenas sequências de oligonucleotídeos (25–41 bp) específicos capazes de identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), propostas para o reconhecimento adicional de herpotriqueláceos agentes de doenças humanas (DE FÁTIMA COSTA *et al.*, 2020)

A riqueza de espécies (métrica “Observed OTUs”) foi determinada (WEISS *et al.*, 2017), sendo observadas quantas OTUs foram detectadas em cada amostra. A alpha- diversidade (α) de espécies (através da métrica “Shannon”) também foi avaliada, demonstrando como estão distribuídos os microrganismos entre si. É possível detectar se temos uniformidade de espécies (nível de abundância semelhante) ou algumas espécies dominam mais que outras.

Foi feita a análise de Coordenadas Principais (PCoA) com dissimilaridade de Bray-Curtis, medida de beta-diversidade (β), sendo um método que propicia a visualização de similaridades e dissimilaridades de abundâncias microbianas. A partir da matriz gerada é possível atribuir uma localização em um espaço, como um gráfico, permitindo avaliar a distância entre comunidades (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

O esforço amostral foi avaliado através da composição da curva de rarefação, para verificação da capacidade de amostrar toda a comunidade.

Os gráficos de representação taxonômica e diversidade foram gerados online com a ferramenta METACOMET (Metagenomics Core Microbiome Exploration Tool), a partir do arquivo BIOM gerado no final da análise Qiime2, com o visualizador on-line do Qiime2 (Qiime2 View) e a partir do software R (mediante a linha de comando expressa no anexo II).

4.2.5. Alinhamento Blast/NCBI

Para as sequências de dematiáceos da ordem Chaetothyriales que foram classificadas

até o nível de gênero na análise metataxonômica acima, foi utilizada a ferramenta de alinhamento Blast, do Banco NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1980). Sequências acima de 98% de identidade foram consideradas como espécies equivalentes.

4.3. Método dependente de cultivo

O método foi utilizado para acessar os fungos dematiáceos cultiváveis.

4.3.1. Isolamento e purificação dos isolados

O método de flotação em óleo mineral (SATOW *et al.*, 2008) foi aplicado, visando o isolamento seletivo de leveduras negras e afins. Utilizou-se 10 gramas de amostra de solo rizosférico ou córtex vegetal, que foram adicionados respectivamente em Erlenmeyers estéreis de 250 mL com 100 mL de solução salina e de 125 mL com 50 mL de solução salina, ambos contendo 200 µg/mL de penicilina, 200 µg/mL de cloranfenicol, 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de cicloheximida.

Os frascos foram homogeneizados manualmente e incubados a 20-22°C por 30 minutos. Em seguida, um volume de 20 mL de óleo mineral foi adicionado a cada frasco, seguidos de agitação em vórtex por 5 min e repouso de 20 min. Com uma pipeta, o volume aproximado de 150µL (amostra de córtex vegetal) e de 80-100µL (amostra de solo rizosférico) foi retirado da interfase da solução (óleo/solução salina), inoculado em placa contendo Ágar Mycosel e espalhado com alça de Drigalski.

Os volumes diferentes no Erlenmeyer e alíquotas inoculados foram baseados na diferença de diversidade e riqueza que amostras de solo apresentam quando comparadas com amostras de tecidos vegetais. Foi utilizado um total de 15 placas por amostra em duplicata (30 placas ao todo por amostra) sendo incubadas por 30 dias, a 28°C inicialmente (2 primeiros dias), e posteriormente a temperatura ambiente e/ou à 5°(± 3) C, conforme necessidade de conter o crescimento de fungos indesejados, com rápido desenvolvimento. Quando necessário, as placas foram incubadas novamente a 28°C e de forma alternada entre as temperaturas mais baixas.

Após o crescimento das colônias negras, a purificação foi feita por estriamento em placas com meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Quando necessário (colônias crescendo muito próximas a de fungos indesejados), foi feita lavagem do material com gotas de água destilada esterilizada. A água foi gotejada em uma lâmina de vidro autoclavada, o repique do fungo a ser isolado (antes de ser transferido para a placa nova) foi lavado na gota, para a eliminação de

excesso de esporos e hifas contaminantes.

A fim de buscar a viabilidade e pureza das linhagens que passaram por sequenciamento, a técnica de cultivo monospórico por diluição foi aplicada. Uma alçada de esporos e/ou micélio foi transferida para microtubo contendo 1 mL de água destilada esterilizada, sendo feita homogeneização manual, transferiu-se 100 µL para outro microtubo contendo 1 mL de água destilada. O processo seguiu até a quinta diluição, onde os fungos apresentaram o crescimento de colônias isoladas. Foram semeados 100 µL da última diluição sob a superfície de BDA, espalhados com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 28°C até o surgimento de colônias isoladas.

Além do isolamento, foi feita a determinação do teor de umidade das amostras. O conteúdo gravimétrico de água numa amostra é a massa de água presente, e diz respeito à porcentagem da massa da amostra correspondente à água. Pode ser medida a partir da diferença entre a massa da amostra úmida e a amostra seca, conhecida como massa seca (VORONEY; SHARPE, 2019). O teor de umidade expresso em porcentagem foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{Conteúdo gravimétrico de água do solo (\%)} = [\text{massa de solo úmido (g)} - \text{massa de solo seco (g)}] / \text{massa de solo úmido (g)} \times 100$$

Assim, as amostras em seu estado natural tiveram 1g de seu volume pesadas, seguidas de secagem em estufa a 105°C, até a secagem completa do material e determinação da massa seca em balança analítica. A partir dos dados obtidos, foram gerados os gráficos com a ferramenta Microsoft Excel®.

4.3.2. Preservação das linhagens

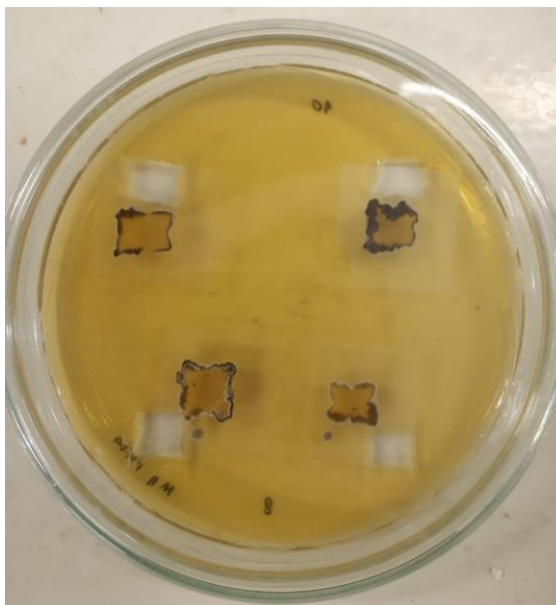
Quando puros, os isolados foram preservados em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939), gerando uma coleção de trabalho. Para tal, os fungos foram cultivados em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e incubados à 28°C, por até 10 dias. Após, o ágar com micélio foi cortado em blocos de aproximadamente 4-6mm com lâmina de aço esterilizada e os blocos foram transferidos assepticamente para frascos criogênicos contendo aproximadamente 5 mL de água destilada esterilizada, em duplicata. Os frascos foram vedados e armazenados sob refrigeração à temperatura de 5 (± 3) °C. O depósito na Coleção Brasileira de

Microrganismos de Ambiente e Indústria encontra-se em andamento, onde outras técnicas de preservação como criogenia e liofilização também serão utilizadas.

4.3.3. Microcultivo

Em uma placa de Petri com meio Ágar Malte 2%, blocos de aproximadamente 5-8mm foram cortados com uma lâmina de aço esterilizada e depositados sobre o ágar, da própria placa. Um inóculo do fungo de interesse foi transferido para o centro e laterais do bloco (Figura 8), e em seguida uma lamínula esterilizada foi colocada sobre ele. As placas foram incubadas à 28°C e em até 7 dias (Figura 7) as lamínulas contendo fungos sob a superfície foram transferidas para uma lâmina esterilizada com uma gota do corante azul de metileno. Após a secagem da lâmina, as lamínulas foram vedadas com esmalte incolor e levadas para observação ao microscópio de luz (JOHNSON, 1946; NUGENT *et al.*, 2006; RIDDEL, 1950; adaptadas).

Figura 8. Técnica de microcultivo para observação das estruturas dos fungos.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.4. Identificação molecular dos isolados

4.3.5. Seleção dos isolados para identificação

Dos fungos dematiáceos obtidos através do isolamento, 22 foram selecionados para serem identificados molecularmente. O critério utilizado para a seleção foi baseado nas características micro e macro morfológicas das colônias, como estrutura reprodutiva quando visível, tamanho, melanização e tempo de crescimento. Prioritariamente foram selecionados isolados diferentes entre si.

4.3.6. Extração de DNA

A extração do DNA dos fungos foi feita com base no protocolo de Aamir *et al.* (2015), com uso de pérolas de vidro estéreis, fenol, clorofórmio e álcool isopropílico. O DNA genômico foi extraído de culturas com cinco a sete dias de crescimento em placas Petri. O micélio fúngico da placa foi raspado com uma alça e colocado em um micro tubo de 2 mL, contendo 60-80 mg de esferas de vidro estéreis (425-600 μM , Sigma) e 800 μL de tampão de lise (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M, 10% SDS e NaCl 5M), seguido de homogeneização em vórtex por 2 min, incubação em banho-maria a 65 ± 1 °C por 20 min e centrifugação a 16.000 g por 10 min a 4 ± 1 °C. A transferência do sobrenadante (aproximadamente 800 μL) para um novo microtubo de 2,0 mL foi realizada, adicionando-se 1 volume de fenol e homogeneizado brevemente em vórtex.

Posteriormente, foi repetido o mesmo procedimento mais duas vezes para dois reagentes, fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, transferência de sobrenadante para um novo tubo, adição do reagente seguinte, centrifugação e subsequente transferência de sobrenadante para um novo tubo. Foi adicionado isopropanol (precipita o DNA) no último microtubo, que foi homogeneizado e incubado em freezer por 20 min. Em seguida, foi feita a centrifugação e descarte do sobrenadante, adição de etanol 70%, inversão do tubo algumas vezes, centrifugação e descarte do sobrenadante. O *pellet* depositado ao fundo do microtubo foi seco à temperatura ambiente, suspenso em água ultrapura esterelizada e estocado em freezer.

Quando necessária, a remoção de RNAs das amostras foi realizada. Alíquotas de 10 μL de cada amostra e 0,7 μL de RNase foram adicionadas em eppendorfs de 1,5 mL e incubadas em banho térmico seco a 37°C por 2h.

4.3.7. Verificação da qualidade de DNA (eletroforese)

Para verificação da qualidade das extrações, foi realizada a técnica de eletroforese de DNA em gel de agarose. Para o preparo do gel de agarose 1%, foi pesado 0,7g de agarose e dissolvido em tampão TEB 1X (Tris base [tris(hidroximetil)aminometano], EDTA [ácido etilenodiaminotetraacético] e ácido bórico) num frasco Schott. A solução foi dissolvida através de aquecimento em forno de microondas, até completa homogeneização, com agitação quando necessário e evitando deixar abrir fervura. Após o resfriamento da solução a aproximadamente 40°C, foi adicionado 1,5 µL do corante de fluorimetria, SYBR® Safe DNA (Invitrogen). Após homogeneização, o gel foi vertido na bandeja evitando bolhas e solidificado protegido da luz.

Após solidificação, o gel foi colocado na cuba de eletroforese. O tampão TEB 1X foi colocado na cuba de eletroforese o suficiente para cobrir o gel e o pente foi retirado do gel cuidadosamente. Foi utilizado um marcador de concentração, o DNA do fago lambda (λ) em concentração conhecida (50 ng). A solução de corrida foi preparada contendo para cada amostra, 2 µL de DNA e 2 µL de tampão de corrida com corante (sendo para o controle negativo 2 µL do mix, sem conter DNA) e 1 µL do marcador de concentração com 2 µL de tampão de corrida com corante. As amostras e padrões foram aplicados nas canaletas do gel, a cuba foi tampada, os eletrodos foram conectados de maneira que o DNA migrasse do eletrodo negativo da cuba (cor preta do *plug*) para o eletrodo positivo (cor vermelha do *plug*). A fonte foi ligada com os seguintes parâmetros: Voltagem: 90 V, Amperagem: 500 mA, potência 120 W, tempo de corrida de aproximadamente 25 minutos. A cuba foi mantida protegida da luz. O resultado do gel foi visualizado através do fotodocumentador, que possui transiluminador UV e computador acoplado, sendo possível visualizar e salvar as imagens.

4.3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas diferentes diluições das amostras de DNA, entre 10-70x, determinadas a partir da observação qualitativa dos padrões de bandas da eletroforese. A diluição utilizada nas etapas posteriores foi a que apresentou resultado satisfatório na PCR.

Foi preparado um *mix* contendo todos os reagentes, exceto o DNA, com as concentrações finais de reagentes no sistema de acordo com a Tabela 1. Portanto, foram distribuídos 20 µL do *mix* em cada tubo de PCR e posteriormente 3 ou 5 µL do DNA de cada amostra (variando de acordo com a intensidade do padrão do gel visualizado).

Tabela 1. Concentrações e volumes de reagentes para PCR

Reagentes	Concentração da Solução Estoque	Concentração final por reação	Volume por reação (23 ou 25 µL)
H ₂ O ultrapura esterelizada	-	-	15,35 µL
Solução tampão da <i>Taq</i>	10 X	1 X	2,5 µL
Solução de MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75 µL
<i>Primer forward</i> (ITS1)	20 µM	0,4 µM	0,5 µL
<i>Primer reverse</i> (ITS4)	20 µM	0,4 µM	0,5 µL
dNTP's	25 mM	200 µM	0,2 µL
<i>Taq</i> DNA-polimerase	5 U/µL	1 U	0,2 µL
DNA genômico	--	5-25 ng	3 ou 5 µL
Volume total	--	--	25 µL

Fonte: Belgini *et al.* (2014) e elaborado pela autora.

Posteriormente as amostras incubadas sob as seguintes condições: 94°C - 2 minutos (abertura da fita de DNA) / 94°C - 1 minuto, 55°C - 1 minuto (temperatura de anelamento), 72°C - 3 minutos (temperatura defechamento) e 72°C - 3 minutos, durante 30 ciclos. As amostras ficam a 4°C até a retirada do equipamento (*overnight*).

Após o término do ciclo foi feita a eletroforese para as amostras, seguindo o protocolo do item anterior, diferindo apenas no marcador que foi utilizado, sendo desta vez o de tamanho molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

A purificação de produtos da PCR foi realizada utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Health Care), seguindo o protocolo do fabricante. Consiste na adição de 500 µL de *Capture Buffer* à coluna GFX, transferência da solução de DNA para a coluna GFX, centrifugação em microcentrífuga a 16.000 g por 30 s, descarte da solução contida no tubo coletor (*Collection Tube*) recolocação da coluna GFX no tubo coletor. Em seguida, adição de 500 µL de *Wash Buffer* à coluna, centrifugação a 16.000 g por 30 s, descarte do tubo coletor e transferência da coluna GFX para um tubo Eppendorf de 1,5 mL, aplicação de 15 a 30 µL do *Elution Buffer type 6* na coluna, incubação em 25°C(± 3) por 1 min e centrifugação a 16.000 g por 1 min para recuperação do DNA purificado.

Para confirmação da purificação e eluição suficiente de DNA para a etapa seguinte,

foi feita eletroforese, com marcador de concentração molecular.

4.3.9. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi feita em placa com 96 poços no sequenciador (ABI3500 XL). Antes de ser utilizada, a placa e a tampa de borracha foram expostas à radiação UV para destruição de possíveis moléculas de DNA. A mistura da reação foi preparada com as concentrações finais de reagentes no sistema descritos na Tabela 2. O volume final da reação foi de 18 μL .

Tabela 2. Concentrações e volumes de reagentes para reação de sequenciamento.

Reagentes	Volume por reação
Tampão <i>save money</i>	2 μL
Primers <i>forward</i> (ITS1) e <i>reverse</i> (ITS4) (5 μM)	0,5 μL
Big DYE™ (Life Technologies)	0,5 μL
DNA (10-20 ng/ μL)	1 μL
Água ultrapura esterelizada	5 μL
Volume total	9 μL

Fonte: BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol.

O MIX e o DNA das amostras foram distribuídos em cada poço da placa e a disposição de cada amostra na microplaca foi anotada em mapa. A placa foi fechada com uma tampa de borracha para PCR e as laterais foram seladas com fita crepe. A microplaca foi colocada no termociclador utilizando o seguinte programa: 96°C - 1 minuto (1 ciclo) (abertura de fita do DNA) / 96°C - 15 segundos, 50°C - 15 segundos (anelamento de primers) e 60°C - 4 minutos (fechamento de DNA), por 30 ciclos (tempo suficiente para uma grande quantidade de cópias dos fragmentos a serem amplificados) e 4°C até a retirada das amostras do equipamento (*overnight*).

Após o término dos ciclos, a reação foi armazenada em freezer e protegida da luz para posterior precipitação. A precipitação da reação foi realizada com a adição de 1 μL de EDTA (125 mM), 1 μL de Acetato de Sódio (NaOAc 3 M) e 25 μL de etanol 100% gelado em cada poço. A placa foi fechada com tampa e agitada levemente utilizando o vórtex. Em seguida, foi

incubada por 15 min à temperatura ambiente e protegida da luz. Foi centrifugada a 2250 g por 30 min e posteriormente o conteúdo foi dispensado por centrifugação. Posteriormente foram adicionados 35 µL de etanol 70% em cada poço. A placa foi centrifugada a 2250 g por 15 min, teve o conteúdo desprezado e foi centrifugada novamente, sendo incubada sem a tampa no termociclador aberto a 95°C por 3 min.

A suspensão das amostras em 10 µL de formamida Hi-Di foi realizada, a placa foi coberta com a tampa e incubada no termociclador a 95°C por 5 min. Após essa etapa, a placa foi incubada a 4°C e finalmente foi colocada no sequenciador, instrução descrita no equipamento (ABI3500 XL).

4.3.10. Análise filogenética

Para a montagem da sequência consenso ou *contig* a partir de sequências geradas pelo sequenciador, as sequências *forward* (F) e *reverse* (R) em formato *.abi* foram copiadas e salvas, editadas no *Bioedit*, de forma que as duas sequências, F e R foram abertas na mesma tela, a R foi selecionada e para a inversão e complementação da sequência foi utilizada a ferramenta *Sequence > Nucleic Acid > Reverse Complement*. As duas sequências foram então selecionadas e alinhadas com a ferramenta *Accessory Application > ClustalW Multiple alignment*. Na nova janela aberta, a sequência F foi copiada e colada, renomeada para “consenso”. No campo “Mode” a ferramenta “Edit” foi ativada para a edição da sequência a partir da inspeção visual dos nucleotídeos e picos dos cromatogramas, sendo corrigidas quaisquer inconsistências, como extremidades que não apresentaram boa qualidade e/ou escolha de bases que se mostraram mais resolutivas de acordo com o cromatograma da melhor sequência (*forward* ou *reverse*).

Após o término da inspeção, a sequência consenso foi salva como um novo arquivo *fasta*, que foi utilizado para alinhamento da sequência com outras sequências disponíveis nas bases de dados, através da ferramenta *BLAST* do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e a ferramenta *Pairwise sequence alignment* do CBS (https://www.mycobank.org/page/Pairwise_alignment).

Para construção de dendogramas, foram selecionadas sequências homólogas, bem como sequências encontradas em trabalhos científicos, encontradas através de busca no Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>) do nome da espécie seguido de palavras chaves como “molecular phylogeny” e “phylogenetic tree”.

A seleção de grupo externo é importante. O táxon deve ser filogeneticamente próximo

do grupo de estudo, mas diferente o suficiente, corroborando com a hipótese de monofilia do grupo de interesse. Foi determinada a partir de árvores de trabalhos científicos usados para a seleção das linhagens.

As sequências selecionadas foram enviadas para o *clipboard* do NCBI. O arquivo no formato fasta foi baixado, aberto no Bioedit, somado ao arquivo da sequência consenso, alinhado com a ferramenta *ClustalW Multiple alignment* e inspecionado visualmente para correção de possíveis inconsistências. Finalizado, o arquivo foi utilizado para a reconstrução filogenética no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA X), através da ferramenta *Phylogeny > Construct/Test Neighbor-Joining Tree* e modelo Tamura (TAMURA; NEI, 1993). Os parâmetros utilizados foram os seguintes: Bootstrap method / 1000 replicações / Modelo Kimura 2.

Figura 9. Preferências utilizadas na construção de filogenia *Neighbor-Joining Tree*.

MX: Analysis Preferences

Phylogeny Reconstruction	
Option	Setting
ANALYSIS	
Scope →	All Selected Taxa
Statistical Method →	Neighbor-joining
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny →	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications →	1000
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type →	Nucleotide
Model/Method →	Kimura 2-parameter model
Substitutions to Include →	d: Transitions + Transversions
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites →	Uniform Rates
Gamma Parameter →	Not Applicable
Pattern among Lineages →	Same (Homogeneous)
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment →	Complete deletion
Site Coverage Cutoff (%) →	Not Applicable
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads →	3

Fonte: MEGA X.

5 RESULTADOS

5.1. Método independente de cultivo

5.1.1. Análise metataxonômica de fungos e comparação entre espécies vegetais

Dentre as 12 amostras coletadas, um total de 883.735 sequências (reads) foram obtidas e 3104 Unidades Operacionais Taxonômicas/Operational Taxonomic Units (OTUs). Tais OTUs foram classificadas em 354 gêneros, 196 famílias e 8 filos fúngicos.

A maior riqueza e diversidade de OTUs foi proveniente da rizosfera do talhão de eucalipto número 29 (ET29R), seguida da amostra de rizosfera da área 1 de bambu (BA1R). A menor riqueza de OTUs foi apontada nas amostras de córtex vegetal de bambu (BA1C) e de eucalipto (ET4aC) e a menor diversidade foi detectada na amostra de rizosfera da área 2 de bambu (BA2R) e córtex da área 2 de bambu (BA1C) (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de riqueza e diversidade de espécies fúngicas encontradas nas amostras.

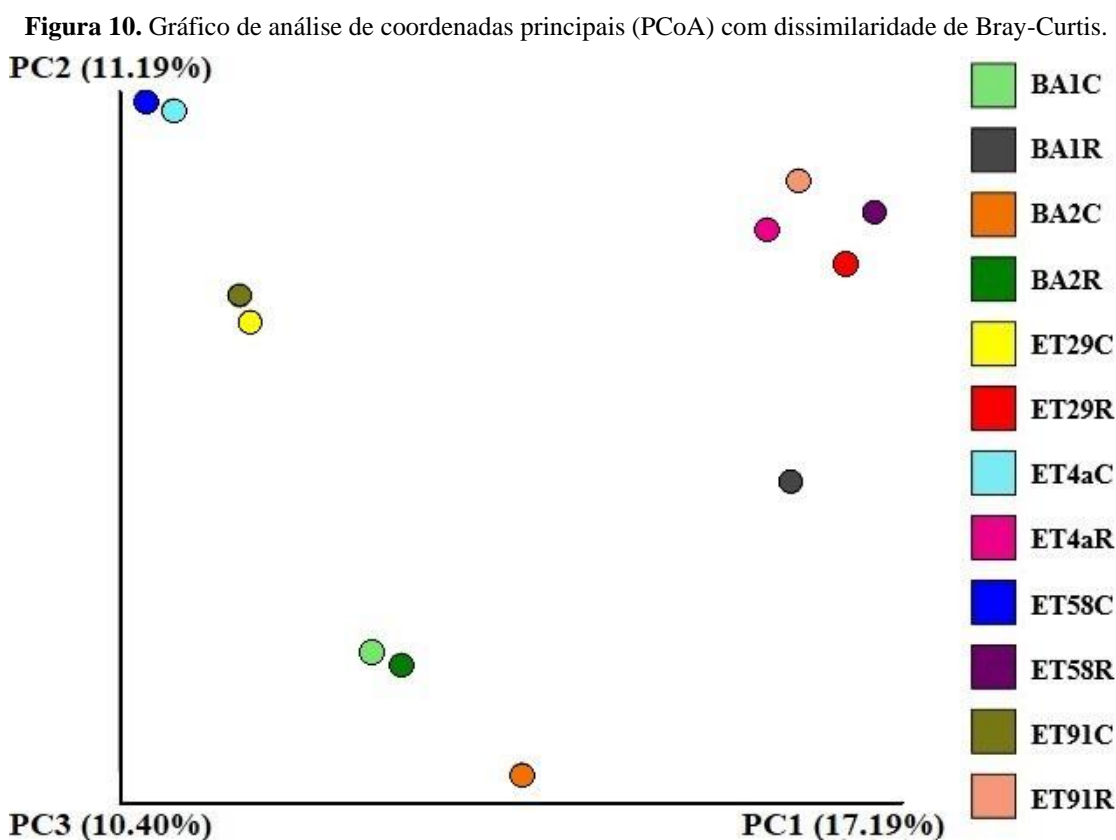
Código	Amostra	Riqueza de espécies (Observed OTUs)	Diversidade de espécies (Shannon)
ET29R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	461	6,9732
BA1R	Solo rizosférico de <i>Bambusa vulgaris</i>	441	6,905
ET58R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	348	6,5107
ET4aR	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	365	5,7676
ET29C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	228	5,6749
ET91C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	175	4,9485
ET58C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	54	4,7724
BA2C	Córtex vegetal de <i>Bambusa vulgaris</i>	105	3,9178
ET4aC	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	35	3,4019
ET91R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	111	3,0483
BA1C	Córtex vegetal de <i>Bambusa vulgaris</i>	31	1,878
BA2R	Solo rizosférico de <i>Bambusa vulgaris</i>	38	0,5881

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir do gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA) com dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 10) foi possível observar os agrupamentos das amostras formados a partir da similaridade da comunidade microbiana. As amostras de solo rizosférico de eucalipto

(ET91R, ET4aR, ET58R e ET29R) formaram um agrupamento de diversidade, indicando que são mais similares entre si do que entre outras amostras. As amostras de córtex vegetal de eucalipto formaram dois agrupamentos de diversidade bem próximos, ET58C e ET4aC, ET29C e ET91C, demonstrando que apesar das amostras pertencerem à mesma espécie vegetal, algumas possuem maior ou menor similaridade com outras quanto à diversidade de microrganismos.

Apesar de serem tipos diferentes de amostras, BA1C e BA2R, respectivamente provenientes de córtex de bambu da área 1 e solo rizosférico de bambu da área 2, formaram um agrupamento de diversidade. O fato de terem sido as amostras com menores diversidades, justifica tal agrupamento. As amostras BA1R e BA2C, solo rizosférico da área 1 e córtex vegetal da área 2 de bambu respectivamente, não formaram agrupamentos indicando que suas comunidades microbianas são distintas das demais, principalmente da amostra BA1R que se encontra mais afastada das demais. Enquanto que a amostra BA2C se encontra mais próxima das amostras BA1C e BA2R.

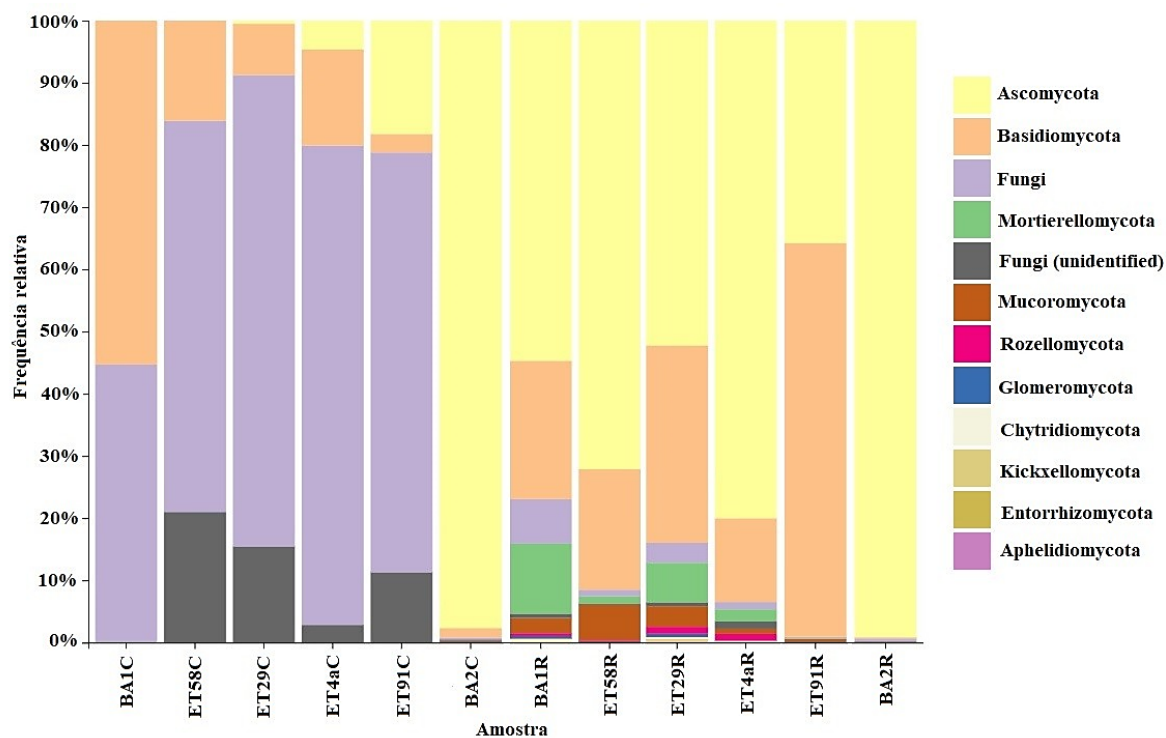


Fonte: Dados visualizados através do Qiime2 View e editado pela autora.

A diversidade taxonômica fúngica presente e estabelecida entre as amostras coletadas indicou que o filo mais encontrado (considerando a abundância >1%) foi Ascomycota,

representando uma média de 42,95% do total de OTUs (abundâncias entre 99,184% - amostra BA2R, e 0,525% - amostra ET29C). Deste total, 11,6% pertencem à ordem Chaetothyriales. Na sequência apareceram os filos Mortierellomycota, Basidiomycota e Mucoromycota, representando 20,939%, 20,809% e 13,108%, respectivamente, do total de OTUs (Figura 11).

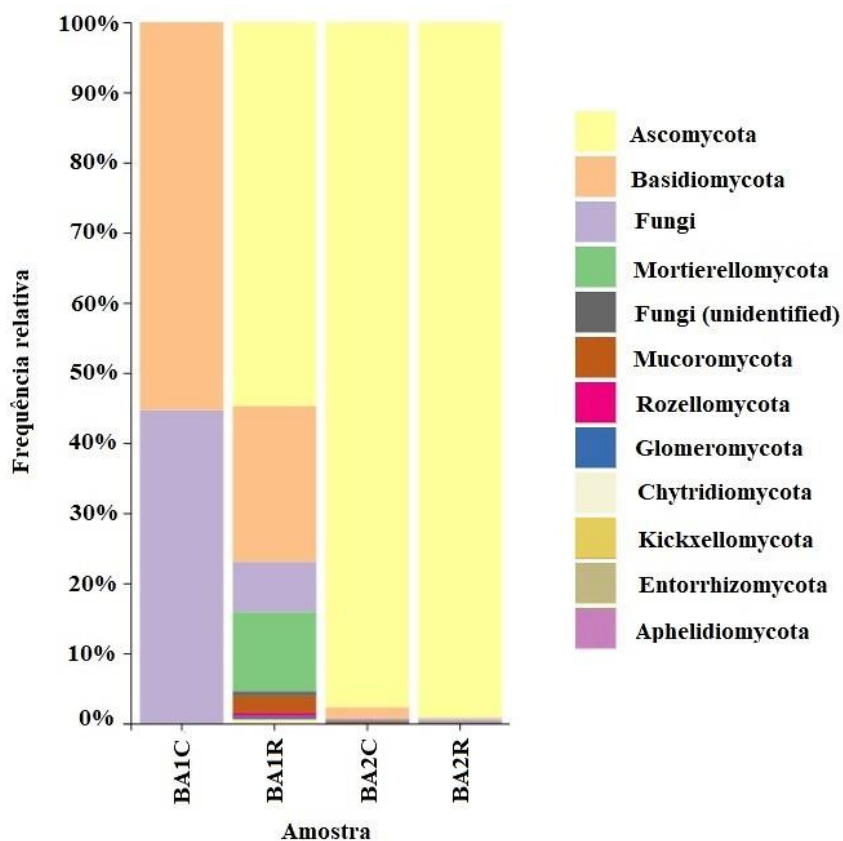
Figura 11. Frequência relativa de filos do reino fungi por amostra.



Fonte: Dados visualizados através do Qiime2 View e editado pela autora.

Destaca-se a diferença de padrões de filos fúngicos observada nas amostras de córtex vegetal e solo rizosférico de bambu. O solo rizosférico da área 1 de bambu (BA1R) apresentou alta riqueza e diversidade de fungos (diferentes agrupamentos taxonômicos), enquanto o solo rizosférico de eucalipto que apresentou maiores índices (ET29R) e o córtex vegetal de bambu da mesma área apresentou baixa riqueza e diversidade de fungos. Para Chaetothyriales o solo rizosférico e córtex vegetal da mencionada área demonstrou baixa porcentagem da ordem (0,50% e >0,15% respectivamente) (Figura 12).

Figura 12. Frequência relativa de filos fúngicos nas amostras de bambu.

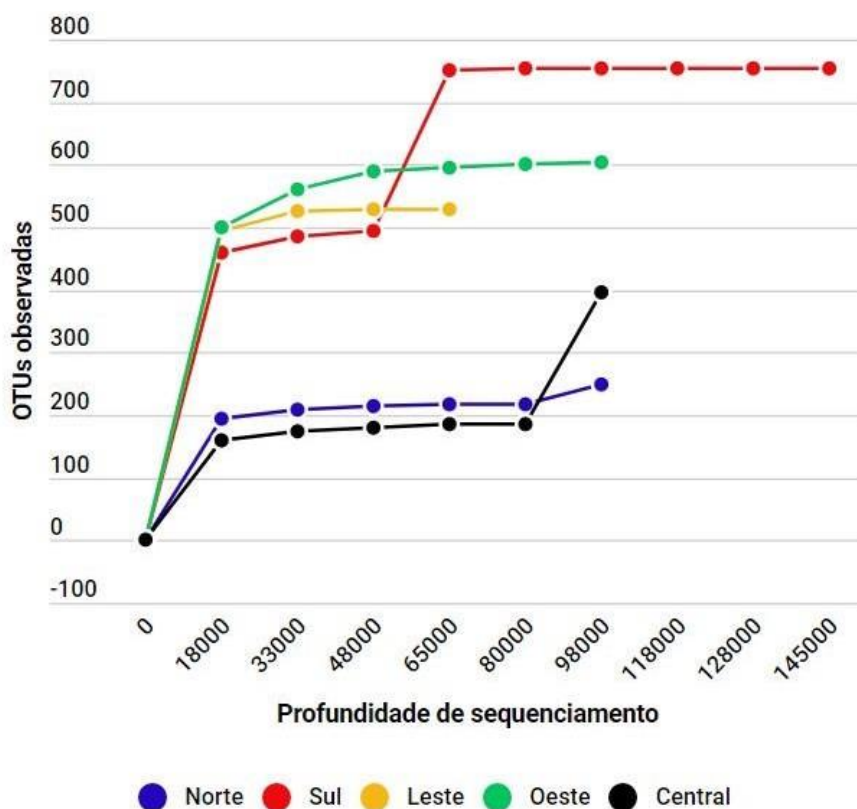


Fonte: Qiime2 View e editado pela autora.

5.1.2. Comparação metataxonômica entre setores

O setor da Floresta que apresentou maior abundância foi o sul. O setor central e norte apresentaram menores abundâncias (Figura 13).

Figura 13. OTUs observadas em função de seqüências analisadas nos diferentes setores da FEENA.



Fonte: Gerado no Infogram através de dados gerados pelo Qiime2. Elaborado pela autora.

De acordo com a Figura 14 e os dados representados nos diagramas de Venn (Figura 15) pode-se constatar que as amostras coletadas de solo rizosférico e de córtex vegetal apresentaram diferença de diversidade fúngica. As seis amostras coletadas de solo apresentaram um total de 2397 OTUs, enquanto as seis amostras de córtex apresentaram 673 OTUs. O número de OTUs classificadas nas amostras de solo foi maior, demonstrando que no solo existe diversidade e riqueza maiores que no córtex vegetal.

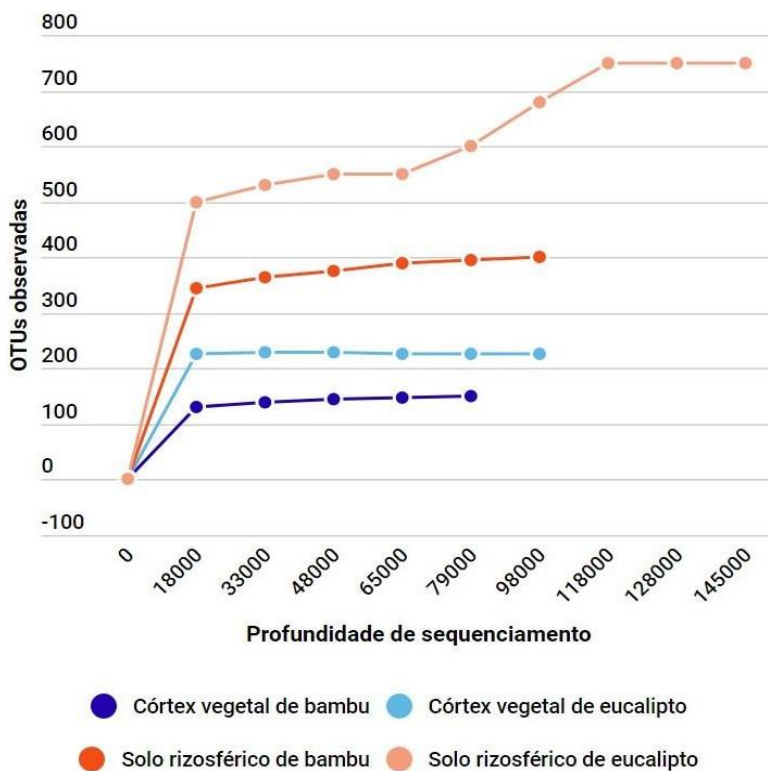
Figura 14. Diagrama de Venn da diversidade fúngica compartilhada entre as amostras, demonstrando o compartilhamento de 34 unidades taxonômicas entre as amostras de solo e córtex vegetal.



Fonte: Dados gerados através do Qiime2, visualizados no MetaCoMET e editado pela autora.

As curvas de rarefação para as amostras de solo rizosférico e córtex vegetal se estabilizaram (Figura 15) numa profundidade de sequenciamento 1500000. O número de OTUs não aumenta em função de mais sequências amostradas. Isso indica que todas as amostras atingiram o *plateau*, ou seja, o esforço amostral foi suficiente para acessar toda a diversidade microbiana das amostras.

Figura 15. Curvas de rarefação de amostras de solo e córtex vegetal de bambu e eucalipto.



Fonte: Gerado no Infogram através de dados gerados pelo Qiime2. Elaborado pela autora.

5.1.3. Comparação metataxonômica de fungos dematiáceos entre espécies vegetais

A análise metataxonômica apontou que a amostra com maior porcentagem de fungos da ordem Chaetothyriales foi a de solo rizosférico de eucalipto, proveniente do talhão número 29, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de Chaetothyriales presentes por amostra.

Código	Amostra	Chaetothyriales
ET29R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	5,18%
BA2C	Córtex vegetal de <i>Bambusa vulgaris</i>	2,99%
ET58R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	1,99%
ET4aR	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	0,77%
BA1R	Solo rizosférico de <i>Bambusa vulgaris</i>	0,50%
ET91R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	0,15%
ET29C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	>0,15%
ET58C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	>0,15%
ET4aC	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	>0,15%
ET91C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	>0,15%
BA1C	Córtex vegetal de <i>Bambusa vulgaris</i>	>0,15%
BA2R	Solo rizosférico de <i>Bambusa vulgaris</i>	>0,15%

Fonte: Elaborado pela autora.

Mediante a análise metataxonômica, os táxons da ordem Chaetothyriales foram distribuídos em 12 gêneros, 15 espécies e 3 famílias. Também foi encontrada uma espécie que possui uma posição incerta ao nível de família: *Uncispora sinensis*. A relação dos isolados dematiáceos da ordem Chaetothyriales encontrados nesse estudo, por amostra coletada e respectiva importância/aplicação, encontra-se no Quadro 2.

Quadro 2. Classificação de fungos dematiáceos da ordem Chaetothyriales por amostra coletada e respectiva importância/aplicação.

Táxon	Família	Amostra	Importância e/ou aplicação
<i>Arthrocladium tardum</i>	<i>Trichomeriaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 58) e de bambu (área 1)	Comensal casual da associação formiga-planta-fungo (NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2016).

<i>Cladophialophora</i> sp.	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhões 58, 4a, 91 e 29) e de bambu (área 1)	Contém um número de espécies clínicas significativas, que causam cromoblastomicose e outras infecções de pele, como feohifomicose subcutânea e infecções disseminadas e cerebrais (FERNANDES <i>et al.</i> , 2007). Gênero também encontrado em associação com madeira, plantas vivas como cactos, e como sapróbias. Representantes isolados em refrigerantes, solo poluído com alquilbenzeno (BADALI <i>et al.</i> , 2008), Degradação de benzenos alquilados - tolueno, etilbenzeno e xilenos (PRENAFETA-BOLDÚ <i>et al.</i> , 2002).
<i>Cyphellophora europaea</i>	<i>Cyphellophoraceae</i>	Córtex vegetal de eucalipto (talhão 91)	Isolada de pele e unhas humanas, causando sintomas clínicos (GAO <i>et al.</i> , 2015) e habilidade em degradar hidrocarbonetos (PRENAFETA-BOLDÚ <i>et al.</i> , 2006).
<i>Cyphellophora fusarioides</i>	<i>Cyphellophoraceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)	Encontrada em fluído de lavagem brônquica de paciente com infiltração pulmonar (SUTTON <i>et al.</i> , 1991) e lesão de orelha de cachorro (DECOCK <i>et al.</i> , 2003).
<i>Cyphellophora livistonae</i>	<i>Cyphellophoraceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 29)	Em <i>Livistona</i> (Arecaceae) (CROUS <i>et al.</i> , 2012).

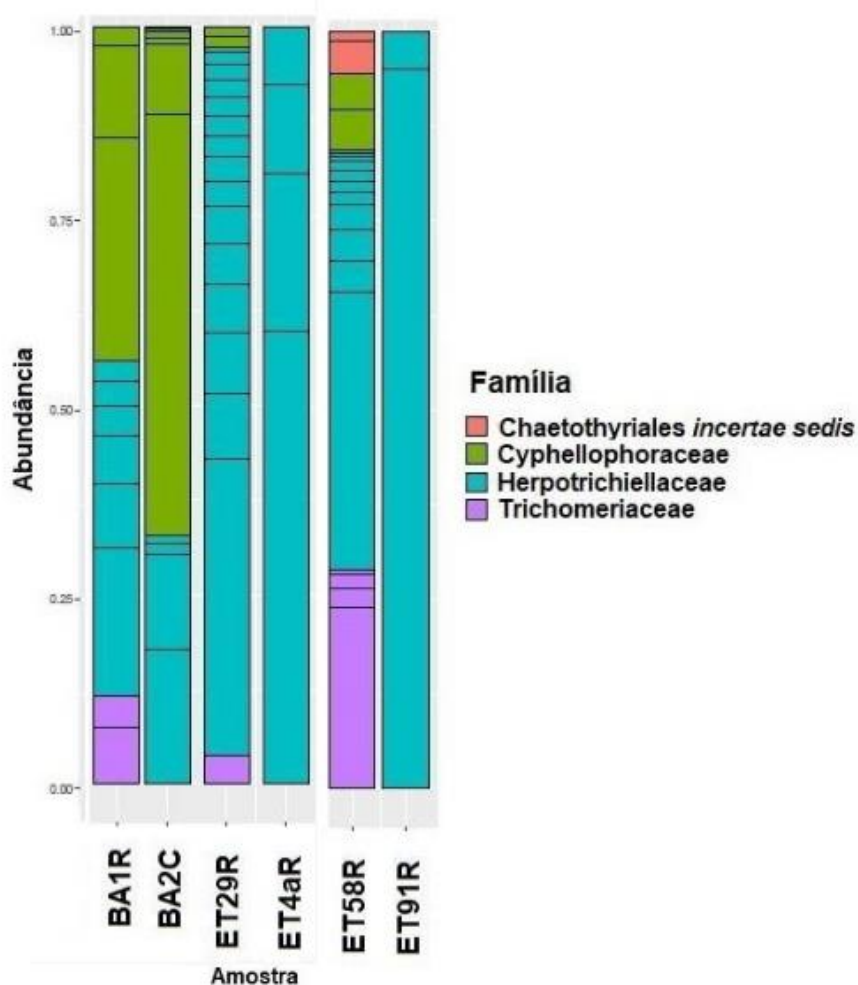
<i>Cyphellophora olivacea</i>	<i>Cyphellophoraceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 29) e de bambu (área 1) e córtex vegetal de bambu (área 2)	Associação com rochas (SUN <i>et al.</i> , 2019).
<i>Cyphellophora sessilis</i>	<i>Cyphellophoraceae</i>	Rizosfera (área 1) e córtex vegetal de bambu (área 2)	Doenças em culturas de frutas (GAO <i>et al.</i> , 2015; BATZER <i>et al.</i> , 2016; ISMAIL <i>et al.</i> , 2016) e associação com rochas (SUN <i>et al.</i> , 2019).
<i>Cyphellophora suttonii</i>	<i>Cyphellophoraceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)	Clínica – isolamento de pele, unhas e fluidos pulmonares (DECOCK <i>et al.</i> , 2003) e agente de feohifomicose animal (AJELLO <i>et al.</i> , 1980).
<i>Exophiala bergeri</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Córtex vegetal de eucalipto (talhão 29)	Isolada na presença de compostos xenobióticos (tolueno e benzeno) e em madeira creosotada, envolvida em infecções oportunistas (ZHAO <i>et al.</i> , 2010; OGAWA <i>et al.</i> , 2016).
<i>Exophiala cancerae</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 29)	Água (TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2017), Agente causador da doença do caranguejo letárgico (DE HOOG <i>et al.</i> , 2011) e infecções de pele e unha em humanos (HURST, 2019), rizosfera e raiz de milho e em cana-de-açúcar (DE FÁTIMA COSTA <i>et al.</i> , 2020).
<i>Exophiala nigra</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 4a)	Melanina aplicada à pecuária CHYIZHANSKA; BEREGOVA, 2009) e presente em água (TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2017).
<i>Exophiala sp.</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhões 29 e 4a) e de bambu (área 1) e córtex vegetal de bambu (área 2)	Infecções superficiais e invasivas (GAO <i>et al.</i> , 2016).

<i>Exophiala xenobiotica</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)	Atividade catalítica (TELZEROW <i>et al.</i> , 2018), assimilação de hidrocarbonetos aromáticos tóxicos (DE HOOG <i>et al.</i> , 2006; TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2017) e patógeno de peixe (MUNCHAN <i>et al.</i> , 2009).
<i>Knufia</i> sp.	<i>Trichomeriaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)	Espécies extremotolerantes de fontes ambientais, especialmente superfícies rochosas (TESEI <i>et al.</i> , 2017).
<i>Minimelanolocus</i> sp.	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)	Maioria sapróbia (ZHANG; FU, ZANG, 2015), ambientes aquáticos (LIU <i>et al.</i> , 2015) e plantas (HEREDIA <i>et al.</i> , 2014).
<i>Phialophora geniculata</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 4a) e de bambu (área 1)	Alcalifílico (KEVBRIN, 2019).

<i>Rhinocladiella</i> sp.	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 29)	Espécies de interesse médico (HEIDRICH <i>et al.</i> , 2017), produção do metabólito citocalasina, com atividade antibiótica e antitumoral (WAGENAAR <i>et al.</i> , 2000), madeira e animais endotérmicos (TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2017).
<i>Strelitziana</i> sp.	<i>Incertae sedis</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão58)	Fitopatógeno (ZHANG <i>et al.</i> , 2009).
<i>Trichomerium dioscoreae</i>	<i>Trichomeriaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 29)e de bambu (área 1)	Fitopatógeno (CROUS <i>et al.</i> , 2014).
<i>Uncispora sinensis</i>	<i>Incertae sedis</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão58)	Encontrada em folhas de uma planta dicotiledônea na China, taxonomia incerta de família, pois não se enquadra em nenhuma família conhecida da ordem (YANG <i>et al.</i> , 2011).
<i>Veronaea compacta</i>	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera (área1) e córtex vegetal de bambu (área 2)	Biodegradação de matéria orgânica, sapróbio ((PAPENDORF, 1976).
<i>Veronaea</i> spp.	<i>Herpotrichiellaceae</i>	Rizosfera de eucalipto (talhão58)	Fitoparasita (KHARWAR <i>et al.</i> , 2004).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16. Abundância de Chaetothyriales por família em cada amostra.

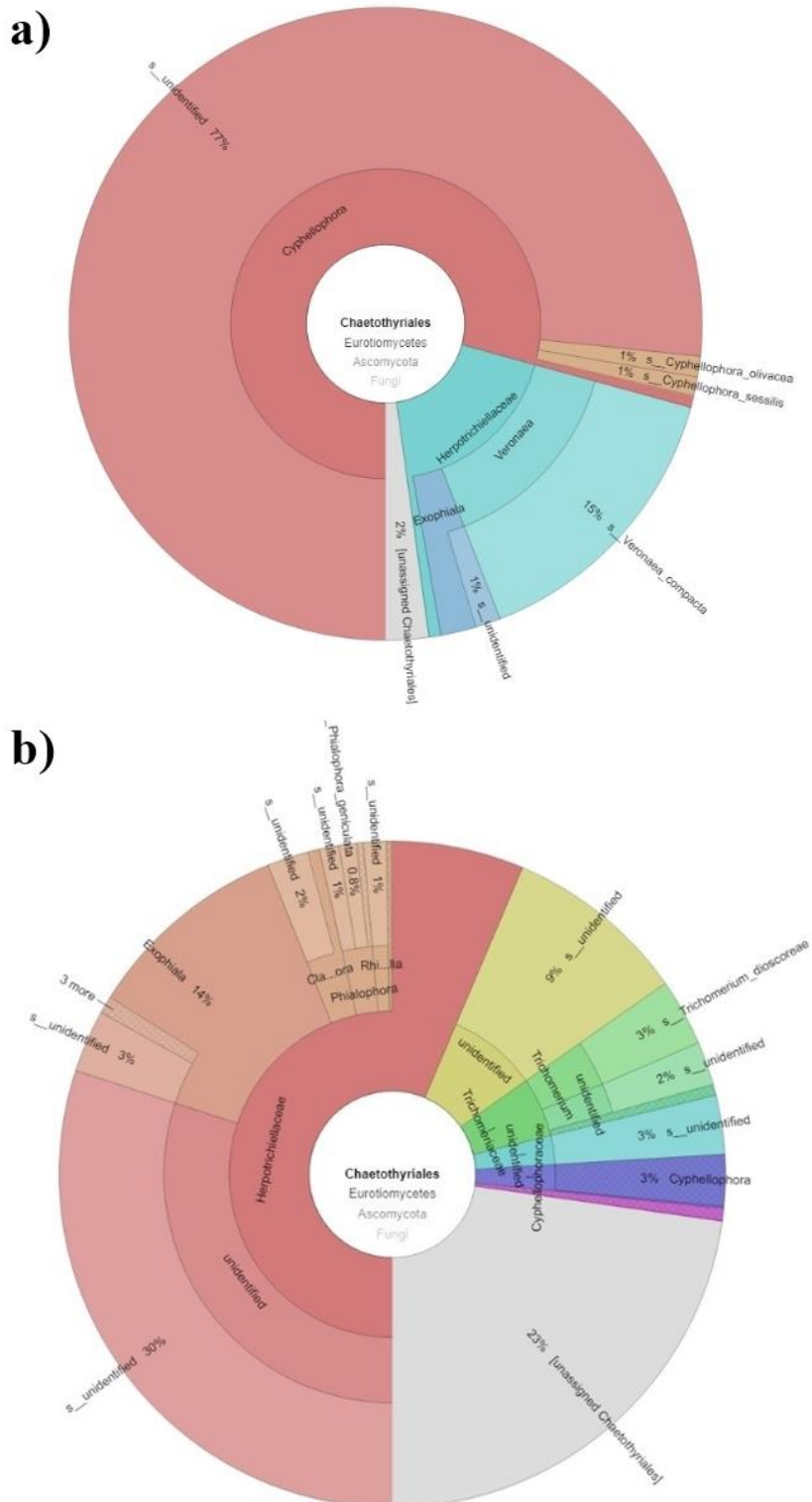


Fonte: Gerado pelo software R. Editado pela autora.

A análise descrita no item 4.2.4. (análise metataxonômica da diversidade fúngica) revelou mais 4 representantes dos herpotriqueláceos: *Cyphellophora suttonii*, *Exophiala cancerae*, *Exophiala xenobiotica* e *Veronaea compacta*.

As amostras de solo foram as que apresentaram uma maior diversidade de fungos no geral, e da ordem Chaetothyriales, quando comparadas com as amostras de córtex vegetal.

Figura 17. Ocorrência de fungos da ordem Chaetothyriales em amostras coletadas, esboçando os diferentes padrões de diversidade encontrados em córtex vegetal e solo rizosférico. a) Representação gráfica da ordem Chaetothyriales em seis amostras de córtex vegetal: BA1C, BA2C, ET58C, ET91C, ET4aC e ET29C. b) Representação gráfica da ordem Chaetothyriales em seis amostras de solo: BA1R, BA2R, ET58R, ET91R, ET4aR, ET29R.



Fonte: Dados gerados através do Qiime2 e visualizados no MetaCoMET.

Dentre as 34 OTUs de fungos compartilhadas entre os tipos de amostras coletadas

(Figura 14), para Chaetothyriales foi possível encontrar os táxons *Exophiala* spp., *Veronaea compacta*, *Cyphellophora olivacea* e *Cyphellophora sessilis* tanto em amostras de solo rizosférico, quanto de córtex vegetal, representando 4 táxons dos 20 classificados (Quadro 2), ou seja, uma minoria de representantes Chaetothyriales foi encontrada nos dois tipos de amostras simultaneamente (solo rizosférico e córtex vegetal). Com relação aos fungos dematiáceos de outras ordens, foi possível encontrar os táxons *Cladosporium cladosporioides* e *Curvularia trifolii* presentes em amostras de solo rizosférico e córtex vegetal (Quadro 4). Dentre as OTUs de Chaetothyriales encontradas exclusivamente em amostras de solo ou exclusivamente de córtex vegetal foi possível verificar e comparar quais foram classificadas na ordem, sendo 16 dos 20 táxons (listados no Quadro 2), ou seja, a maioria dos táxons classificados na ordem foram encontrados exclusivamente em um tipo de amostra (solo rizosférico ou córtex vegetal).

Além das classificações feitas através da metataxonomia (Quadro 2), algumas sequências de Chaetothyriales que foram classificadas até o nível de gênero obtiveram uma resolução taxonômica mais avançada por meio de alinhamento com sequências do NCBI/Blast (Quadro 3).

Quadro 3. Classificação de espécies de Chaetothyriales a partir do alinhamento com sequências do Blast.

Táxon	Importância e/ou aplicação
<i>Cladophialophora chaetospira</i>	Agente de biocontrole e promotor de crescimento em plantas de morango (HARSONOWATI; MARIAN; NARISAWA, 2020).
<i>Cladophialophora lanosa</i>	Solo (DAS; LEE; JUNG, 2019).
<i>Cyphellophora phyllostachydis</i>	Bambu (GAO <i>et al.</i> , 2015).
<i>Exophiala equina</i>	Feo-hifomicose subcutânea (NAJAFZADEH <i>et al.</i> , 2013); Água, solo e plantas (DE HOOG <i>et al.</i> , 2011).
<i>Exophiala pisciphila</i>	Antibiótico (DOSHIDA <i>et al.</i> , 1996); Endofítico capaz de atuar na promoção de crescimento vegetal do milho e aumentar a tolerância em solos contaminados com metais pesados (LI <i>et al.</i> , 2011; XU <i>et al.</i> , 2020); Tolerância e resposta antioxidante ao estresse induzido por Cádmio (ZHAN <i>et al.</i> , 2015); Patógeno humano causando cromblastomicose (SUGHAYER <i>et al.</i> , 1991); Patógeno de peixe (MUNCHAN <i>et al.</i> , 2009);

<i>Minimelanolocus curvatus</i>	Madeira em decomposição submersa (LIU <i>et al.</i> , 2015).
---------------------------------	--

Fonte: Elaborado pela autora.

Além dos dematiáceos pertencentes a ordem Chaetothyriales, foi possível encontrar os seguintes, pertencentes à outras ordens: *Cladosporium cladosporioides* (Cladosporiales), *Chaetocapnodium placitae* e *Leptoxyphium glochidion* (Capnodiales), *Aureobasidium pullulans* (Dothideales), *Periconia echinoclaoe*, *Periconia pseudobyssoides*, *Periconia macrospinosa*, *Periconia sp.*, *Alloconiothyrium aptrootii*, *Pyrenochaetopsis leptospora*, *Pyrenochaeta sp.*, *Epicoccum nigrum*, *Neoscochyta paspali*, *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia spicifera*, *Curvularia trifolii*, *Curvularia sp.*, *Alternaria alternata*, *Edenia gomezpompae*, *Phaeosphaeria sp.*, *Phaeosphaeria oryzae*, *Phaeosphaeria lunariae*, *Phaeosphaeria podocarp*, *Phaeosphaeria sinensis*, *Setophoma sp.*, *Setophaeosphaeria sidae*, *Ophiosphaerella aquatica*, *Ophiosphaerella sp.*, *Neosetophoma sp.*, *Lophiostoma sp.*, *Lophiostoma corticola*, *Lophiostoma chamaecyparidis*, *Vaginatipora amygdali*, *Rousoella siamensis*, *Rousoella solani*, *Rousoella neopustulans*, *Rousoella sp.*, *Liua muriformis*, *Pseudopithomyces rosae*, *Paraconiothyrium archidendri*, *Paraconiothyrium variabile*, *Paraconiothyrium sp.*, *Paraphaeosphaeria sp.*, *Pseudopithomyces karoo*, *Pseudopithomyces sp.*, *Dictyosporium strelitziae*, *Dictyosporium elegans*, *Dictyosporium heptasporum*, *Dictyosporium sp.*, *Dictyocheirospora garethjonesii*, *Pseudodictyosporium elegans*, *Gregarithecium curvisporum*, *Acrocalymma fici*, *Aquilomyces patris*, *Biatrispora antibiotica*, *Biatrispora mackinnonii*, *Biatrispora sp.*, *Teichospora sp.*, *Tetraplophaeria sp.*, *Westerdykella reniformis*, *Westerdykella dispersa*, *Westerdykella nigra*, *Westerdykella sp.*, *Preussia globosa*, *Preussia sp.*, *Coniothyrium sp.*, *Stagonospora sp.*, *Massarina sp.*, *Keissleriella caraganae*, *Atrocalyx lignicola*, *Atrocalyx sp.*, *Lepidosphaeria sp.*, *Leptosphaeria sp.*, *Brevicollum hyalosporum*, *Dokmaia sp.*, *Trichobotrys effusa*, *Nigrograna cangshanensis*, *Pseudorobillarda sojae*. (Pleosporales).

Quadro 4. Classificação de principais espécies de fungos dematiáceos das ordens Pleosporales, Capnodiales, Cladosporiales e Dothideales por amostra coletada e importância e/ou aplicações.

Táxon	Família	Amostra	Importância e/ou aplicações
<i>Alternaria alternata</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhões 4a e 29) e rizosfera de bambu (áreas 1 e 2)	Produtor potente de muitos metabólitos secundários e contaminação de alimentos e rações por toxinas (WENDEROTH <i>et al.</i> , 2017).

<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothideales	Rizosfera de eucalipto (talhão 29)	Produção de ampla gama de produtos naturais viáveis para aplicações biotecnológicas e ambientais, enzimas industriais muito úteis, como β -glucosidase, amilases, celulases, lipases, proteases, xilanases e mananases, produção do biopolímero Pullulan (poli- α -1,6-maltotriose), com propriedades significativas e aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, atividade antagônica contra patógenos de plantas, produção de compostos orgânicos voláteis, enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos, biocontrole de micotoxinas (BOZOUZI; TSALTAS, 2018).
<i>Biatriospora mackinnonii</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhão 4a)	Ceratomicose, infecção rara e grave da córnea (AOKI <i>et al.</i> , 2021).
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 29)	Fitopatígeno de trigo e cevada, sendo principal obstáculo à produção de cereais em todo o Sul da Ásia (MCDONALD, <i>et al.</i> , 2018).
<i>Chaetocapnodium placitae</i>	Capnodiales	Rizosfera de eucalipto (talhão 4a) e rizosfera de bambu (área 1)	Agente de biocontrole (ANDARGIE <i>et al.</i> , 2017)

<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Cladosporiales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58, 4a, 29 e 91). Rizosfera de bambu (área1), córtex vegetal de bambu (área 2)	Feohifomicose humana (VIEIRA; MILHEIRO; PACHECO, 2001), feohifomicose em gato doméstico (VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ <i>et al.</i> , 2019) e micose sistêmica em cachorro doméstico (SPANO <i>et al.</i> , 2018); entomopatogênico e fonte de produtos com atividades inseticidas (EL-SAWY; MOSTAFA; ISMAIL, 2019) com potencial para biocontrole de pragas de insetos (ISLAM <i>et al.</i> , 2019); patógeno vegetal (MA; DE SILVA; TAYLOR, 2020); metabólitos secundários que demonstram ser fortes agentes antibacterianos e antifúngicos, exibindo baixa toxicidade (YEHIA <i>et al.</i> , 2010); potencial agente de controle biológico de ferrugem branca (TORRES <i>et al.</i> , 2017); potencial agente de micorremediação de ambientes contaminados por álcool etoxilado e indústria de detergentes (JAKOVLJEVIĆ; VRVIĆ, 2018); produtor de lacase (ASLAM <i>et al.</i> , 2012).
<i>Coniothyrium sp.</i>	Pleosporales	Rizosfera de bambu (área 1)	Vários compostos bioativos, como derivados de ácido furóico (TRAN-CONG, <i>et al.</i> , 2020); Antibiótico (HASTUTY; MAIRANI; ROSADA, 2020).
<i>Curvularia spicifera</i>	Pleosporales	Córtex vegetal de eucalipto (talhão 29 e 91)	Fitopatogênico (QOSTAL <i>et al.</i> , 2019) e patógeno humano (BAY <i>et al.</i> , 2017).

<i>Edenia gomezpompae</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 91)	Produção de metabólitos relativamente raros da família espirobisnftalenos, com potenciais atividades antiinflamatórias (TAN <i>et al.</i> , 2020)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58, 4a e 29) e rizosfera de bambu (área 1)	Parasita de fungos fitopatogênicos, usado como agente no biocontrole (HARWOKO <i>et al.</i> , 2021).
<i>Leptosphaeria</i> sp.	Pleosporales		Compostos antifúngicos (LIN <i>et al.</i> , 2017); Fitopatogêno vegetal (BRUNNER <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rousoella solani</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhões 4a e 91)	Ceratomicose (MOCHIZUKI <i>et al.</i> , 2017)
<i>Westerdykella dispersa</i>	Pleosporales	Rizosfera de bambu (área1)	Infecção angioinvasiva (SUE <i>et al.</i> , 2014).
<i>Westerdykella reniformis</i>	Pleosporales	Rizosfera de eucalipto (talhão 29) e bambu (área 1)	Produção de metabólitos antibióticos (EBEAD <i>et al.</i> , 2012)

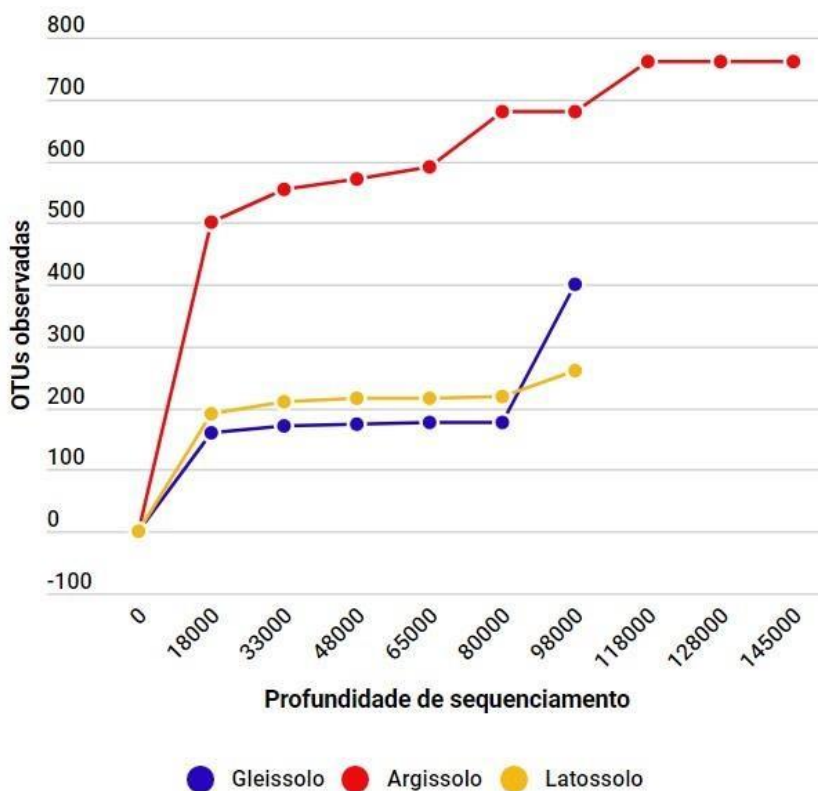
<i>Westerdykella</i> sp.	Pleosporales	Rizosfera de bambu (área 1)	Resistência a mercúrio e biorremediação (PIETRO-SOUZA <i>et al.</i> , 2020).
--------------------------	--------------	-----------------------------	--

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.4. Comparação metataxonômica de fungos entre tipos de solo

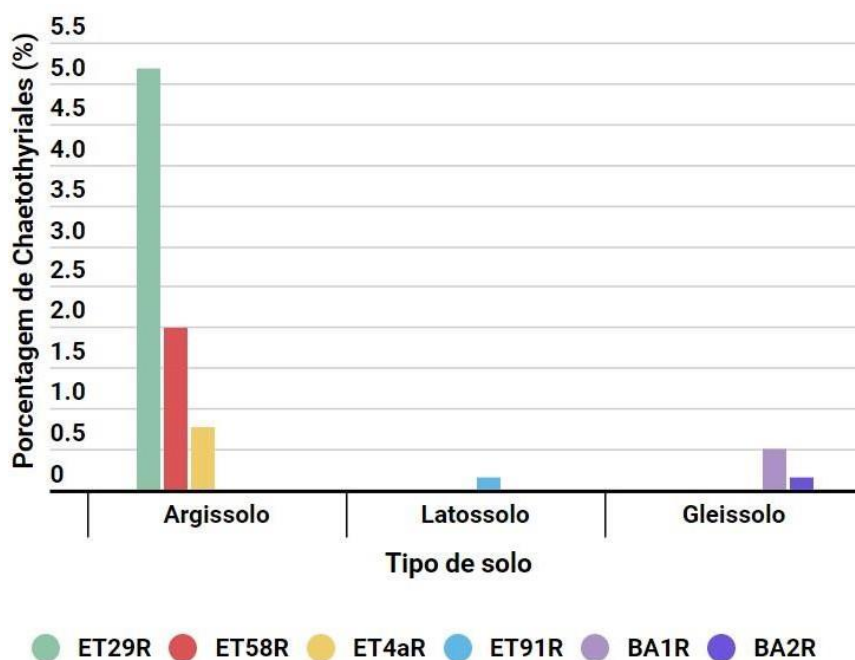
Dos diferentes tipos de solo onde as amostras foram coletadas, a maior ocorrência de fungos de maneira geral foi no Argissolo Vermelho Eutrófico (Figura 18). Também foi o tipo de solo que apresentou o maior número de OTUs classificadas na ordem Chaetothyriales (Figura 19). Além disso, o número de OTUs observadas foi maior em solos com maior fertilidade (Figura 20).

Figura 18. OTUs observadas em função de sequências analisadas nos diferentes tipos de solo amostrados.



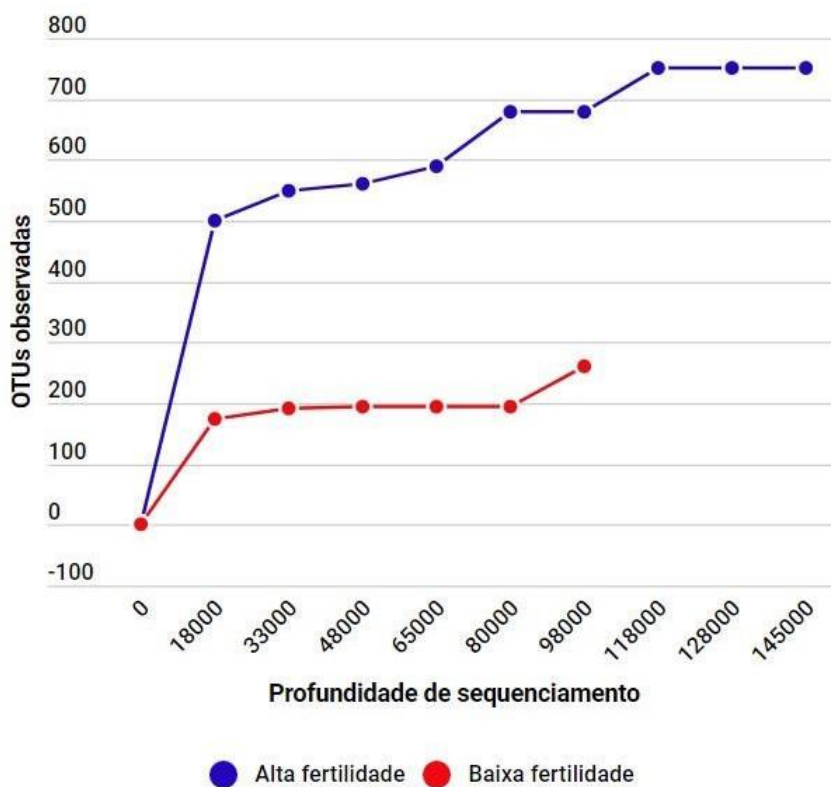
Fonte: Gerado no Infogram com dados gerados pelo Qiime2. Elaborado pela autora.

Figura 19. Porcentagem de Chaetothyriales em função do tipo de solo por amostra.



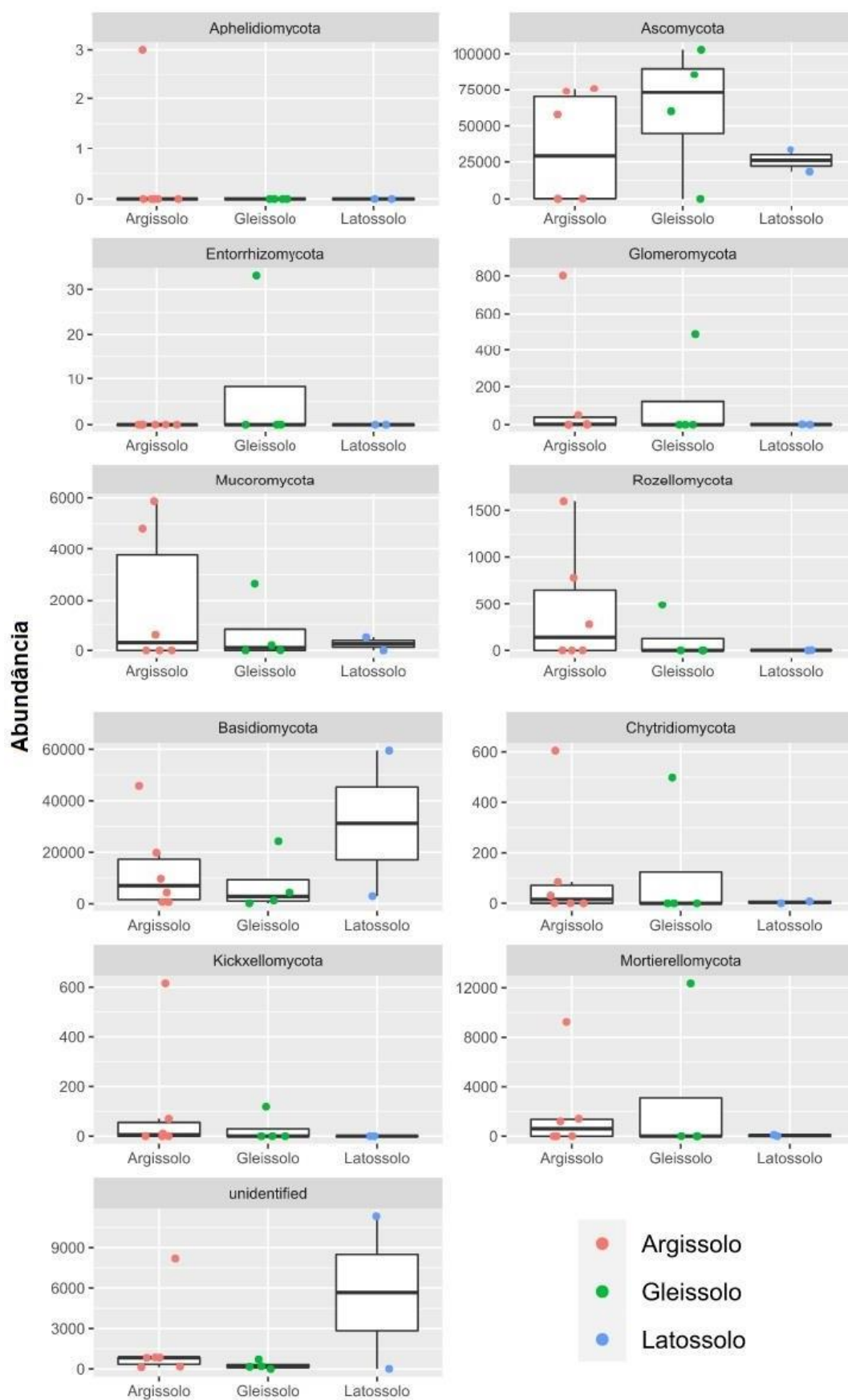
Fonte: Gerado no Infogram através de dados gerados pelo Qiime2. Elaborado pela autora.

Figura 20. OTUs observadas em função de sequências analisadas em diferentes tipos de solo quanto à fertilidade.



Fonte: Gerado no Infogram com dados gerados pelo Qiime2. Elaborado pela autora.

Figura 21. Abundância de OTUs de filos fúngicos em função do tipo de solo.



Fonte: Gerado no software R.

5.1.5. Presença de fungos de importância médica

Considerado um resultado relevante para o conhecimento de espécies fúngicas da FEENA, listamos no Quadro 5 os táxons de importância médica encontrados nas amostras estudadas.

Quadro 5. Classificação dos fungos de importância médica por amostra coletada.

Infecção fúngica	Agente etiológico	Ordem	Amostra
Zigomicose sistêmica	<i>Absidia anomala</i>	Mucorales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58, 4a e 29) e de bambu (área 1)
Micetoma Eumicótico	<i>Acremonium furcatum</i>	Hypocreales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 4a)
Micetoma Eumicótico	<i>Acremonium persicinum</i>	Hypocreales	Rizosfera de eucalipto (talhão 29)
Hialohifomicose	<i>Aspergillus neoniger</i>	Eurotiales	Córtex vegetal de eucalipto (talhão 91)
Hialohifomicose	<i>Aspergillus penicillioides</i>	Eurotiales	Rizosfera de eucalipto (talhão 29) e bambu (área 2)
Hialohifomicose	<i>Aspergillus puniceus</i>	Eurotiales	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)
Levedurosos	<i>Candida albicans</i>	Saccharomycetales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 29) e de bambu (área 2)
-	<i>Cladophialophora</i> spp.	Chaetothyriales	Rizosfera de eucalipto (talhões 29, 58, 4a e 91) e bambu (área 1)
Micetomas	<i>Curvularia spicifera</i>	Pleosporales	Córtex vegetal de eucalipto (talhões 29 e 91)
Micetomas	<i>Curvularia trifolii</i>	Pleosporales	Rizosfera (área 1) e córtex vegetal de bambu (área 2)
Potencial sistêmico	<i>Emmonsilopsis coralliformis</i>	Onygenales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58, 29, 91 e 4a)
-	<i>Exophiala cancerae</i>	Chaetothyriales	Rizosfera de eucalipto (talhão

			29)
-	<i>Exophiala nigra</i>	Chaetothyriales	Rizosfera de eucalipto (talhão 4a)
-	<i>Exophiala xenobiotica</i>	Chaetothyriales	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)
-	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Saccharomycetales	Rizosfera de bambu (área 2)
-	<i>Malassezia dermatis</i>	Malasseziales	Rizosfera de bambu (área 1)
-	<i>Mortierella exigua</i>	Mortierellales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58, 29 e 4a) e bambu (área 1)
-	<i>Mortierella sarnyensis</i>	Mortierellales	Rizosfera de bambu (área 1)

-	<i>Mucor irregularis</i>	Mucorales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 29) e bambu (área 1)
-	<i>Mucor minutus</i>	Mucorales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 4a) e bambu (área 1) e de bambu (área 1)
-	<i>Paecilomyces purpureus</i>	Eurotiales	Rizosfera de eucalipto (talhão 4a)
-	<i>Phialophora geniculata</i>	Chaetothyriales	Rizosfera de eucalipto (talhões 58 e 4a) e bambu (área 1)
-	<i>Rhinochadiella</i> spp.	Chaetothyriales	Rizosfera de eucalipto (talhões 29 e 58)
-	<i>Rhizopus microsporus</i>	Mucorales	Rizosfera de eucalipto (talhão 4a)
-	<i>Trichosporon asahii</i>	Tremellales	Rizosfera de eucalipto (talhão 58)

Fonte: Elaborado por Maria Eduarda Grisolia e autora.

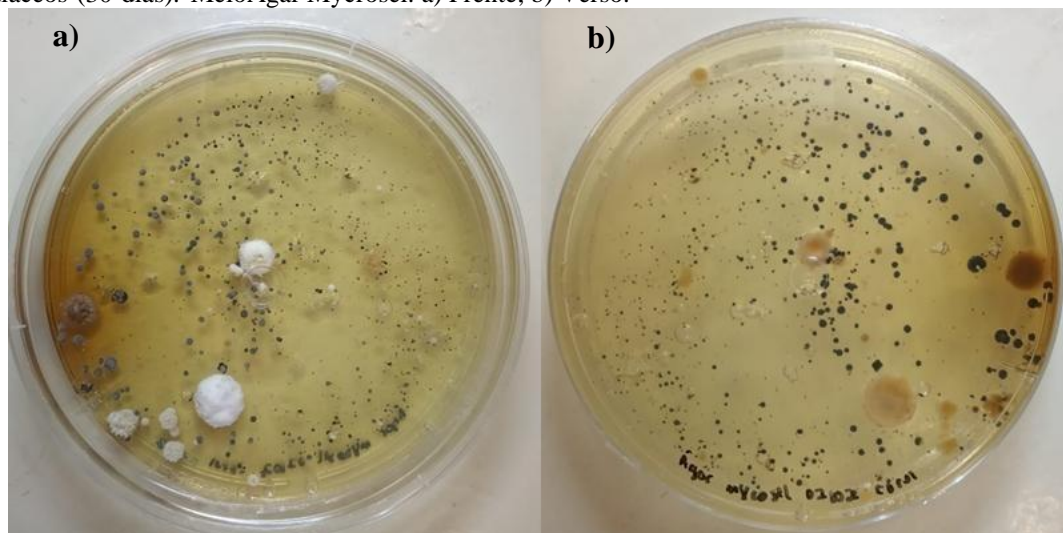
5.2. Método dependente de cultivo

Foi utilizado visando acessar a diversidade de fungos dematiáceos cultiváveis.

5.2.1. Isolamento e purificação dos isolados

A partir de dados parciais obtidos através do método independente de cultivo, foi possível direcionar o início do isolamento de dematiáceos. Foi dada prioridade para as amostras que até então haviam apresentado maiores porcentagens de Chaetothyriales (solo do talhão 58 e córtex vegetal da área 2 de bambu). As amostras que apresentaram a porcentagem de Chaetothyriales abaixo de 0,5% não foram isoladas.

Figura 22. Placa de isolamento do córtex vegetal da área 2 de bambu (BA2C), com o crescimento de fungos dematiáceos (30 dias). Meio Ágar Mycrosel. a) Frente; b) Verso.



Fonte: Arquivo pessoal.

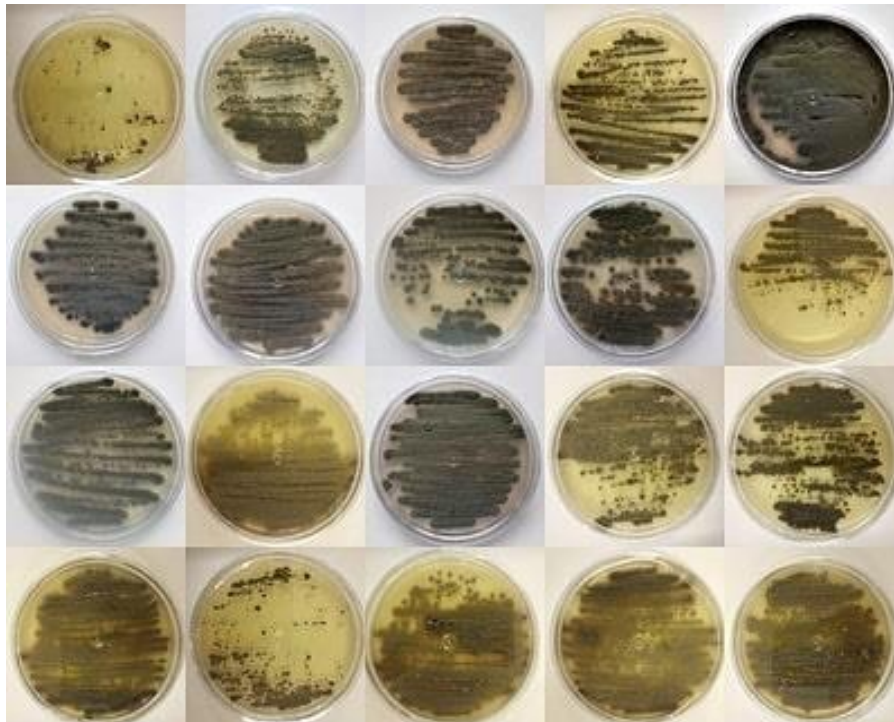
Ao todo foram recuperados 69 isolados de fungos dematiáceos, distribuídos entre 4 das 6 amostras isoladas (Tabela 5).

Tabela 5. Amostras que passaram pelo isolamento seletivo de fungos dematiáceos.

Código	Amostra	Isolados
BA2C	Córtex vegetal de <i>Bambusa vulgaris</i>	50
ET58R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	12
ET91C	Córtex vegetal de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	0
ET4aR	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	1
BA2R	Solo rizosférico de <i>Bambusa vulgaris</i>	0
ET29R	Solo rizosférico de <i>Eucalyptus tereticornis</i>	6
Total		69

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23. Linhagens isoladas e purificadas da amostra da área 2 de córtex vegetal de bambu (BA2C). 5 dias de crescimento. Meio BDA.

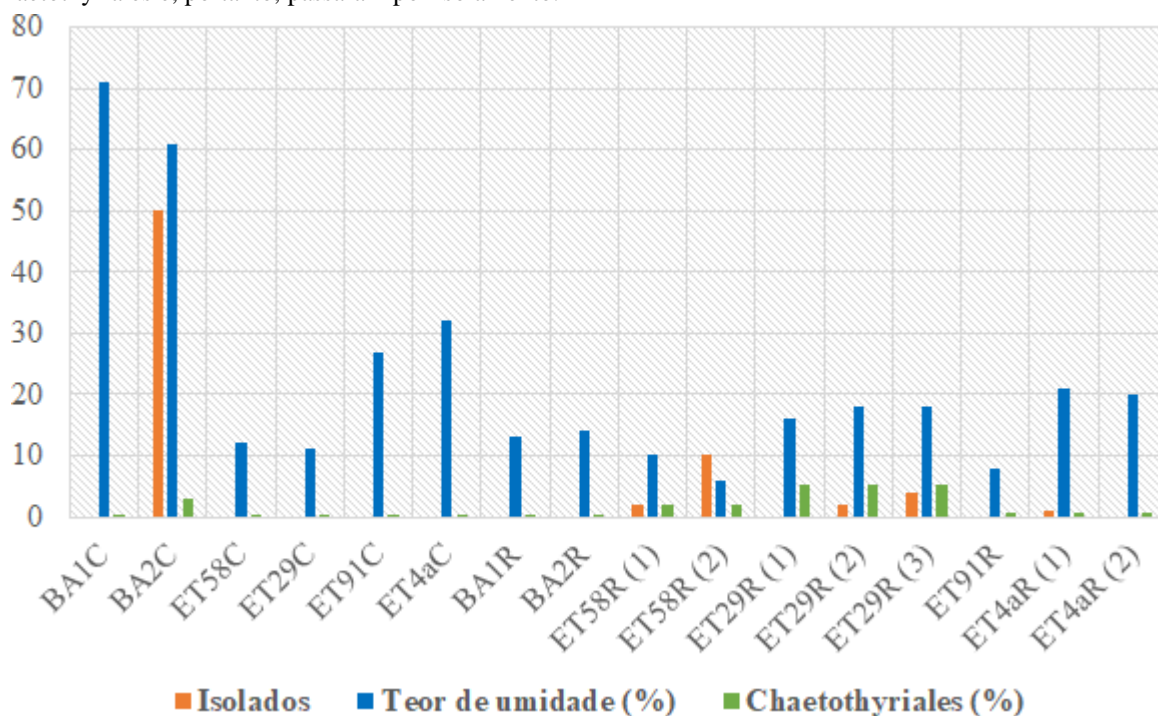


Fonte: Arquivo pessoal.

É válido destacar que ao longo dos isolamentos seletivos, apesar do uso de antimicótico na composição do meio de cultura, o fungo *Purpureocillium* spp. cresceu com muita facilidade.

No ato do isolamento seletivo, foi determinada através da massa da amostra, o teor de umidade. Posteriormente, amostras que não foram isoladas também foram pesadas para determinação e comparação da umidade entre as amostras. Não houve relação entre a porcentagem de Chaetothyriales e a presença de umidade na amostra, considerando que no solo rizosférico do talhão 29 de eucalipto (ET29R) foi detectada menor umidade e a maior porcentagem de representantes de Chaetothyriales, além de ser possível observar que as áreas de bambu apresentaram umidade alta, porém na área 1 (BA1C) foi detectada uma porcentagem muito baixa de Chaetothyriales e na área 2 (BA2C) uma porcentagem maior de táxons da ordem.

Figura 24. Comparação do teor de umidade das diferentes amostras com a porcentagem da ordem Chaetothyriales detectada pela análise metataxonômica. O número após o nome das amostras indica que houveram repetições para determinada amostra. A coluna de isolados está presente em amostras que indicaram porcentagem significativa de Chaetothyriales e, portanto, passaram por isolamento.

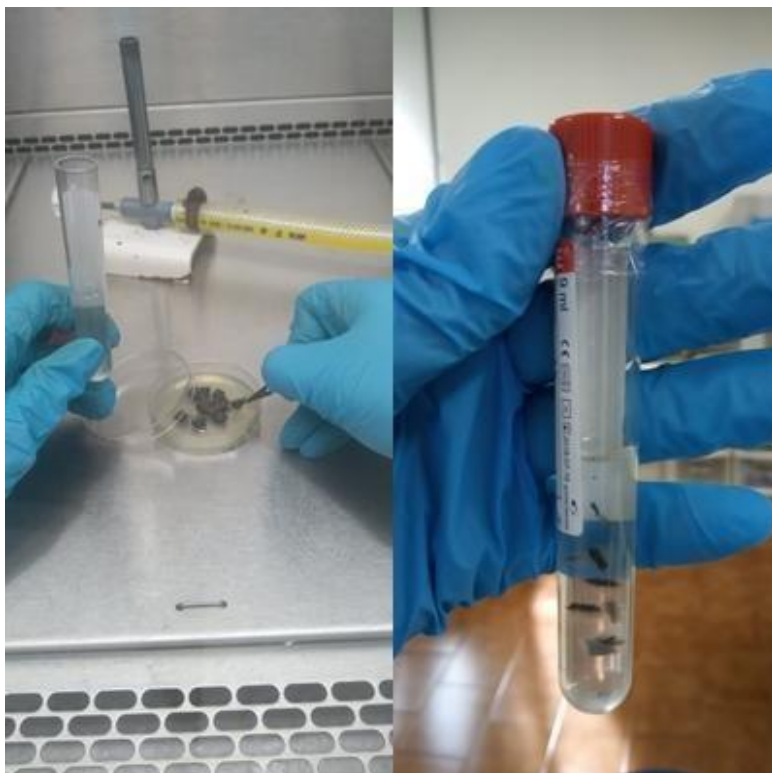


Fonte: Elaborado pela autora através do Excel.

5.2.2. Preservação das linhagens

A preservação de todos os isolados fúngicos foi realizada em água destilada, totalizando 69 dematiáceos - LMA 2044-2112 e 10 de isolados do fungo *Purpureocillium* spp. - LMA 2113- 2122. Esses fungos foram depositados na coleção de trabalho de microrganismos do LMA/Táxon (LMA 2044-2112).

Figura 25. Preservação de fungo dematiáceo em água destilada esterelizada.



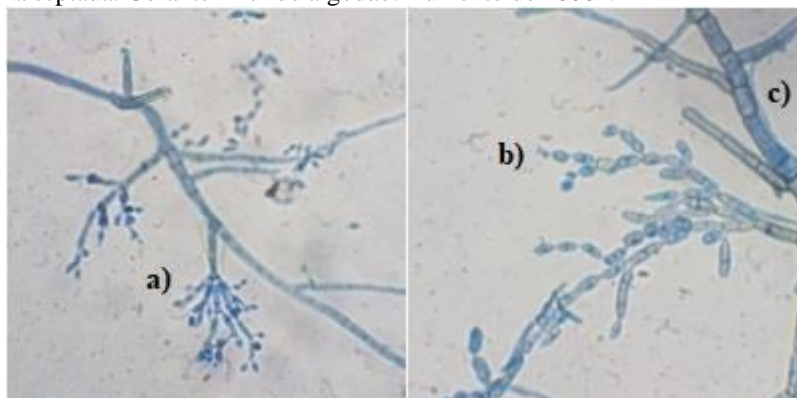
Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.3. Microcultivo

Após a realização de lâminas para observação das estruturas microscópicas, foi possível notar que a técnica não foi muito resolutiva para identificação de fungos dematiáceos. Muitos fungos não apresentaram a formação de estruturas reprodutivas. Posteriormente, para complementação, foi dada preferência para identificação molecular.

Os conidióforos de *Cladosporium* possuem comprimento variados, eretos, escuros e ramificados, conídios uni ou bicelulares, de forma e tamanho variados (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Figura 26. Micromorfologia das linhagens LMA 2045, 2048, 2051 e 2053, de *Cladosporium* sp. a) Conidióforo, b) Conídios e c) Hifa septada. Corante Azul de algodão. Aumento de 1000x.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.4. Identificação molecular dos isolados

A partir das sequências obtidas de 22 isolados dematiáceos, foi possível gerar dendogramas filogenéticos (Figuras 28, 29, 30 e 31). Foram identificados os táxons: *Cladosporium* sp., *Cyphellophora musae*, *Exophiala* sp. e *Exophiala pisciphila* (Quadro 5).

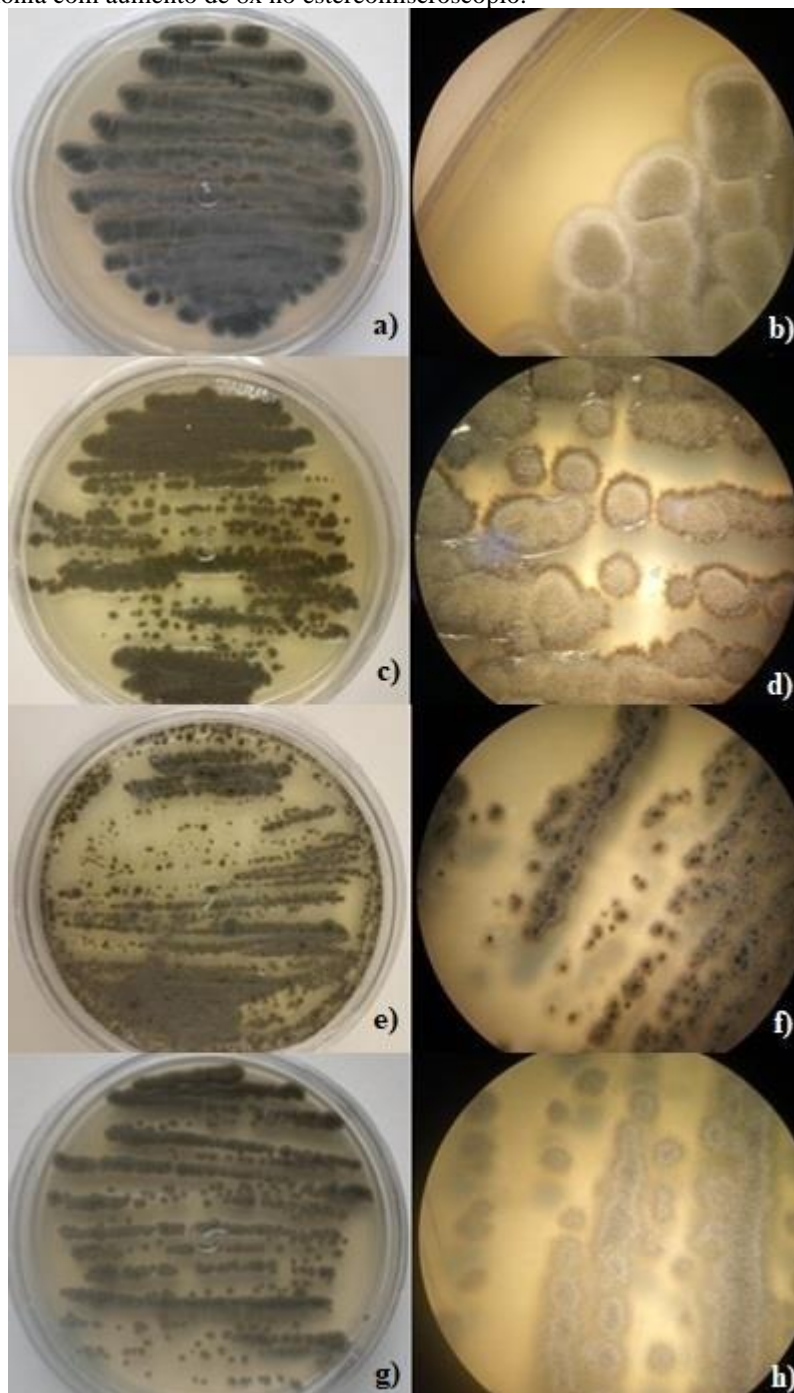
Quadro 5. Identificação molecular de isolados dematiáceos.

LMA/Código	Amostra	Identificação	Classe/Ordem/Família
2044 (BA2C 1)	Córtex vegetal de bambu	<i>Cladosporium</i> sp.	Dothideomycetes/Cladosporiales/ <i>Cladosporiaceae</i>
2045 (BA2C 2)			
2048 (BA2C 5)			
2051 (BA2C 8)			
2053 (BA2C 10)			
2058 (BA2C 15)			
2061 (BA2C 18)			
2062 (BA2C 19)			
2066 (BA2C 23)			
2067 (BA2C 24)			
2070 (BA2C 27)			
2077 (BA2C 34)			
2078 (BA2C 35)			
2085 (BA2C 42)			
2105 (ET58R 12)	Solo rizosférico de eucalipto	<i>Cladosporium</i> sp.	Dothideomycetes/Cladosporiales/ <i>Cladosporiaceae</i>

2079 (BA2C 36) 2093 (BA2C 50)	Córtex vegetal de bambu	<i>Cyphellophora musae</i>	Eurotiomycetes/Chaetothyriales/ <i>Cyphellophoraceae</i>
2094 (ET58R 1)	Solo rizosférico de eucalipto	<i>Exophiala</i> sp.	Eurotiomycetes/Chaetothyriales/ <i>Herpotrichiellaceae</i>
2095 (ET58R 2) 2101 (ET58R 8) 2102 (ET58R 9) 2103 (ET58R 10)	Solo rizosférico de eucalipto	<i>Exophiala pisciphila</i>	Eurotiomycetes/Chaetothyriales/ <i>Herpotrichiellaceae</i>

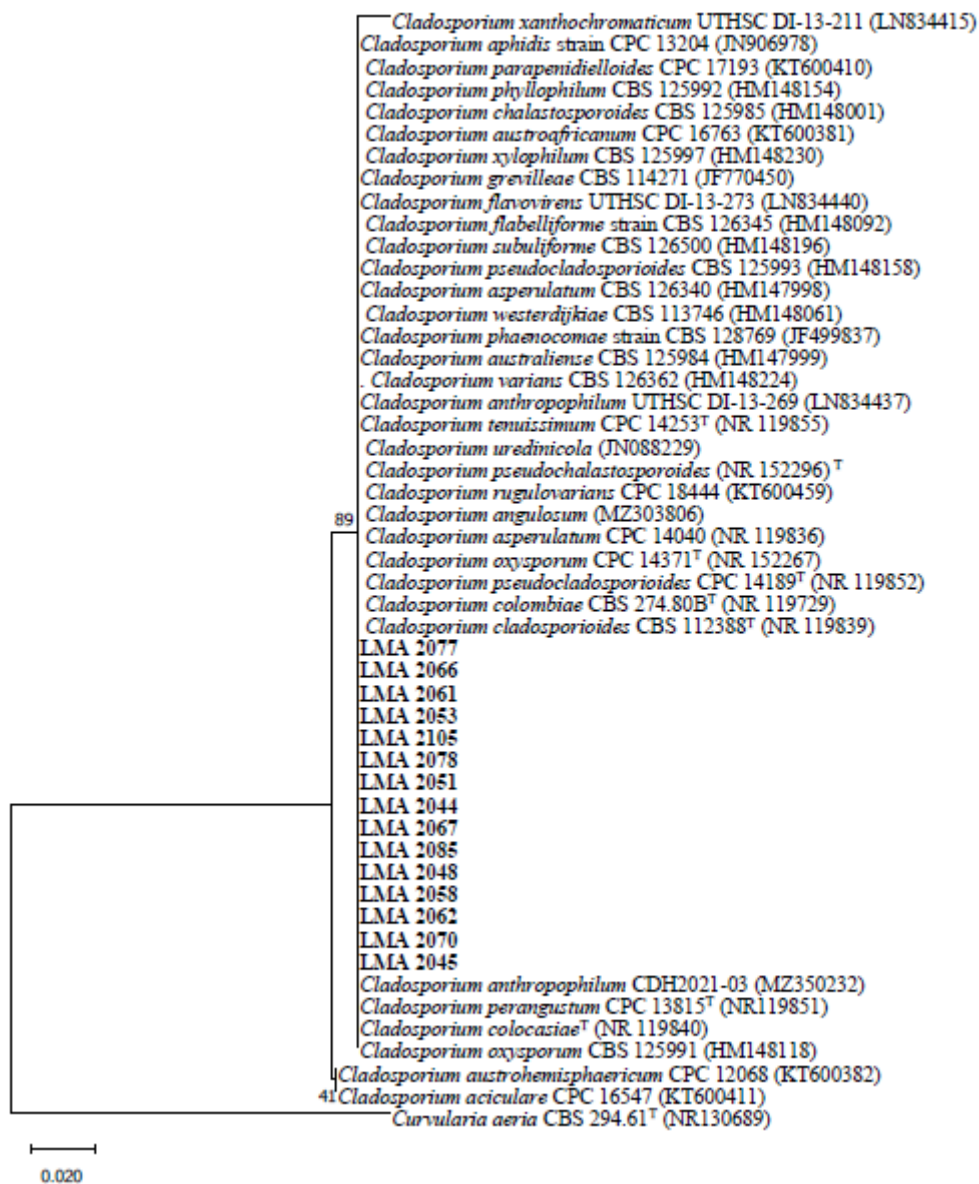
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 27. Isolados representantes dos táxons sequenciados. Crescimento de 5 dias. a) e b) Isolado representante de *Cladosporium* sp., LMA 2058. a) Colônia em meio BDA e b) Detalhe da colônia com aumento de 8x no estereomicroscópio. c) e d) Isolado representante de *Cyphellophora musae*, LMA 2079. a) Colônia em meio BDA e b) Detalhe da colônia com aumento de 8x no estereomicroscópio. e) e f) Isolado representante de *Exophiala* sp./*Capronia* sp., LMA 2094. e) Colônia em meio BDA e f) Detalhe da colônia com aumento de 8x no estereomicroscópio. g) e h) Isolado representante de *Exophiala pisciphila* LMA 2102. g) Colônia em meio BDA e h) Detalhe da colônia com aumento de 8x no estereomicroscópio.



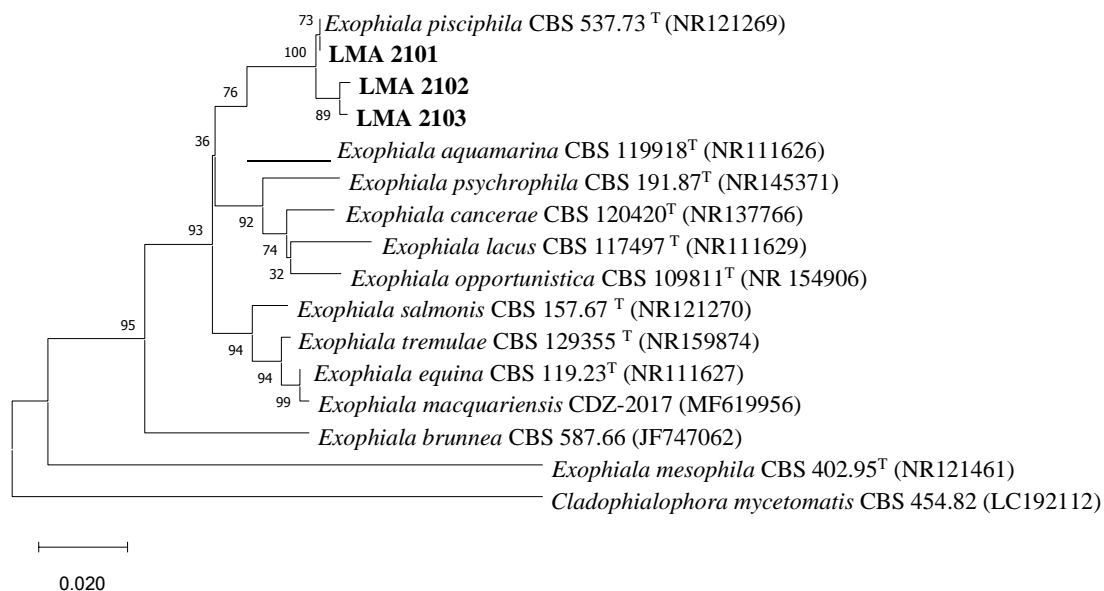
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 28. Dendograma para os isolados pertencentes ao gênero *Cladosporium*. Método Neighbor-joining, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do espaçador ribossomal ITS das linhagens LMA 2044, 2045, 2048, 2051, 2053, 2058, 2061, 2062, 2066, 2067, 2070, 2077, 2078, 2085 e 2105, e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw.



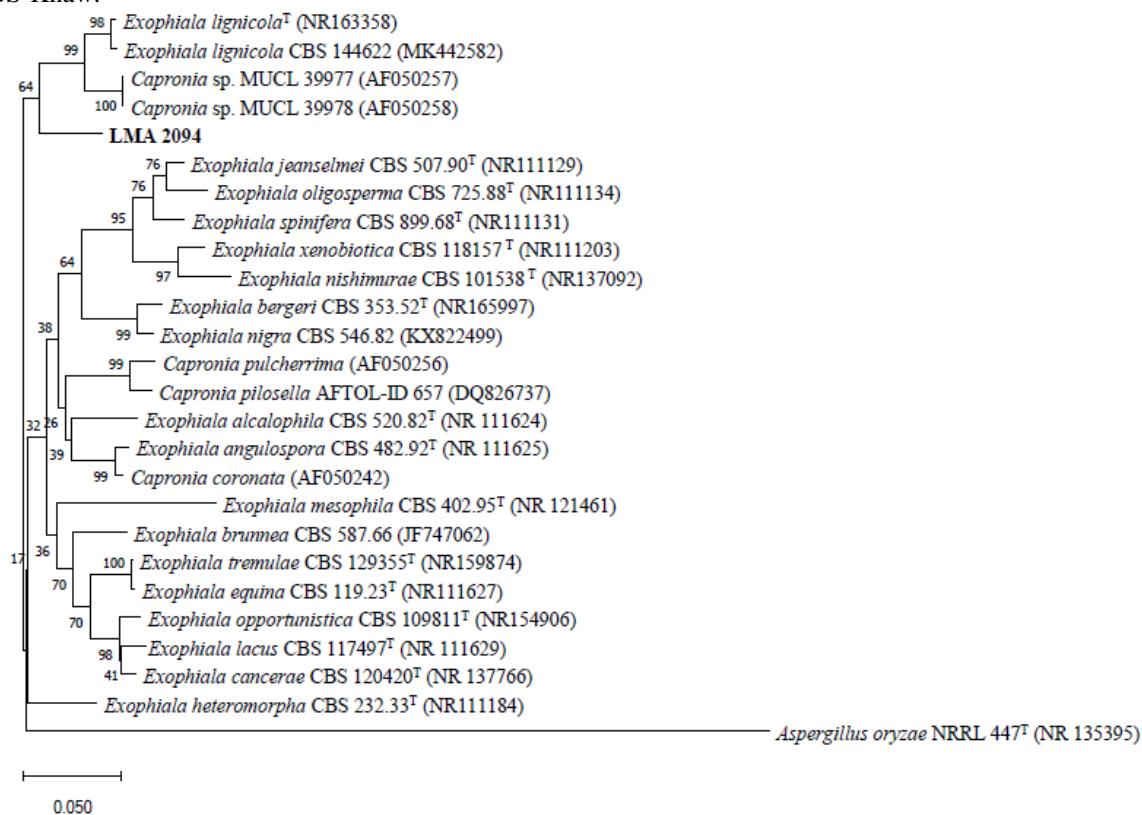
Fonte: Gerado através do MEGA X e editado pela autora.

Figura 29. Dendograma para os isolados pertencentes ao táxon *Exophiala pisciphila*. Método Neighbor-joining, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do espaçador ribossomal ITS das linhagens LMA 2101, 2102 e 2103, e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw.



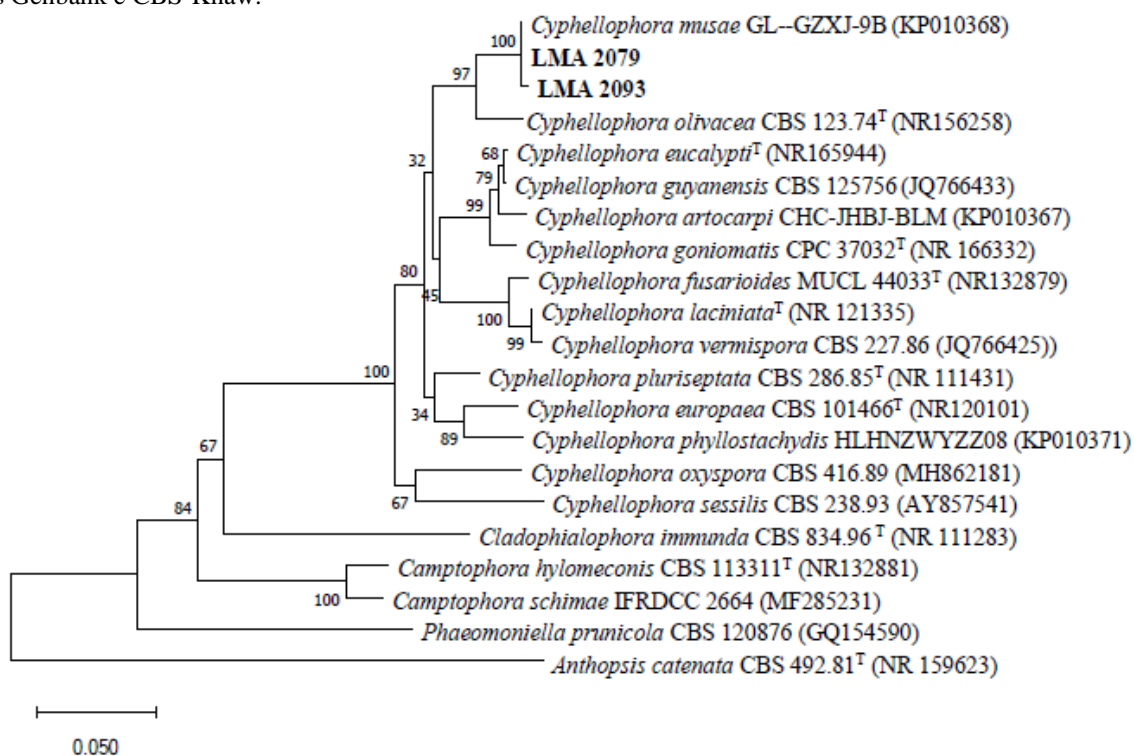
Fonte: Gerado através do MEGA X e editado pela autora.

Figura 30. Dendrograma para o isolado pertencente ao gênero *Exophiala*. Método Neighbor-joining, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do espaçador ribossomal ITS da linhagem LMA 2094, e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw.



Fonte: Gerado através do MEGA X e editado pela autora.

Figura 31. Dendograma para os isolados pertencentes ao táxon *Cyphellophora musae*. Método Neighbor-joining, baseado em distância genética demonstrando a relação entre a sequência parcial do espaçador ribossomal ITS das linhagens LMA 2079 e 2093, e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados Genbank e CBS-Knaw.



Fonte: Gerado através do MEGA X e editado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Os fungos são seres ubíquos, podendo ser encontrados em plantas, ar atmosférico, solo, água e integrando a biodiversidade de muitos ambientes (GOSTINČAR *et al.*, 2018). Acredita-se que o número de espécies seja de 3 milhões (LÜCKING *et al.*, 2020), com algumas estimativas mais arrojadas relatando 12 milhões, em média (WU *et al.*, 2019). Colonizam os mais diversos substratos, sustentando diversas formas de vida tróficas superiores e tendo papéis importantes na saúde animal (incluindo humana) e vegetal, agricultura e rede alimentar global (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019). A maioria dos fungos são sapróbios, trazendo benefícios como a degradação de matéria orgânica, criando húmus essencial à reciclagem de nutrientes, e outras vezes produzindo antibióticos e fornecendo alimentos (KOHLER; PERFECT, 2015).

Esse trabalho objetivou buscar informações sobre fungos, em especial Chaetothyriales, em substratos considerados potenciais fontes da biodiversidade desse grupo. Tendo em vista que a riqueza e a diversidade de organismos em uma comunidade são estritamente dependentes do esforço amostral realizado, e à medida que se aumenta a quantidade de sequências marcadoras (no caso de ITS), é uma tendência aumentar o número de OTUs, foi possível verificar através das curvas de rarefação que a amostragem feita foi estatisticamente confiável.

Os agrupamentos gerados pelo gráfico de PcoA demonstraram que o solo rizosférico de eucalipto apresenta uma comunidade microbiana mais uniforme, em comparação com o córtex. Por outro lado, o bambu apresentou uma comunidade microbiana mais heterogênea e variável, para áreas amostradas (área 1 e área 2) e tipo de amostra (solo e córtex). Entretanto, os dados não são suficientes para uma análise estatística desta variável, visto que foram analisadas 4 regiões de eucalipto e 2 de bambu.

A maior presença de fungos encontrada em solo do que em córtex vegetal nas amostras coletadas era esperada. Os seres vivos dos ecossistemas terrestres estão associados diretamente com os solos durante seus ciclos de vida. Por isso, o solo é considerado um elemento chave de toda a biodiversidade do planeta. Nosso estudo amostrou tipos diferentes de solos. Observou-se uma maior ocorrência de fungos no tipo Argissolo Vermelho Eutrófico, considerado argiloso e com grande concentração de matéria orgânica e umidade. Por ser eutrófico (alta saturação de bases), é normalmente ácido e fértil, pois contém magnésio e potássio (DOS SANTOS *et al.*, 2020). O talhão de eucalipto número 29 (ET29R), que apresentou uma maior riqueza e diversidade de OTUs para a rizosfera, está inserido numa área com esse tipo de solo, condição que provavelmente favoreceu o resultado obtido. Maiores

investigações serão necessárias para esclarecer possíveis fatores intrínsecos à região amostrada.

Em contrapartida, as amostras de córtex e solo de bambu (BA1C e BA2R, respectivamente), cujas plantas encontram-se numa região de solo do tipo Gleissolo Háptico, apresentaram menor diversidade em ambas as amostras. Classificado como distrófico, esse tipo de solo possui saturação por bases inferior a 50%, é relatado como bastante ácido, de média ou baixa fertilidade, e apresenta sérias limitações para uso agrícola, pois costumam ter oxigenação deficiente e não favorecem a mecanização (DE SOUZA; LOBATO, 2021). Acredita-se que tais características tenham influenciado de forma determinante a diversidade de fungos (considerados majoritariamente aeróbios, por exemplo), nas amostras estudadas.

Segundo o plano de manejo da FEENA (REIS; PONTALTI, 2005), o setor norte da unidade é composto de solos com textura média a arenosa, e analiticamente distróficos (baixa fertilidade), sendo que o setor sul é composto de solos com textura argilosa a muito argilosa, e analiticamente eutróficos (alta fertilidade), região a qual foi detectada a maior diversidade fúngica e de Chaetothyriales no solo. Este parâmetro pedológico, a saturação de bases, diz respeito a cátions básicos trocáveis e está associado diretamente com a fertilidade natural do solo, também influenciando na retenção de água dos solos e a disponibilidade de nutrientes (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

A riqueza e abundância de espécies fúngicas do solo da área 1 (bambu) em específico podem estar atreladas à sua localização, que favorece o acúmulo de umidade e matéria orgânica. Banhada pelo Rio Santo Antônio, a área encontra-se ao lado da antiga e desativada estação de tratamento de água da unidade e sofre eventualmente com o escoamento de água do lago (quando é necessária a abertura da comporta do lago, esta área está sujeita a alagamento).

A área 2 de bambu apresentou dentro da ordem Chaetothyriales baixa porcentagem de táxons no solo rizosférico (>0,15%) e considerável porcentagem no córtex vegetal (2,99%). As frequências de 2,99% de Chaetothyriales em córtex vegetal de *Bambusa vulgaris* (BA2C) e de 5,18% em solo rizosférico de *Eucalyptus tereticornis* (ET29R) obtidas através do método independente de cultivo, foram bons indicativos de que esses ambientes abrigam significativa abundância de táxons da ordem. Portanto, são interessantes e potenciais nichos para o estudo contínuo de Chaetothyriales, pois podem contribuir para preencher as lacunas existentes na taxonomia do grupo.

Os índices de diversidade e frequência relativa dos filos fúngicos encontrados, revelaram o seguinte padrão: o filo Basidiomycota prevaleceu no córtex vegetal da área 1 representando mais da metade da comunidade fúngica, enquanto no córtex da área 2, apresentou

99,18% pertencente ao filo Ascomycota. Condições do córtex vegetal da área 2 favorecem a manutenção de ascomicetos em detrimento de basidiomicetos. Basidiomycota são bons competidores, sendo compreensível que onde eles prevalecem com abundância não seja propício o estabelecimento de Chaetothyriales, que são baixos competidores, oligotróficos, pertencentes ao filo Ascomycota. É possível que a presença em abundância do filo Basidiomycota suprimiu a presença de Ascomycota, e consequentemente de Chaetothyriales, o que justifica as baixas porcentagens da referida ordem obtidas na área 1 de bambu e porcentagens mais significantes no córtex da área 2.

O não compartilhamento abundante de OTUs pelas amostras vegetais e de solo rizosférico pode ser explicado pelas características intrínsecas desses diferentes substratos. O solo consiste num meio altamente complexo, um ecossistema com múltiplos componentes abióticos e bióticos, sendo que todos os principais grupos taxonômicos de fungos são encontrados nos solos. Somados a isso, fatores que promovem a alta diversidade de espécies nas comunidades de fungos do solo como a heterogeneidade do micro-habitat, mistura de decompositores primários, secundários e terciários, persistência de matéria orgânica que promove a partição de nicho, mudanças temporais no clima e na vegetação local e a notável capacidade das células e micélios de fungos se comportarem de forma individualista (BILLS *et al.*, 2004).

Nas plantas, ocorrem diferentes interações microbianas (harmônicas e desarmônicas) que promovem a biodiversidade vegetal (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2016), abrigando grande variedade filogenética de espécies fúngicas (endofíticas, epifíticas, sapróbias ou parasitas). Microrganismos associados às plantas estão sendo amplamente estudados para o controle biológico, promoção de crescimento, fixação de nutrientes e desenvolvimento vegetal (DRESCH; LANA; MACIEL, 2019). O microbioma rizosférico é fundamental para as plantas, proporcionando defesa contra pragas e doenças, facilitando a aquisição de nutrientes e ajudando as plantas a suportarem desequilíbrios abióticos (PÉREZ-JARAMILLO; MENDES, RAAIJMAKERS, 2016), sendo assim, de extrema relevância a realização de trabalhos como este.

Dentre os Chaetothyriales que foram encontrados tanto em amostra de solo rizosférico como em amostra de córtex vegetal, encontra-se *Veronaea compacta* (PAPENDORF, 1976). A partir de buscas nos bancos de dados foi possível observar que o táxon pertencente à família *Herpotrichiellaceae* tem sido pouco estudado, já que desde a sua descrição em 1976 não existem muitos artigos que o incluam. Quando o fazem, aparece em estudos de filogenia molecular na composição dos dendrogramas. Até então, o papel deste organismo no ambiente

e potenciais aplicações são lacunas não preenchidas. Pelo fato de ter sido um táxon encontrado nas amostras mediante ao método independente de cultivo, há a possibilidade de ser isolado através método dependente (isolamento seletivo). Se assim o for, poderá ser preservado e bioprospectado.

Com relação aos táxons dematiáceos não pertencentes à ordem Chaetothyriales que foram encontrados nos dois tipos de amostras estudados, destacamos a presença de *Cladosporium cladosporioides* (Cladosporiales), fungo cosmopolita muito comum (BENSCH *et al.*, 2015), encontrado em diversos substratos. Estudos e aplicações envolvendo a espécie são bem difundidos na literatura (Quadro 4), demonstrando ampla gama de potenciais biotecnológicos a serem explorados.

Havendo compartilhamento ou não de espécies dematiáceas entre as amostras coletadas, houve uma diversidade notável de táxons melanizados em todas as amostras. A classificação de fungos Chaetothyriales foi verificada majoritariamente na família *Herpotrichiellaceae*, conhecida e bem estudada por abrigar representantes de importantes infecções fúngicas.

Alguns gêneros encontrados em ordens de Chaetothyriales e Pleosporales, permanecem numa posição taxonômica incerta (*incertae sedis*), não tendo sido alocados em qualquer família existente da ordem. A respeito do gênero *Exophiala*, conhecido e estabelecido representante da família *Herpotrichiellaceae*, novas espécies foram recém-descobertas (SUN *et al.*, 2020; CROUS *et al.*, 2020). O gênero *Minimelanolocus* foi inserido na ordem Chaetothyriales recentemente (LIU *et al.*, 2015), e estudos recentes têm compilado mais dados de sequências, que podem ajudar a esclarecer as relações filogenéticas entre esse gênero e *Thysanorea*, os quais são intimamente relacionados, buscando-se conhecer o *status* filogenético dos grupos (WANG *et al.*, 2019). Novas espécies de *Minimelanolocus* vêm sendo descobertas (WAN *et al.*, 2021), indicando que conhecemos muito menos do que imaginamos acerca da ordem Chaetothyriales e que há demanda para estudos taxonômicos e filogenéticos mais aprofundados acerca dos dematiáceos como um todo.

Os resultados encontrados ao longo deste trabalho revelaram que táxons de Chaetothyriales que já foram relatados como patogênicos, como *Cyphellophora europaea*, *Cyphellophora fusarioides*, *Cyphellophora suttonii*, *Exophiala bergeri* e *Exophiala cancerae*, também podem ser encontrados em fontes ambientais, como córtex vegetal e solo rizosférico de eucaliptos e bambus.

Dos 23 genomas principais de oportunistas humanos e espécies ambientais (TEIXEIRA *et al.*, 2017) a técnica de metataxonomia aplicada nesse trabalho revelou a espécie

Exophiala xenobiotica, e gêneros de importantes espécies como *Rhinochrysiella* sp., *Exophiala* sp., *Phialophora* sp. e *Cladophialophora* sp.

Neste trabalho a espécie *Exophiala cancerae* foi encontrada através da metataxonomia numa amostra de solo rizosférico de eucalipto (ET29R). O táxon possui reconhecida importância clínica como agente etiológico da doença do caranguejo letárgico, veiculada pela água (DE HOOG *et al.*, 2011). Tal doença afeta caranguejos que servem como importantes fontes de alimento para algumas populações humanas, além de também acometer humanos através de infecções na pele e unhas (HURST, 2019).

Em estudo prévio realizado por De Fátima Costa *et al* (2020), baseado em busca *in silico* em bancos de dados metataxonômicos utilizando a região ITS, a espécie também foi encontrada em rizosfera e raiz de milho e em cana-de-açúcar.

Tais resultados somados aos deste trabalho reforçam que o agente não é seletivo para animais ectotérmicos, indicando uma ocorrência ambiental mais ampla. Sendo assim, possível atribuir a especificidade de *E. cancerae* patogênica à determinadas linhagens, mas não à espécie. Esses resultados mostram a importância de levantamentos de isolados e informações associadas a fim de compreender o habitat, ecologia, patogenicidade e oportunismo desses seres.

A espécie de importância médica *Emmonsiiellopsis coraliformis* (Quadro 5) foi encontrada em todas as amostras de solo rizosférico de eucalipto. É um fungo dimórfico da família *Ajellomycetaceae*, considerado sapróbio, encontrado em solo e sedimentos, porém deve ser tratado com cautela, considerando seu potencial para causar infecções sistêmicas graves (MARIN-FELIX *et al.*, 2015).

Microrganismos agentes de patogenicidade oportunista compõem um fator de alta relevância para os estudos de diversidade e funcionamento das comunidades fúngicas. Algumas espécies de fungos estão associadas a doenças sistêmicas, subcutâneas, cutâneas, superficiais ou oportunistas (DE HOOG *et al.*, 2009). As infecções fúngicas sistêmicas são profundas, podendo afetar vários tecidos e órgãos, e geralmente são causadas pela inalação de esporos suspensos dos fungos que vivem no solo, iniciando no pulmão e se difundindo aos outros tecidos do organismo. Levando em consideração fatores agravantes como pandemias virais, a imunodepressão ocasionada pela infecção de determinados vírus e medicamentos utilizados no tratamento podem facilitar infecções fúngicas.

A atual pandemia de coronavírus (COVID-19), doença causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), teve início em dezembro de 2019 na China e dizimou mais de um milhão de vidas em todo o mundo. Em seu estágio grave, é tratada com glicocorticóides sistêmicos,

medicamentos comprovadamente benéficos e importantes, reduzindo a mortalidade em pacientes hipoxêmicos com COVID-19 (GARG *et al.*, 2021; STERNE *et al.*, 2020).

Os glicocorticóides, bem como a desregulação do sistema imunológico causado pela COVID-19 podem aumentar o risco de infecções secundárias (GARG *et al.*, 2021). Aspergiloses (principalmente causadas por *Aspergillus fumigatus*) (ARASTEHFAR *et al.*, 2020) são as mais comumente detectadas e mucormicose são mais raras, porém severas (BLAIZE *et al.*, 2020). São causadas principalmente pelos gêneros *Rhizopus*, *Mucor* e *Rhizomucor* (ZURL *et al.*, 2021; NICOLÁS *et al.*, 2020).

Neste trabalho foram encontrados táxons pertencentes aos gêneros mencionados acima através da metataxonomia, como por exemplo *Rhizopus microsporus*, que foi revelado nas amostras de solo rizosférico de eucalipto do talhão 4a (ET4aR) e tem sido reportado recentemente em pacientes com COVID-19 (ZURL *et al.*, 2021). Apesar desses fungos estarem dispersos naturalmente no ambiente, locais com pessoas em vulnerabilidade socioeconômica, com baixo acesso a saneamento básico e/ou imunodeprimidas são fatores que podem abrir as portas para infecções fúngicas oportunistas.

As espécies de fungos acessíveis e facilmente cultiváveis foram alvos de pesquisadores no decorrer da história da micologia, criando grandes lacunas e distorções em nossas árvores filogenéticas devido à amostragem incompleta do grupo (DE HOOG, 2014). Entretanto, os fungos são diversos e ubíquos, presentes em ambientes incluindo hostis, sendo muito provável que ainda haja muita diversidade genética a ser explorada, principalmente levando em consideração o fato de que o início do sequenciamento dos táxons é recente.

Isolar Chaetothyriales do ambiente depende de métodos específicos devido à sua natureza oligotrófica e baixa capacidade competitiva (GUEIDAN *et al.*, 2014). Hidrocarbonetos aromáticos voláteis são usados como substrato seletivo em função de sua preferência por essas moléculas. Técnicas de isolamento como a flotação em óleo mineral (SATOW *et al.*, 2008) e o enriquecimento atmosférico com hidrocarbonetos (ZHAO *et al.*, 2010) costumam ser muito eficientes. Neste trabalho, a técnica de flotação em óleo mineral proporcionou o isolamento de 69 fungos dematiáceos.

O estudo de fungos dematiáceos requer a descrição acurada de informações fenotípicas, genotípicas, químicas e filogenéticas, constituindo uma abordagem polifásica da taxonomia (AMETRANO; MUGGIA; GRUBE, 2019; MUGGIA *et al.*, 2021), levando à compreensão de linhagens filogeneticamente relacionadas. Isso já foi constatado para o fungo *Aureobasidium pullulans*, membro da ordem Dothideales.

Os isolados obtidos através do método dependente de cultivo mostraram que na

amostra de córtex vegetal de bambu da área 2 (BA2C) a diversidade de fungos dematiáceos foi a maior (50 isolados), em comparação com outras amostras isoladas, de solos rizosféricos de eucalipto (ET58R= 12 isolados, ET29R= 6 isolados e ET4aR=1 isolado). Apesar da referida amostra ter uma considerável porcentagem de Chaetothyriales (2,99%) e ter apresentado o maior número de isolados dematiáceos, foi possível verificar que um número significativo de isolados dematiáceos pertencem ao gênero *Cladosporium* spp. Representantes do gênero estão entre os fungos mais comuns em todo o mundo, sendo isolados de quase qualquer fonte ambiental e localização geográfica (BENSCH; BRAUN; CROUS, 2012), sendo assim, esperada a frequência de isolamento de táxons do grupo neste projeto. Para uma identificação específica, serão necessárias amplificações de outras regiões marcadoras, além da ITS.

Relativo à ordem Chaetothyriales, a partir dos sequenciamentos realizados foi possível detectar uma frequência menor de isolamento do grupo. *Cyphellophora musae*, considerado um fitopatógeno (GAO *et al.*, 2015) e *Exophiala pisciphila* foram as espécies detectadas. *E. pisciphila* foi relatada na literatura com uma ampla gama de importâncias e aplicações (Quadro 3), sendo na produção de antibiótico, atuando no crescimento vegetal do milho sob influência de metais pesados, sugerindo uma estratégia potencial eficiente para planta sobreviver em ambientes estressantes, além de causar cromoblastomicose humana e infecção em peixes.

Apenas 6 isolados dematiáceos (os quais ainda não foram sequenciados e identificados) foram recuperados da amostra que apresentou maior porcentagem de Chaetothyriales pela metataxonomia, proveniente de solo rizosférico de eucalipto (ET29R), demonstrando que é limitado utilizar apenas a técnica dependente de cultivo para o estudo de diversidade desse grupo. Apesar do método seletivo ter buscado favorecer esses microrganismos, eles possuem baixa competitividade em meio de cultura artificial, sendo necessários métodos complementares, como o de enriquecimento, para registro de suas ocorrências.

Para o gênero *Cladosporium* detectado através do isolamento dependente de cultivo nas amostras BA2C e ET58R, a metataxonomia detectou respectivamente as porcentagens de 3,10% e 8,32%. Um método confirmou o outro. Já para os táxons *Exophiala pisciphila* e *Cyphellophora musae*, não foi possível a detecção através da metataxonomia e pelo método dependente de cultivo sim, indicando que um método complementou o outro. Tal constatação indica que o uso combinado de técnicas dependentes e independentes de cultivo para o estudo de dematiáceos é indispensável. No presente estudo a combinação das referidas ferramentas proporcionou não só confirmação, mas complementação de dados.

Considerando os isolados que foram sequenciados até então, as amostras apresentaram

majoritariamente linhagens de *Cladosporium* para fungos dematiáceos, e *Exophiala pisciphila* para Chaetothyriales. A identificação específica de linhagens Cladosporiales deverá ser realizada, a partir de outros marcadores moleculares. É possível que mais gêneros e/ou espécies sejam revelados, a partir do sequenciamento dos demais isolados que ainda não passaram por essa etapa. A busca pela identificação das espécies continuará, e será incluída nos artigos a serem publicados.

A partir da determinação do teor de umidade das amostras foi possível verificar que os maiores teores de umidade foram de córtex vegetal. As células vegetais que compõem o tecido das plantas possuem bastante água, possuindo vacúolo para armazenamento. Em células vegetais a porcentagem de água pode variar de 80 a 95% (SALAMONI, 2008). Também foi possível constatar que a concentração de água nas amostras não foi um fator determinante para o isolamento de dematiáceos. Sendo um grupo oligotrófico, é justificável que não necessariamente um maior volume de umidade esteja atrelado a maior diversidade de fungos melanizados.

Apesar da utilização do antimicótico cicloheximida (comumente utilizado no isolamento de dermatófitos), que atua como inibidor de síntese de proteínas (GOTTHARD *et al.*, 2020) limitando o crescimento de fungos sapróbios e alguns patogênicos como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus* spp. (SAMANTA, 2015), o gênero *Purpureocillium* spp. apareceu com alta frequência em todas as amostras estudadas. Este é normalmente encontrado em solo, humanos, animais, plantas, nematóides e ovos de nematóides, e os isolados aqui obtidos se mostraram resistentes a uma concentração de 500 µg/mL de cicloheximida. *Purpureocillium lilacinum* é a espécie tipo do gênero, ocupando reconhecidas aplicações no controle de pragas de nematóides (KHAN *et al.*, 2006) e importância clínica, já que pode estar envolvido em doenças humanas e em animais, como a hialohifomicose (SAFDAR, 2002). A filogenia dessa espécie mostra grande semelhança entre isolados clínicos e ambientais, demonstrando que é difícil separar isolados de *P. lilacinum* patogênicos de isolados ambientais (MOREIRA; OLIVEIRA; BORBA, 2018). Este fator evidencia a importância de estudos taxonômicos e ecológicos que contemplem esses táxons.

Além da espécie tipo, o gênero conta com outras espécies, como exemplo o fungo *P. sodanum*, que foi recentemente reconhecido como uma nova espécie, próxima ao *P. lilacinum*, com base nas análises da sequência de DNA (LI *et al.*, 2016).

Devido à frequência e persistência significativas do gênero ao longo dos isolamentos deste trabalho, alguns isolados provenientes das amostras foram repicados, purificados e preservados e considerando a reconhecida aplicação para bioeconomia do gênero, foram

depositados no acervo de fungos do laboratório para identificação acurada e desenvolvimento de futuros projetos.

As aplicações de Chaetothyriales na biotecnologia e bioeconomia são extensas nos mais diversos ramos. Doenças causadas por fungos da ordem Chaetothyriales variam de infecções cutâneas leves a cerebrais fatais ou disseminadas, afetando humanos e animais em todo o mundo.

Tendo em vista a ocorrência de fungos ambientais com potencial oportunista, inclusive em amostras deste trabalho, coloca-se em evidência a importância de estudos que aprofundem os conhecimentos científicos acerca de fungos, como sobre a diversidade, identificação e perfis de resistência antimicótica.

7 CONCLUSÕES

Fungos do filo Ascomycota aparecem de forma preponderante nas amostras ambientais estudadas da Floresta Estadual “Edmundo Navarro de Andrade”.

Amostras de solo rizosférico e córtex vegetal de eucaliptos e bambus apresentam, pela análise metataxonômica, sequências de fungos sapróbios ambientais, espécies de importância para bioeconomia e área médica.

O ambiente amostrado constitui um abundante reservatório de Chaetothyriales e outros dematiáceos, particularmente nas amostras de solo rizosférico do tipo Argissolo Vermelho Eutrófico. A região do talhão 29 de eucalipto é a que se destaca.

A ferramenta molecular utilizada, dentro do objetivo proposto, é adequada para nortear técnicas de isolamento seletivas. A construção de bibliotecas metataxonômicas por DNAs ambientais, como a realizada ao longo deste trabalho, compõe uma fonte de sequências importantes para a taxonomia de grupos fúngicos. Além disso, métodos independente e dependente de cultivo são complementares e o uso combinado das técnicas proporciona importantes dados para o estudo de fungos dematiáceos.

É possível que sejam descritas espécies de dematiáceos ainda desconhecidas pela ciência, em decorrência da ausência de informações sobre o grupo e sequenciamento para identificação molecular em andamento.

A família *Herpotrichiellaceae* encontra-se bem representada nas amostras ET29R, ET91R e ET4aR. A família *Cyphellophoraceae* é bem representada em áreas de bambu, precisamente nas amostras BA1R e BA2C.

O presente trabalho corrobora com relatos anteriores sobre a presença do táxon dematiáceo conhecido como agente causador da doença do caranguejo letárgico, *Exophiala cancerae*, em fontes ambientais

Conclui-se, finalmente, que deve haver uma constante e profunda investigação acerca da diversidade de fungos em ambientes naturais. Em função do levantamento de espécies oportunistas em eucaliptos e bambus da FEENA, propõe-se a elaboração de uma cartilha informativa para visita na unidade. A Floresta representa uma área de recursos genéticos importantes, o que reforça sua importância para pesquisa, conservação e prospecção.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J., Groenewald, J. Z., Coetzee, M. P. A., Wingfield, M. J., & Crous, P. W. Evolution of lifestyles in Capnodiales. **Studies in Mycology**, 2020.
- AJELLO, L.; Padhye, A.A.; Payne, M. Phaeohyphomycosis in a dog caused by *Pseudomicrodochium suttonii* sp. nov. **Mycotaxon**, 12: 131-6, 1980.
- ALTSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**. 215:403-410. 1990.
- ANDARGIE, M., Congyi, Z., Yun, Y., & Li, J. Identification and evaluation of potential bio-control fungal endophytes against *Ustilagoideae virens* on rice plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(6), 1-10. 2017.
- AOKI, T., Fukuoka, H., Inatomi, T., Horiuchi, N., Kamei, K., & Sotozono, C. A Case of Black Fungal Keratitis Caused by *Biatriospora mackinnonii*. **Cornea**, 2021.
- ASLAM, M. S., Aishy, A., Samra, Z. Q., Gull, I., & Athar, M. A. Identification, purification and characterization of a novel extracellular laccase from *Cladosporium cladosporioides*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 26(6), 3345-3350. 2012.
- AMETRANO, C. G., Muggia, L.; Grube, M. Extremotolerant black fungi from rocks and lichens. In **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance** (pp. 119-143). Springer, Cham, 2019.
- ANDERSON, I. C. & Cairney, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental microbiology**, 6.8: 769-779. 2004.
- ARASTEHFAR, A., Carvalho, A., van de Veerdonk, F. L., Jenks, J. D., Koehler, P., Krause, R., ... & Hoenigl, M. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA)—from immunology to treatment. **Journal of Fungi**, 6(2), 91. 2020.
- ARZANLOU, M. & KHODAEI, S. *Aureobasidium iranianum*, a new species on bamboo from Iran. **Mycosphere**, 3.4: 404-408. 2012.
- ATTILI-ANGELIS, D. Relatório final de atividades de pós-doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro-SP. 2010.
- ATTILI-ANGELIS, D., Duarte, A. P. M., Pagnocca, F. C., Nagamoto, N. S., De Vries, M., Stielow, J. B., & de Hoog, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, 65(1), 65-75. 2014.
- BADALI, H., Gueidan, C., Najafzadeh, M. J., Bonifaz, A., van den Ende, A. G., & De Hoog, G. S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, 61, 175-191. 2008.
- BARON, Noemi Carla. **Identificação e caracterização de fungos melanizados com potencial de degradação de tolueno**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro. 2014.

- BARON, N. C., Pagnocca, F. C., Otsuka, A. A., Prenafeta-Boldú, F. X., Vicente, V. A., & Attili de Angelis, D. Black Fungi and Hydrocarbons: An Environmental Survey for Alkylbenzene Assimilation. **Microorganisms**, 9(5), 1008. 2021.
- BATZER, J. C., Weber, R. W. S., Mayfield, D. A., & Gleason, M. L. Diversity of the sooty blotch and flyspeck complex on apple in Germany. **Mycological progress**, 15(1), 2. 2016.
- BAY, C., González, T., Munoz, G., Legarraga, P., Vizcaya, C., & Abarca, K. (2017). Nasal phaeohyphomycosis by *Curvularia spicifera* in pediatric patient with neutropenia and acute myeloid leukemia. **Revista chilena de infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología**, 34(3), 280-286. 2017.
- BELGINI, D. R. B.; Dias, R. S.; Siqueira, V. M.; Valadares, L. A. B.; Albanese, J. M.; Souza R. S.; Torres, A. P. R.; Sousa, M. P.; Silva, C. C.; De Paula, S. O.; Oliveira, V. M. Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. **World J Microbiol Biotechnol**, 30(10):2689-700. 2014.
- BENSCH, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in mycology**, 72, 1-401. 2012.
- BENSCH, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., de Jesús Yáñez-Morales, M., & Crous, P. W. (2015). Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, 82, 23-74. 2015.
- BILLS, G. F., Christensen, M. A. R. T. H. A., Powell, M. A. R. T. H. A., & Thorn, G. R. E. G. Saprobic soil fungi. **Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods**, 271-302. 2004.
- BORMAN, A. M., Fraser, M., Szekely, A., Larcombe, D. E., & Johnson, E. M. Rapid identification of clinically relevant members of the genus *Exophiala* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and description of two novel species, *Exophiala campbellii* and *Exophiala lavatrina*. **Journal of clinical microbiology**, 55(4), 1162-1176. 2017.
- BOZOUDI, D., & Tsaltas, D. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. **Fermentation**, 4(4), 85. 2018.
- BLAIZE, M., Mayaux, J., Nabet, C., Lampros, A., Marcelin, A. G., Thellier, M., ... & Fekkar, A. Fatal invasive aspergillosis and coronavirus disease in an immunocompetent patient. **Emerging infectious diseases**, 26(7), 1636. 2020.
- BRUNNER, I., Fischer, M., Rüthi, J., Stierli, B., & Frey, B. Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. **PloS one**, 13(8), e0202047. 2018.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. A. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryotic cell**, v. 6,n. 12, p. 2169-2174, 2007.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42: 225-226, 1939.

CAVICCHIOLI, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., ... & Webster, N. S. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, 17(9), 569-586. 2019.

CHEN, K. H., Miadlikowska, J., Molnár, K., Arnold, A. E., U'Ren, J. M., Gaya, E., ... & Lutzoni, F. Phylogenetic analyses of eurotiomycetous endophytes reveal their close affinities to Chaetothyriales, Eurotiales, and a new order—Phaeomoniellales. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 85, 117-130. 2015.

CHOMNUNTI, P., Bhat, D. J., Jones, E. G., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. *Trichomeriaceae*, a new sooty mould family of Chaetothyriales. **Fungal Diversity**, 56(1), 63-76. 2012.

CHOWDHARY, A., Perfect, J., & de Hoog, G. S. Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 5(8), a019570. 2015.

CHYZHANSKA, N. & BEREGOVA, T. Effect of melanin isolated from Antarctic yeasts on preservation of pig livestock after ablactation. **Ukrainian Journal of Antarctica**, 2009.

CROUS, P. W., Cowan, D. A., Maggs-Kölling, G., Yilmaz, N., Larsson, E., Angelini, C., ... & Groenewald, J. Z. Fungal Planet description sheets: 1112–1181. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 45, 251-409. 2020.

CROUS, P. W., Shivas, R. G., Wingfield, M. J., Summerell, B. A., Rossman, A. Y., Alves, J. L., ... & Groenewald, J. Z. Fungal Planet description sheets: 128–153. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 29, 146. 2012.

CROUS, P. W., Schumacher, R. K., Akulov, A., Thangavel, R., Hernández-Restrepo, M., Carnegie, A. J., ... & Groenewald, J. Z. New and interesting fungi. 2. **Fungal Systematics and Evolution**, 3, 57. 2019.

CROUS, P. W., Wingfield, M. J., Schumacher, R. K., Summerell, B. A., Giraldo, A., Gené, J., ... & Groenewald, J. Z. Fungal Planet description sheets: 281–319. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 33, 212. 2014.

CUADROS-ORELLANA, S., Leite, L. R., Smith, A., Medeiros, J. D., Badotti, F., Fonseca, P. L., ... & Góes-Neto, A. Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. **Fungal Genomics & Biology**, 3(2), 1. 2013.

DAS, K., Lee, S. Y., & Jung, H. Y. *Cladophialophora lanosa* sp. nov., a New Species Isolated from Soil. **Mycobiology**, 47(2), 173-179. 2019.

DECOCK, C., Delgado-Rodríguez, G., Buchet, S., & Seng, J. M. A new species and three new combinations in *Cyphellophora*, with a note on the taxonomic affinities of the genus, and its relation to *Kumbhamaya* and *Pseudomicrodochium*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 84(3), 209–216. 2003.

DE FÁTIMA COSTA, F., da Silva, N. M., Voidaleski, M. F., Weiss, V. A., Moreno, L. F., Schneider, G. X., ... & Vicente, V. A. Environmental prospecting of black yeast-like agents of human disease using culture-independent methodology. **Scientific reports**, 10(1), 1-9. 2020.

DE HOOG, G. S. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, 63.2: 105-109. 1993.

DE HOOG, G. S., Zeng, J. S., Harrak, M. J., & Sutton, D. A. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie van Leeuwenhoek**, 90(3), 257-268. 2006.

DE HOOG, G. S., Vicente, V. A., Najafzadeh, M. J., Harrak, M. J., Badali, H., & Seyedmousavi, S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 27: 46. 2011.

DE HOOG, G. S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A. M. S., Figueras, M. J., & Vitale, R. G. Atlas of Clinical Fungi, 3rd e-edition. **Utrecht/Reus**. 2009.

DE HOOG, G. S. Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in unexplored habitats. **Fungal Diversity**, 65(1), 1–2. 2014.

DE SOUZA, D. M. G. & Lobato, E. Gleissolo Háplico. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_95_10112005101956.html>. Acesso em: 03 ago. 2021.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Fungi preservation in distilled water
Preservação de fungos em água destilada. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 6, p. 591-4, 2005.

DÖĞEN, A.; ILKIT, M.; DE HOOG, G. S. Black yeast habitat choices and species spectrum on high altitude creosote-treated railway ties. **Fungal biology**, v. 117, n. 10, p. 692-696, 2013.

DO NASCIMENTO, M. M. F. **Chaetothyriales: Biodiversity, Infective ability and Biotechnological Potential**. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2017.

DOSHIDA, J., Hasegawa, H., Onuki, H., & Shimidzu, N. Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. **The Journal of antibiotics**, 49(11), 1105- 1109. 1996.

DOS REIS, A. A.; de Paula Protásio, T., de Melo, I. C. N. A.; Trugilho, P. F. & Carneiro, A. D. C. O. Composição da madeira e do carvão vegetal de *Eucalyptus urophylla* em diferentes locais de plantio. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 32(71), 277. 2012.

DOS SANTOS, L. F., & Olivares, F. L. Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. **Current Plant Biology**, 100198. 2021.

DOS SANTOS, H. G., Zaroni, M. J., & Almeida, E. P. C. **Solos Tropicais: Argissolos**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONTAG01_7_2212200611538.html>. Acesso em: 06 set. 2020.

DRESCH, F.; DALLA LANA, D. F.; MACIEL, M. J. Avaliação das comunidades fúngicas encontradas em amostras de solo: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, 10.6: 67-76. 2019.

EBEAD, G. A., Overy, D. P., Berru , F., & Kerr, R. G. *Westerdykella reniformis* sp. nov., producing the antibiotic metabolites melinacidin IV and chetracin B. **IMA fungus**, 3(2), 189-201. 2012.

EL-SAWY, M., Mostafa, E. H., & Ismail, N. A. E. R. Secondary metabolites of the entomopathogenic fungus, *Cladosporium cladosporioides* and its relation to toxicity of cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glov.). **International Journal**, 5(1). 2019.

FENG, P., Lu, Q., Najafzadeh, M. J., van den Ende, A. G., Sun, J., Li, R., ... & De Hoog, G. S. Cyphellophora and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. **Fungal Diversity**, 65(1), 17-45. 2014.

FERNANDES, N. C., Nacif, D., Akiti, T., & Cuzzi, T. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora* sp.: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 49(2), 109-112. 2007.

FRANCO, Joceline. **Prospec o fitoquímica e análise e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* Fv Muell. Ex. Benth., myrtaceae**. Disserta o (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005.

FRAZILIO, D. A., de Almeida, O. G. G., de Oliveira, C. A. F., Lee, S. H. I., Corassin, C. H., Alves, V. F., & De Martinis, E. C. P. Metataxonomics contributes to unravel the microbiota of a Brazilian dairy. **Journal of Dairy Research**, 87(3), 360-363. 2020.

FU, M. S., & Casadevall, A. Divalent metal cations potentiate the predatory capacity of amoeba for *Cryptococcus neoformans*. **Applied and environmental microbiology**, 84(3), e01717-17. 2018.

GAO, L., Ma, Y., Zhao, W., Wei, Z., Gleason, M. L., Chen, H., ... & Zhang, R. Three new species of *Cyphellophora* (Chaetothyriales) associated with sooty blotch and flyspeck. **PLoS One**, 10(9), e0136857. 2015.

GAO, L., Sun, Y., He, C., Li, M., Zeng, T., & Lu, Q. INK128 Exhibits Synergy with Azoles against *Exophiala* spp. and *Fusarium* spp. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1658. 2016.

GARG, D., Muthu, V., Sehgal, I. S., Ramachandran, R., Kaur, H., Bhalla, A., ... & Agarwal, R. Coronavirus disease (Covid-19) associated mucormycosis (CAM): case report and systematic review of literature. **Mycopathologia**, 1-10. 2021.

GEISER, D. M., Gueidan, C., Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Kauff, F., Hofstetter, V., ... & Aptroot, A. (2006). Eurotiomycetes: eurotiomycetidae and chaetothyriomycetidae. **Mycologia**, 98(6), 1053-1064. 2006.

GEISER, D. M.; Lobuglio, K. F. & Gueidan, C. Pezizomycotina: Eurotiomycetes. In: **Systematics and Evolution**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 121-141. 2015.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and fungi. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 91-96, 2003.

GÓMEZ-MARÍN, A. M., NARANJO-FERNÁNDEZ, D., CAMPUZANO, O. I. M., & SUÁREZ, D. D. J. G. Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de *Bacillus* spp. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, 38(1), 55-61.

GORBUSHINA, Anna A. Life on the rocks. **Environmental microbiology** 9(7): 1613-1631. 2007.

GOSTINČAR, C., Zajc, J., Lenassi, M., Plemenitaš, A., de Hoog, S., Al-Hatmi, A. M., Gunde-Cimerman, N. Fungi between extremotolerance and opportunistic pathogenicity on humans. **Fungal Diversity**, 93, 356 195-213. 2018.

GOTTHARD, G. H., Bashford, A. R., Bsales, D. A., Golbitz, J. A., & Shear, R. Effects of cycloheximide on recent and remote appetitive odor discrimination memory in rats. **Learning and Motivation**, 72, 101670. 2020.

GOVERNO de São Paulo cria instituto de pesquisas ambientais para impulsionar políticas públicas ambientais no estado de SP. In: **Governo de São paulo cria instituto de pesquisas ambientais para impulsionar políticas públicas ambientais no estado de SP**. São Paulo, SP: Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 17 jun. 2021. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/2021/06/governo-de-sao-paulo-cria-instituto-de-pesquisas-ambientais-para-impulsionar-politicas-publicas-ambientais-no-estado-de-sp/>. Acesso em: 21 out. 2021.

GUEIDAN, C., Aptroot, A., da Silva Cáceres, M. E., Badali, H., & Stenroos, S. A reappraisal of orders and families within the subclass Chaetothyriomycetidae (Eurotiomycetes, Ascomycota). **Mycological Progress**, 13(4), 1027-1039. 2014.

GUEIDAN, C., Ruibal C., de Hoog G.S., Schneider, H. Rock-inhabiting fungi originated during periods of dry climate in the late Devonian and middle Triassic. **Fungal Biology**, 115:987–996. 2011.

GUEIDAN, C., Villaseñor, C. R., De Hoog, G. S., Gorbushina, A. A., Untereiner, W. A., & Lutzoni, F. A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. **Studies in Mycology**, 61, 111-119. 2008.

GUNDE-CIMERMAN, N., Zalar, P., de Hoog, S., & Plemenitaš, A. Hypersaline waters in salterns—natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS microbiology Ecology**, 32(3), 235-240. 2000.

HARSONOWATI, W., Marian, M., & Narisawa, K. The effectiveness of a dark septate endophytic fungus, *Cladophialophora chaetospira* SK51, to mitigate strawberry *Fusarium* wilt disease and with growth promotion activities. **Frontiers in microbiology**, 11, 585. 2020.

HARWOKO, H., Daletos, G., Stuhldreier, F., Lee, J., Wesselborg, S., Feldbrügge, M., ... & Proksch, P. Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum*. **Natural product research**, 35(2), 257-265. 2021.

- HASTUTY, A., Mairani, R., & Rosada, K. K. Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Culture Filtrates from *Schizophyllum commune*, *Coniothyrium* sp., and *Fusarium* sp. **Makara Journal of Science**, 24(2), 4. 2020.
- HAWKER, Lilian E. The physiology of reproduction in fungi. **Cambridge University Press**, 2016.
- HEIDRICH, D., González, G. M., Pagani, D. M., Ramírez-Castrillón, M., & Scroferneker, M. L. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. **Medical mycology case reports**, 16, 25-27. 2017.
- HEREDIA, G., Arias, R. M., Castañeda-Ruiz, R. F., & Minter, D. W. New species of *Lobatopedis* and *Minimelanolocus* (anamorphic fungi) from a Mexican cloud forest. **Nova Hedwigia**, 98(1-2), 31-40. 2014.
- HUMPHRIES, Z.; Seifert, K. A.; Hirooka, Y. & Visagie, C. M. A new family and genus in Dothideales for *Aureobasidium*-like species isolated from house dust. **IMA fungus**, 8(2), 299-315. 2017.
- HURST, C. J. Dirt and disease: the ecology of soil fungi and plant fungi that are infectious for vertebrates. In **Understanding terrestrial microbial communities** (pp. 289-405). Springer, Cham. 2019.
- ISLAM, T., Gupta, D. R., Surovy, M. Z., Mahmud, N. U., Mazlan, N., & Islam, T. Identification and application of a fungal biocontrol agent *Cladosporium cladosporioides* against *Bemisia tabaci*. **Biotechnology & biotechnological equipment**, 33(1), 1698-1705. 2019.
- ISMAIL, S. I., Batzer, J. C., Harrington, T. C., Crous, P. W., Lavrov, D. V., Li, H., & Gleason, M. L. Ancestral state reconstruction infers phytopathogenic origins of sooty blotch and flyspeck fungi on apple. **Mycologia**, 108(2). 2016.
- ISOLA, D., Zucconi, L., Onofri, S., Caneva, G., De Hoog, G. S., & Selbmann, L. Extremotolerant rock inhabiting black fungi from Italian monumental sites. **Fungal Diversity**, 76(1), 75-96. 2016.
- JAKOVLJEVIĆ, V. D., & Vrvić, M. M. Potential of pure and mixed cultures of *Cladosporium cladosporioides* and *Geotrichum candidum* for application in bioremediation and detergent industry. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, 25(3), 529-536. 2018.
- JIMU, L., Kemler, M., Mujuru, L., & Mwenje, E. Illumina DNA metabarcoding of *Eucalyptus* plantation soil reveals the presence of mycorrhizal and pathogenic fungi. **Forestry: An International Journal of Forest Research**, 91(2), 238-245. 2017.
- JOHNSON, Edwin A. An improved slide culture technique for the study and identification of pathogenic fungi. **Journal of bacteriology**, v. 51, n. 6, p. 689-694, 1946.
- JUNIOR, M. G., Novack, K. M., Botaro, V. R., Protásio, T. D. P., & Couto, A. M. Caracterização físico-química de fibra e polpas de *Bambusa vulgaris* Schrad para utilização em compósitos poliméricos. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, 33(1),

33-42. 2013.

KEVBRIN, Vadim V. Isolation and cultivation of alkaliphiles. In: Mamo G., Mattiasson B. (eds) Alkaliphiles in Biotechnology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, vol 172. 1-32. 2019.

KHAN, A., Williams, K. L., & Nevalainen, H. K. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. **Biocontrol**, 51(5), 643-658, 2006.

KHARWAR, R. N., & Singh, R. K. Additions to the hyphomycete genus *Veronaea* as phytoparasitic species. **Microbiological Research**, 159(2), 103-111. 2004.

KÖHLER, J. R., Casadevall, A., & Perfect, J. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 5(1), a019273. 2015.

LIAN, X.; De Hoog, G. S. Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection. **Medical mycology**, v. 48, n. 4, p. 622-628, 2010.

LI, G. J., Hyde, K. D., Zhao, R. L., Hongsanan, S., Abdel-Aziz, F. A., Abdel-Wahab, M. A., ... & Baghela, A. Fungal diversity notes 253–366: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. **Fungal diversity**, 78(1), 1-237. 2016.

LI, T., Liu, M. J., Zhang, X. T., Zhang, H. B., Sha, T., & Zhao, Z. W. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. **Science of the Total Environment**, 409(6), 1069-1074. 2011.

LIN, J., Wang, R., Xu, G., Ding, Z., Zhu, X., Li, E., & Liu, L. Two new polyketides from the ascomycete fungus *Leptosphaeria* sp. **The Journal of antibiotics**, 70(6), 743-746. 2017.

LIU, X. Y., Udayanga, D., Luo, Z. L., Chen, L. J., Zhou, D. Q., Su, H. Y., & Hyde, K. D. Backbone tree for Chaetothyriales with four new species of *Minimelanolocus* from aquatic habitats. **Fungal biology**, 119(11), 1046-1062. 2015.

LLORENTE, C., Bárcena, A., Bahima, J. V., Saparrat, M. C., Arambarri, A. M., Rozas, M.F., ... & Balatti, P. A. *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 produces the 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin-like compound and carries a putative pks gene. **Mycopathologia**, 174(5), 397-408. 2012.

LOZUPONE, C.; Knight, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, 71.12: 8228-8235, 2005.

LOZUPONE, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, 73.5: 1576-1585, 2007.

MA, M., de Silva, D. D., & Taylor, P. W. Black mould of post-harvest tomato (*Solanum lycopersicum*) caused by *Cladosporium cladosporioides* in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, 15(1), 1-4. 2020.

MCDONALD, M. C., Ahren, D., Simpfendorfer, S., Milgate, A., & Solomon, P. S. The

discovery of the virulence gene ToxA in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular plant pathology*, 19(2), 432-439. 2018.

MARCHESI, J. R.; Ravel, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31, 2015.

MARIN-FELIX, Y. Stchigel, A. M., Cano-Lira, J. F., Sanchis, M., Mayayo, E., & Guarro, J. . *Emmonsiiellopsis*, a new genus related to the thermally dimorphic fungi of the family *Ajellomycetaceae*. *Mycoses*, v. 58, n. 8, p. 451-460, 2015.

MAZZAROLO, L. A. **Conceitos básicos de sistemática filogenética**. Salvador: UFBA. 24p. Apostila do Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia, Museu de Zoologia. 2005.

MOCHIZUKI, K., Nishida, T., Murata, K., Ishida, K., Sunada, A., Asari, S., ... & Tanaka, K. *Rousoella solani* causing keratomycosis, with an observed both sexual and asexual morphs. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 23(9), 651-654. 2017.

MOREIRA, D. C.; Oliveira, M. M. E., Borba, C. M. Human pathogenic *Paecilomyces* from food. *Microorganisms*, v. 6, n. 3, p. 64, 2018.

MORENO, L. F., Vicente, V. A., De Hoog, S. Black yeasts in the omics era: Achievements and challenges. **Medical mycology**, 2018.

MUGGIA, L., Fleischhacker, A., Kopun, T., e Grube, M. Extremotolerant fungi from alpine rock lichens and their phylogenetic relationships. **Fungal Diversity**, 76, 119. 2016.

MUGGIA, L., Quan, Y., Gueidan, C., Al-Hatmi, A. M., Grube, M., & de Hoog, S. Sequence data from isolated lichen-associated melanized fungi enhance delimitation of two new lineages within Chaetothyriomycetidae. **Mycological Progress**, 20(7), 911-927. 2021.

MUNCHAN C., Kurata O., Wada S., Hatai K., Sano A., Kamei K. & Nakaoka N. *Exophiala xenobiotica* infection in cultured striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), in Japan. **Journal of Fish Diseases** 32, 893–900. 2009.

NAJAFZADEH, M. J., Suh, M. K., Lee, M. H., Ha, G. Y., Kim, J. R., Kim, T. H., ... & De Hoog, G. S. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala equina*, with susceptibility to eight antifungal drugs. **Journal of medical microbiology**, 62(5), 797-800. 2013.

NASCIMENTO, M. M., Selbmann, L., Sharifynia, S., Al-Hatmi, A. M., Voglmayr, H., Vicente, V. A., ... & Almaghrabi, O. A. *Arthrocladium*, an unexpected human opportunist in *Trichomeriaceae* (Chaetothyriales). **Fungal biology**, 2016, 120(2), 207-218.

NEVALAINEN, H. **Grandes Desafios em Biotecnologia Fúngica**. Springer. 2020.

NICOLÁS, F. E., Murcia, L., Navarro, E., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., & Garre, V. Mucorales species and macrophages. **Journal of Fungi**, 6(2), 94. 2020.

NUGENT, L. K., Sangvichen, E. K., Sihanonth, P., Ruchikachorn, N., & Whalley, A. J. A

revised method for the observation of conidiogenous structures in fungi. **Mycologist**, 20(3), 111-114. 2006.

OGAWA, M. M., Peternelli, M. P., Enokihara, M. M., Nishikaku, A. S., Gonçalves, S. S., & Tomimori, J. Spectral manifestation of melanized fungal infections in kidney transplant recipients: report of six cases. **Mycopathologia**, 181(5), 379-385. 2016.

OLIVEIRA, H. M. S.; DE FARIAS, R. J.; DE HOLANDA, R. A.; LIMA, D. M.; MORAES, R. C. B.; NEVES, R. P.; FILHO, A. M. L.; MAGALHÃES, O. M. C. Cromomicose por *Fonsecaea pedrosoi*: um caso crônico de 20 anos. In: cromomicose por *fonsecaea pedrosoi*: um caso crônico de 20 anos. ResumoID: 73-2. **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Disponível em: <<https://www.sbmicrobiologia.org.br/25cbm-anais/resumos/R0073-2.html>>. Acesso em: 15 out. 2021.

PANG, K. L., Guo, S. Y., Chen, I. A., Burgaud, G., Luo, Z. H., Dahms, H. U., ... & Cha, H. J. Insights into fungal diversity of a shallow-water hydrothermal vent field at Kueishan Island, Taiwan by culture-based and metabarcoding analyses. **PloS one**, 14(12), e0226616. 2019.

PAPENDORF, M. C. Notes on *Veronaea* including *V. compacti* sp. nov. **Bothalia**, 12(1), 119-121. 1976.

PEDREGOSA, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... & Vanderplas, J. Scikit-learn: Machine learning in Python. **the Journal of machine Learning research**, v. 12, p. 2825-2830, 2011.

PÉREZ-JARAMILLO, J. E.; MENDES, R.; RAAIJMAKERS, J. M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant molecular biology**, 90.6: 635-644. 2016.

PIETRO-SOUZA, W., de Campos Pereira, F., Mello, I. S., Stachack, F. F. F., Terezo, A. J., da Cunha, C. N., ... & Soares, M. A. Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. **Chemosphere**, 240, 124874. 2020.

POLAK, Annemarie. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. **Mycoses**, 33.5: 215-224, 1990.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X., Summerbell, R., & de Hoog, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard?. **FEMS microbiology reviews**, 30(1), 109-130. 2006.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X., Vervoort, J., Grotenhuis, J. T. C., & Van Groenestijn, J. W. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(6), 2660-2665. 2002.

PUKALSKI, J., Marcol, N., Wolan, N., Płonka, P. M., Ryszka, P., Kowalski, T., & Latowski, D. Detection of a pheomelanin-like pigment by EPR spectroscopy in the mycelium of *Plenodomus biglobosus*. **Acta Biochimica Polonica**, 67(3), 295-301. 2020.

QOSTAL, S., Kribel, S., Chliyeh, M., Selmaoui, K., Touhami, A. O., Serghat, S., ... &

Douira, A. *Curvularia spicifera*, a parasite of the fungal complex of root rot of wheat and barley in Morocco. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**. 20(9-10), 354-365. 2019.

QUAN, Y., Ahmed, S. A., Menezes da Silva, N., Al-Hatmi, A. M. S., Mayer, V. E., Deng, S., ... Shi, D. Novel black yeast-like species in Chaetothyriales with ant-associated lifestyles. **Fungal Biology**. 2021.

QUAN, Y., Muggia, L., Moreno, L. F., Wang, M., Al-Hatmi, A. M., da Silva Menezes, N., ... & de Hoog, S. A re-evaluation of the Chaetothyriales using criteria of comparative biology. **Fungal Diversity**, 103(1), 47-85. 2020.

RAGHUKUMAR, Seshagiri. Fungi: Characteristics and classification. In: **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems**. Springer, Cham. p. 1-15. 2017.

RAJA, Huzefa A.; OBERLIES, Nicholas H.; STADLER, Marc. Occasional comment: Fungal identification to species-level can be challenging. **Phytochemistry**. 2021.

ŘEHULKA, J.; KOLAŘÍK, M.; HUBKA, V. Disseminated infection due to *Exophiala pisciphila* in Cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*. **Journal of fish diseases**, 40.8: 1015-1024, 2017.

REIS, C.M., Zanchetta, D. & Pontalti, S.F.L. Plano de manejo da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade. **Secretaria do Meio Ambiente**, Instituto Florestal, São Paulo, 2005.

SAFDAR, Amar. Progressive cutaneous hyalohyphomycosis due to *Paecilomyces lilacinus*: rapid response to treatment with caspofungin and itraconazole. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 10, p. 1415-1417, 2002.

RIDDELI, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, 42(2), 265-270. 1950.

SALAMONI, Adriana Tourinho. **Apostila de aulas teóricas de fisiologia vegetal**. cap. A água, as células e a planta, p. 2-4. 2008. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4086253/mod_resource/content/1/Apostila%20-%20Fisiologia%20Vegetal.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2021.

SAMANTA, Indranil. General Characteristics of Fungi. **Veterinary Mycology**. Springer, New Delhi, 3-8. 2015.

SÁNCHEZ, R. M., Miller Andrew, N., & Bianchinotti, M. V. New species of *Capronia* (*Herpotrichiellaceae*, Ascomycota) from Patagonian forests, Argentina. **Plant and Fungal Systematics**. 2019.

SATOW, M. M., Attili-Angelis, D., De Hoog, G. S., Angelis, D. F., & Vicente, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, 61: 157-163. 2008.

SCHUMACHER, J. & Gorbushina, A. A. Light sensing in plant-and rock-associated black fungi. **Fungal biology**, 124.5: 407-417. 2020.

SCHOCH, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., ... & Karsch-Mizrachi, I. NCBI Taxonomy: a comprehensive uBDAtE on curation, resources and tools. **Database**, 2020.

SCHOCH, C. L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., ... & Federhen, S. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. **Database**, 2014.

SCHOCH, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W., & Crous, P. W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, 98(6), 1041-1052. 2006.

SINGH, S., Rudramurthy, S. M., Padhye, A. A., Hemashetter, B. M., Iyer, R., Hallur, V., ... & Kaur, H. Clinical Spectrum, Molecular Characterization, Antifungal Susceptibility Testing of *Exophiala* spp. From India and Description of a Novel *Exophiala* Species, *E. arunalokei* sp. nov. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 11. 2021.

SPANO, M., Zuliani, D., Peano, A., & Bertazzolo, W. *Cladosporium cladosporioides* - complex infection in a mixed-breed dog. **Veterinary Clinical Pathology**, 47(1), 150–153. 2018.

STERFLINGER, Katja. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 501-514. 2006.

STERNE, J. A., Murthy, S., Diaz, J. V., Slutsky, A. S., Villar, J., Angus, D. C., ... & Marshall, J. C. Association between administration of systemic corticosteroids and mortality among critically ill patients with COVID-19: a meta-analysis. **Jama**, 324(13), 1330-1341. 2020.

SUE, P. K., Gurda, G. T., Lee, R., Watkins, T., Green, R., Memon, W., ... & Zhang, S. X. First report of *Westerdykella dispersa* as a cause of an angioinvasive fungal infection in a neutropenic host. **Journal of clinical microbiology**, 52(12), 4407-4411. 2014.

SUGHAYER, M., DeGirolami, P. C., Khettry, U., Korzeniowski, D., Grumney, A., Pasarell, L., & McGinnis, M. R. Human Infection Caused by *Exophiala pisciphila*: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases**, 13(3), 379–382. 1991.

SUN, W., Liu, B., Fu, R., Liu, X., & Xiang, M. Two new rock-inhabiting species of *Cyphellophora* from karst habitats in China. **Phytotaxa**, 397(1), 23. 2019.

SUN, W., Su, L., Yang, S., Sun, J., Liu, B., Fu, R., ... & Xiang, M. Unveiling the Hidden Diversity of Rock-Inhabiting Fungi: Chaetothyriales from China. **Journal of Fungi**, 6(4), 187. 2020.

SUTTON, B. C.; CAMPBELL, C. K.; GOLDSCHMIED-REOUVEN, A. *Pseudomicrodochium fusarioides* sp. nov., isolated from human bronchial fluid. **Mycopathologia**, 1991, 114.3: 159-161.

TEIXEIRA, M. D. M., Moreno, L. F., Stielow, B. J., Muszewska, A., Hainaut, M., Gonzaga, L., ... & Young, S. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives

(Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in mycology**, 86, 1-28. 2017.

TAMURA, K., & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, 10(3), 512-526. 1993.

TAN, Y., Guo, Z., Zhu, M., Shi, J., Li, W., Jiao, R., ... & Ge, H. Anti-inflammatory spirobisnaphthalene natural products from a plant-derived endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. **Chinese Chemical Letters**, 31(6), 1406-1409. 2020.

TELZEROW, A., Paris, J., Håkansson, M., González-Sabín, J., Ríos-Lombardía, N., Schürmann, M., ... & Steiner, K. Amine Transaminase from *Exophiala xenobiotica*—Crystal Structure and Engineering of a Fold IV Transaminase that Naturally Converts Biaryl Ketones. **ACS Catalysis**, 9(2), 1140-1148. 2018.

TESEI, D., Tafer, H., Poyntner, C., Piñar, G., Lopandic, K., & Sterflinger, K. Draft genome sequences of the black rock fungus *Knufia petricola* and its spontaneous nonmelanized mutant. **Genome announcements**, 5(44), e01242-17. 2017.

TORRES, D. E., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Guevara-Fefer, P., Márquez-Guzmán, G. J., & Pérez-Martínez, C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. **PloS one**, 12(1), 2017.

TRAN-CONG, N. M., Mándi, A., Király, S. B., Kurtán, T., Lin, W., Liu, Z., & Proksch, P. (2020). Furoic acid derivatives from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp. *Chirality*, 32(5), 605-610. 2020.

VAN DER HEIJDEN, M. G.; M. G., De Bruin, S., Luckerhoff, L., Van Logtestijn, R. S., & Schlaeppli, K. A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. **The ISME Journal**, v. 10, n. 2, p. 389–399, 2016.

VELÁZQUEZ-JIMÉNEZ, Y., Hernández-Castro, R., Romero-Romero, L., Salas-Garrido, C. G., & Martínez-Chavarría, L. C. Feline phaeohyphomycotic cerebellitis caused by *Cladosporium cladosporioides*-complex: Case report and review of literature. **Journal of Comparative Pathology**, 170, 78–85. 2019.

VICENTE, V. A., Angelis, D. A. D., Queiróz-Telles Filho, F., & Pizzirani-Kleiner, A. A. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32.1: 47-51. 2001.

VICENTE, V. A., Attili-Angelis, D., Pie, M. R., Queiroz-Telles, F., Cruz, L. M., Najafzadeh, M. J., ... & Pizzirani-Kleiner, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, 61: 137-144. 2008.

VICENTE, V. A., Najafzadeh, M. J., Sun, J., Gomes, R. R., Robl, D., Marques, S. G., ... & De Hoog, G. S. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal diversity**, 65(1), 47-63. 2013.

VICENTE, V. A., Weiss, V. A., Bombassaro, A., Moreno, L. F., Costa, F. F., Raittz, R. T., ... & de Castro, R. J. Comparative genomics of sibling species of *Fonsecaea* associated with

human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1924. 2017.

VIEIRA, M. R., Milheiro, A., & Pacheco, F. A. Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. **Sabouraudia**, 39(1), 135-137. 2001.

VORONEY, P.; Sharpe, P. (ed.) Horse Pasture Management. **Academic Press**, 65-79. 2018.

XU, R., Li, T., Shen, M., Yang, Z. L., & Zhao, Z. W. Evidence for a dark septate endophyte (*Exophiala pisciphila*, H93) enhancing phosphorus absorption by maize seedlings. **Plant and Soil**, 452, 249-266. 2020.

WAGENAAR, M. M., Corwin, J., Strobel, G., & Clardy, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. **Journal of Natural Products**, 63(12), 1692-1695. 2000.

WAN, Y. L., Bao, D. F., Luo, Z. L., Bhat, D. J., Xu, Y. X., Su, H. Y., & Hao, Y. E. Two new species of *Minimelanolocus* (*Herpotrichiellaceae*, Chaetothyriales) from submerged wood in Yunnan, China. **Phytotaxa**, 480(1), 45-56. 2021.

WANG, Y., Xu, L., Gu, Y. Q., & Coleman-Derr, D. MetaCoMET: a web platform for discovery and visualization of the core microbiome. **Bioinformatics**, 32(22), 3469-3470, 2016.

WANG, G. N., Yu, X. D., Dong, W., Bhat, D. J., Boonmee, S., Zhang, D., &

ZHANG, H. Freshwater hyphomycetes in Eurotiomycetes: a new species of *Minimelanolocus* and a new collection of *Thysanorea papuana* (*Herpotrichiellaceae*). *Mycological Progress*, 18(4), 511-522, 2019.

WEISS, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., ... & Hyde, E. R. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, 5(1), 27. 2017.

WENDEROTH, M., Pinecker, C., Voß, B., & Fischer, R. Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. **Fungal Genetics and Biology**, 101, 55-60. 2017.

WIJAYAWARDENE, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L. K. T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., ... & Deng, C. Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, 11(1), 1060-1456. 2020.

WUBS, E. R. State of knowledge of soil biodiversity-Status, challenges and potentialities. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2020.

WU, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, 10(3), 127-140. 2019.

YANG, H., Hyde, K. D., Karunarathna, S. C., Deng, C., Gu, C. H., Yang, S. A., & Zhang, Z. C. New species of *Camptophora* and *Cyphellophora* from China, and first report of sexual morphs for these genera. **Phytotaxa**, 343(2), 149-159. 2018.

- YANG, H., Chomnunti, P., Ariyawansa, H. A., Wu, H. X., & Hyde, K. D. The genus *Phaeosaccardinula* (Chaetothyriales) from Yunnan, China, introducing two new species. **Chaing Mai J Sci**, 41, 873-884. 2014.
- YANG, G. Z., Lu, J., Yu, Z., Zhang, K., & Qiao, M. (2011). *Uncispora sinensis*, a newspecies from China. **Mycotaxon**, 116(1). 2011.
- YEHIA, R. S., Osman, G. H., Assaggaf, H., Salem, R., & Mohamed, M. S. M. Isolation of potential antimicrobial metabolites from endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* from endemic plant *Zygophyllum mandavillei*. **South African Journal of Botany**. 2020.
- ZHAN, F., He, Y., Li, T., Yang, Y. Y., Toor, G. S., & Zhao, Z. Tolerance and antioxidant response of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*, to cadmium stress. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 94(1), 96-102. 2015.
- ZHANG, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., & Hyde, K. D. Pleosporales. **Fungal diversity**, 53(1), 1-221. 2012.
- ZHANG, K., Fu, H.-B., & Zhang, X.-G. Taxonomic studies of *Minimelanolocus* from Yunnan, China. **Mycotaxon**, 109(1), 95–101. 2009.
- ZHANG, C., Sirijovski, N., Adler, L., & Ferrari, B. C. *Exophiala macquariensis* sp. nov., a cold adapted black yeast species recovered from a hydrocarbon contaminated sub-Antarctic soil. **Fungal Biology**. 2018.
- ZHANG, R., Yang, H., Sun, G., Li, H., Zhuang, J., Zhai, X., & Gleason, M. L. (2009). *Strelitziana mali*, a new species causing sooty blotch on apple fruit. **Mycotaxon**, 110(1), 477-485. 2009.
- ZHAO, J., Zeng, J., De Hoog, G. S., Attili-Angelis, D. & Prenafeta-Boldú, F. X. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. **Microbial ecology**, 60(1), 149-156. 2010.
- ZHOU, Ying-Ke, SHEN, Xiao-Ye, HOU & Cheng-Lin. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi from fishscale bamboo (*Phyllostachys heteroclada*) in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33.6: 104. 2017.
- ZILBERMAN, D., Gordon, B., Hochman, G., & Wesseler, J. Economics of sustainable development and the bioeconomy. **Applied Economic Perspectives and Policy**, 40(1), 22-37. 2018.
- ZURL, C., Hoenigl, M., Schulz, E., Hatzl, S., Gorkiewicz, G., Krause, R., ... & Prattes, J. Autopsy proven pulmonary mucormycosis due to *Rhizopus microsporus* in a critically ill COVID-19 patient with underlying hematological malignancy. **Journal of Fungi**, 7(2), 88. 2021.

ANEXOS

ANEXO I

Quadro com metadados

amostra	tipo de amostra	vegetal	setor			tipo de solo
#q2.types	categórico	categórico	categórico			categórico
ET91R	Solo rizosférico	Eucalipto	nãorte			Latossolo Vermelho-amarelo distrófico
ET4AR	Solo rizosférico	Eucalipto	leste			Argissolo Vermelho Eutrófico
BA1R	Solo rizosférico	Bambu	central			Gleissolo Háptico Tb Distrófico
ET58R	Solo rizosférico	Eucalipto	oeste			Argissolo Vermelho Eutrófico
ET29R	Solo rizosférico	Eucalipto	sul			Argissolo Vermelho Eutrófico
BA2R	Solo rizosférico	Bambu	central			Gleissolo Háptico Tb Distrófico
BA1C	Córtex vegetal	Bambu	central			Gleissolo Háptico Tb Distrófico
ET91C	Córtex vegetal	Eucalipto	nãorte			Latossolo Vermelho-amarelo distrófico
ET4AC	Córtex vegetal	Eucalipto	leste			Argissolo Vermelho Eutrófico
ET58C	Córtex vegetal	Eucalipto	oeste			Argissolo Vermelho Eutrófico
ET29C	Córtex vegetal	Eucalipto	sul			Argissolo Vermelho Eutrófico
BA2C	Córtex vegetal	Bambu	central			Gleissolo Háptico Tb Distrófico
textura de solo	fertilidade de solo	dia	mês	ano	plântio misto	proximidade de drenagem de água
categórico	categórico	numérico	numérico	numérico	categórico	categórico
Média a argilosa	Baixa fertilidade	2	8	2019	sim	sim
Argilosa	Alta fertilidade	2	8	2019	sim	não
Média a argilosa	Baixa fertilidade	2	8	2019	sim	sim
Argilosa	Alta fertilidade	2	8	2019	não	sim
Argilosa	Alta fertilidade	2	8	2019	sim	não
Textura média a arenosa	Baixa fertilidade	2	8	2019	não	não
Textura média a arenosa	Baixa fertilidade	2 e 19	8 e 2	2020	sim	sim
Média a argilosa	Baixa fertilidade	3 e 19	9 e 2	2020	sim	sim
Argilosa	Alta fertilidade	4 e 19	10 e 2	2020	sim	não
Argilosa	Alta fertilidade	5 e 19	11 e 2	2020	não	sim
Argilosa	Alta fertilidade	6 e 19	12 e 2	2020	não	não
Textura média a arenosa	Baixa fertilidade	2	8	2019	não	não
interface com o ambiente urbano	interface com rodovia	interface com afloramento rochoso			zona de uso conflitante	
categórico	categórico	categórico			categórico	
não	não	não			não	
não	sim	não			não	
não	não	não			não	
sim	sim	não			não	
não	não	sim			sim	
não	não	não			não	
não	não	não			não	
não	sim	não			não	
sim	sim	não			não	
não	não	sim			sim	
não	não	não			não	

interface com monocultura	apiário	proximidade com o DAAE	proximidade com o lago	zona de conservação
categórico	categórico	categórico	categórico	categórico
não	sim	não	não	sim
não	sim	não	não	não
não	não	não	sim	sim
não	não	sim	não	não
sim	sim	não	não	não
não	não	não	sim	não
não	não	não	sim	sim
não	sim	não	não	sim
não	sim	não	não	não
não	não	sim	não	não
sim	sim	não	não	não
não	não	não	sim	não

zona de recuperação	zona histórico-cultural	zona de manejo florestal	árvores menos espessas	zona de uso público
categórico	categórico	categórico	categórico	categórico
sim	sim	não	não	não
não	sim	não	não	não
não	sim	não	não	sim
não	sim	não	não	não
não	não	sim	sim	não
não	sim	não	não	sim
não	sim	não	não	sim
sim	sim	não	não	não
não	sim	não	não	não
não	sim	não	não	não
não	não	sim	sim	não
não	sim	não	não	sim

APP	proximidade com a PREMA	proximidade com o Arboreto	bambu gigante nos arredores	proximidade com a antiga ETA
categórico	categórico	categórico	categórico	categórico
não	não	não	não	não
não	não	não	não	não
sim	não	não	não	sim
sim	sim	não	não	não
não	não	não	não	não
sim	não	sim	sim	não
sim	não	não	não	sim
não	não	não	não	não
não	não	não	não	não
sim	sim	não	não	não
não	não	não	não	não
sim	não	sim	sim	não

drenagem do curso d'água categórico	proximidade a torre de radio/TV categórico	presença significativa de árvores nativas categórico	região ciliar categórico	delimitação exclusiva de bambu imperial categórico
não	não	sim	não	não
não	não	sim	não	não
sim	não	não	sim	não
não	não	sim	não	não
não	sim	não	não	não
não	não	não	não	sim
sim	não	não	sim	não
não	não	sim	não	não
não	não	sim	não	não
não	não	sim	não	não
não	sim	não	não	não
não	não	não	não	sim

ANEXO II

```

## seleccione o diretorio com a funcao 'setwd'

setwd("C:/Users/Bruno Lustosa/Desktop/Metagenoma_Duda/analise_anterior_Duda/old_results")

### baixe as bibliotecas que precisa

if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")

if (!requireNamespace("devtools", quietly = TRUE)){install.packages("devtools")}

devtools::install_github("jbisanz/qiime2R")
BiocManager::install("phyloseq", force = T)
BiocManager::install("dplyr", force = T)
BiocManager::install("tidyverse", force = T)

install.packages("gplots")
install.packages("permute")
install.packages("RColorBrewer")
install.packages("picante")
install.packages("tidyr")

devtools::install_github("adw96/breakaway")
devtools::install_github(repo = "UVic-omics/selbal")
BiocManager::install("Heatplus")
BiocManager::install("microbiome")
BiocManager::install("DESeq2")
BiocManager::install("ALDEx2")
BiocManager::install("metagenomeSeq")
BiocManager::install("HMP")
BiocManager::install("dendextend")
BiocManager::install("selbal")
BiocManager::install("rms")
BiocManager::install("breakaway")

### chame as biblioteca

library(qiime2R)
library(phyloseq)
library(dplyr)
library(tidyverse)
library(ggplot2)
library(gplots)
library(ape)
library(permute)
library(lattice)
library(vegan)
library(Heatplus)

library(BiocManager)
library(BiocVersion)
library(Biobase)
library(biomformat)
library(devtools)

library(picante)
library(microbiome)
library(DESeq2)

```

```

library(ALDEx2)
library(metagenomeSeq)
library(HMP)
library(dendextend)
library(selbal)
library(rms)
library(breakaway)

# 1 - ler arquivo table.qza

ITS_SP<-read_qza("Results/table.qza")
ITS_SP$data

### confirme que deu certo
names(ITS_SP)
ITS_SP$data[1:5,1:5] # primeiros 5 nomes

ITS_SP$uid
ITS_SP$type
ITS_SP$content
print_provenance(ITS_SP)

#2 ler arquivo metadata.tsv

metadata<-read_q2metadata("metadata_SP.tsv")

# confirme que deu certo, a classe do arquivo deve ser data.frame

head(metadata)
class(metadata)

# tabela

metadata[,1]->sampleID
metadata[,2]->Descriptor
metadata[,3]->sample_type
metadata[,4]->vegetal
metadata[,5]->setor
metadata[,6]->soil_type
metadata[,7]->soil_texture
metadata[,8]->soil_fertility
metadata[,9]->day
metadata[,10]->month
metadata[,11]->year
metadata[,12]->mixed_planting
metadata[,13]->water_drainage_proximity
metadata[,14]->periurbano
metadata[,15]->interface_with_road
metadata[,16]->rock_outcrop_interface
metadata[,17]->conflicting_use_zone
metadata[,18]->sugar_cane
metadata[,19]->apiary
metadata[,20]->sewage_pipeline
metadata[,21]->proximity_to_the_lake
metadata[,22]->conservation
metadata[,23]->recovery
metadata[,24]->historical_cultural
metadata[,25]->forest_management

```

```

metadata[,26]->thinnin_trees
metadata[,27]->public_use
metadata[,28]->APP
metadata[,29]->proximity_to_Prema
metadata[,30]->proximity_to_the_Arboretum
metadata[,31]->giant_bamboo_in_the_surroundings
metadata[,32]->deactivated_water_treatment_plant
metadata[,33]->drainage_area_of_the_lakes_watercours
metadata[,34]->proximity_to_radio_tower
metadata[,35]->native_forest
metadata[,36]->Santo_Antonio_River
metadata[,37]->imperial_bamboo

```

```
#3 ler arquivo taxonomy.qza
```

```

taxonomy<-read_qza("Results/taxonomy.qza")
head(taxonomy$data)

```

```

taxonomy.ti<-parse_taxonomy(taxonomy$data)
head(taxonomy.ti)
taxonomy.ti$Family

```

```
#crie o file phyloseq
```

```

physeq<-qza_to_phyloseq(features = "Results/table.qza",
                        tree = "Results/rooted-tree.qza",
                        "Results/taxonomy.qza",
                        metadata = "metadata_SP.tsv")

```

```

class(physeq)
help("qza_to_phyloseq")

```

```

# phyloseq-class experiment-level object
# otu_table() OTU Table: [ 3104 taxa and 12 samples ]
# sample_data() Sample Data: [ 12 samples by 35 sample variables ]
# tax_table() Taxonomy Table: [ 3104 taxa by 7 taxonomic ranks ]
# phy_tree() Phylogenetic Tree: [ 3104 tips and 3097 internal nodes ]

```

```
##crias figuras com alfa diversidade
```

```

library(tidyverse)
library(qiime2R)

```

```

metadata<-read_q2metadata("metadata_SP.tsv")
shannon<-read_qza("core-metrics-results/shannon_vector.qza")

```

```
shannon<-shannon$data %>% rownames_to_column("SampleID") # this moves the sample names to a new column that matches the metadata and allows them to be merged
```

```
## verifique se todas as amostras tem alfa diversidade
```

```
gplots::venn(list(metadata=metadata$SampleID, shannon=shannon$SampleID))
```

```
## se alguma amostra se perdeu vamos remove-la da analise
```

```

metadata<-
  metadata %>%

```

```

left_join(shannon)
head(metadata)
metadata[,38]->shanon_ya

### veja que adicionamos na nossa metadata o vaor de shannon

metadata %>%
  filter(!is.na(shannon)) %>%
  ggplot(aes(x=metadata$month, y=metadata$shannon_entropy, color=metadata$soil_type)) +
  stat_summary(geom="errorbar", fun.data=mean_se, width=0) +
  stat_summary(geom="line", fun.data=mean_se) +
  stat_summary(geom="point", fun.data=mean_se) +
  xlab("Days") +
  ylab("Shannon Diversity") +
  theme_q2r() + # try other themes like theme_bw() or theme_classic()
  scale_color_viridis_d(name="Soil Type") # use different color scale which is color blind friendly

##### foi o grafico assim

metadata %>%
  filter(!is.na(shannon)) %>%
  ggplot(aes(x=soil_type, y=shanon_ya, fill=soil_type)) +
  stat_summary(geom="bar", fun.data=mean_se, color="black") + #here black is the outline for the bars
  geom_jitter(shape=21, width=0.2, height=0) +
  coord_cartesian(ylim=c(2,7)) + # adjust y-axis
  facet_grid(~`setor`) + # create a panel for each body site
  xlab("month") +
  ylab("Shannon Diversity") +
  theme_q2r() +
  scale_fill_manual(values=c("cornflowerblue","indianred")) + #specify custom colors
  theme(legend.position="none") #remove the legend as it isn't needed

##### outro tipo de analise

##### Plotting PCoA

library(tidyverse)
library(qiime2R)
library(ggplot2)

metadata<-read_q2metadata("metadata_SP.tsv")
uwunifrac<-read_qza("core-metrics-results/unweighted_unifrac_pcoa_results.qza")
shannon<-read_qza("core-metrics-results/shannon_vector.qza")$data %>% rownames_to_column("SampleID")
PCoA_analysis<-uwunifrac$data$Vectors %>% select(SampleID, PC1, PC2) %>%
  left_join(metadata) %>% left_join(shannon)

head(PCoA_analysis)
class(PCoA_analysis)

PCoA_analysis[,2]->PC1
PCoA_analysis[,3]->PC2
PCoA_analysis[,4]->Descriptor
PCoA_analysis[,5]->sample_type
PCoA_analysis[,6]->vegetal
PCoA_analysis[,7]->setor
PCoA_analysis[,8]->soil_type
PCoA_analysis[,9]->soil_texture
PCoA_analysis[,10]->soil_fertility
PCoA_analysis[,40]->shannon_entropy

```

```

plot(PC1, PC2)
PCoA<-PC1*PC2
plot(PCoA)
shapiro.test(PCoA)
help("ggplot")

##analise eestatistica shannon
analise1<-aov(lm(shannon_entropy~sample_type))
analise2<-aov(lm(shannon_entropy~vegetal))
analise3<-aov(lm(shannon_entropy~soil_type))
analise4<-aov(lm(shannon_entropy~soil_texture))
analise5<-aov(lm(shannon_entropy~soil_fertility))
anova(analise5)
#shannon vs soil_texture = 0,0344
#shannon vs soil_fertility = 0,09153

# teste de Tukey
TukeyHSD(aov(lm(shannon_entropy~soil_texture))) # diferença entre textura arenosa e argilosa e significatica
(p=0,0302)
TukeyHSD(aov(lm(shannon_entropy~soil_fertility))) # diferença entre shannon para fertilidade e (p=0,09)
com mais diversidade na alta fertilidade

##analise eestatistica PCoA
analise1.1<-aov(lm(PCoA~sample_type))
analise2.1<-aov(lm(PCoA~vegetal))
analise3.1<-aov(lm(PCoA~soil_type))
analise4.1<-aov(lm(PCoA~soil_texture))
analise5.1<-aov(lm(PCoA~soil_fertility))
anova(analise1.1)
# PCoA vs sample_type = 0,04849

s_type<- PCoA_analysis %>%
  ggplot(aes(x=PC1, y=PC2, color=soil_type, size=shannon_entropy)) +
  geom_point(alpha=0.5) + #alpha controls transparency and helps when points are overlapping
  theme_q2r() +
  scale_size_continuous(name="Shannon Diversity") +
  scale_color_discrete(name="Soil Type")

samp_typ<- PCoA_analysis %>%
  ggplot(aes(x=PC1, y=PC2, color=sample_type, size=shannon_entropy)) +
  geom_point(alpha=0.5) + #alpha controls transparency and helps when points are overlapping
  theme_q2r() +
  scale_size_continuous(name="Shannon Diversity") +
  scale_color_discrete(name="Sample Type")

vage<- PCoA_analysis %>%
  ggplot(aes(x=PC1, y=PC2, color=vegetal, size=shannon_entropy)) +
  geom_point(alpha=0.5) + #alpha controls transparency and helps when points are overlapping
  theme_q2r() +
  scale_size_continuous(name="Shannon Diversity") +
  scale_color_discrete(name="Vegetable")

sec<- PCoA_analysis %>%
  ggplot(aes(x=PC1, y=PC2, color=setor, size=shannon_entropy)) +
  geom_point(alpha=0.5) + #alpha controls transparency and helps when points are overlapping
  theme_q2r() +
  scale_size_continuous(name="Shannon Diversity") +

```

```

scale_color_discrete(name="sector")

textura<- PCoA_analysis %>%
  ggplot(aes(x=PC1, y=PC2, color=soil_texture, size=shannon_entropy)) +
  geom_point(alpha=0.5) + #alpha controls transparency and helps when points are overlapping
  theme_q2r() +
  scale_size_continuous(name="Shannon Diversity") +
  scale_color_discrete(name="Soil Texture")

fertili<- PCoA_analysis %>%
  ggplot(aes(x=PC1, y=PC2, color=soil_fertility, size=shannon_entropy)) +
  geom_point(alpha=0.5) + #alpha controls transparency and helps when points are overlapping
  theme_q2r() +
  scale_size_continuous(name="Shannon Diversity") +
  scale_color_discrete(name="Soil Fertility")

#####
##### consequi #####
#####

##Here we will agglomerate the reads to the phylum-level using phyloseq
####and plot the relative abundance by Status.

phyloseq<-qza_to_phyloseq(features = "Results/table.qza",
  tree = "Results/rooted-tree.qza",
  "Results/taxonomy.qza",
  metadata = "metadata_SP.tsv")

table(phyloseq::tax_table(phyloseq)[, "Family"])
saveRDS(phyloseq, "my-phyloseq-lab.RDS") # salar o arquivo num arquivo tipo R

#Aphelidiomycota    Ascomycota    Basidiomycota    Chytridiomycota
#1      1256      666      25
#Entorrhizomycota  Glomeromycota  Kickxellomycota  Mortierellomycota
#2      39      13      51
#Mucoromycota     Rozellomycota  unidentified
#78      46      243

ps_rel_abund = phyloseq::transform_sample_counts(phyloseq, function(x){x / sum(x)})
phyloseq::otu_table(phyloseq)[1:5, 1:5] # visualize numeros brutos
phyloseq::otu_table(ps_rel_abund)[1:5, 1:5] #visualize numeros em porcentagem

#Plot as mesmas variedades d cima
phyloseq::plot_bar(ps_rel_abund, fill = "Phylum") +
  geom_bar(aes(color = Phylum, fill = Phylum), stat = "identity", position = "stack") +
  labs(x = "", y = "Relative Abundance\n") +
  facet_wrap(~soil_texture, scales = "free") +
  theme(panel.background = element_blank(),
  axis.text.x=element_blank(),
  axis.ticks.x=element_blank())

phyloseq::plot_bar(ps_rel_abund, fill = "Phylum") +
  geom_bar(aes(color = Phylum, fill = Phylum), stat = "identity", position = "stack") +
  labs(x = "", y = "Relative Abundance\n") +
  facet_wrap(~soil_type, scales = "free") +
  theme(panel.background = element_blank(),
  axis.text.x=element_blank(),
  axis.ticks.x=element_blank())

```

```

phyloseq::plot_bar(ps_rel_abund, fill = "Phylum") +
  geom_bar(aes(color = Phylum, fill = Phylum), stat = "identity", position = "stack") +
  labs(x = "", y = "Relative Abundance\n") +
  facet_wrap(~soil_fertility, scales = "free") +
  theme(panel.background = element_blank(),
        axis.text.x=element_blank(),
        axis.ticks.x=element_blank())

```

```

phyloseq::plot_bar(ps_rel_abund, fill = "Phylum") +
  geom_bar(aes(color = Phylum, fill = Phylum), stat = "identity", position = "stack") +
  labs(x = "", y = "Relative Abundance\n") +
  facet_wrap(~vegetal, scales = "free") +
  theme(panel.background = element_blank(),
        axis.text.x=element_blank(),
        axis.ticks.x=element_blank())

```

```

phyloseq::plot_bar(ps_rel_abund, fill = "Phylum") +
  geom_bar(aes(color = Phylum, fill = Phylum), stat = "identity", position = "stack") +
  labs(x = "", y = "Relative Abundance\n") +
  facet_wrap(~setor, scales = "free") +
  theme(panel.background = element_blank(),
        axis.text.x=element_blank(),
        axis.ticks.x=element_blank())

```

```

phyloseq::plot_bar(ps_rel_abund, fill = "Family") +
  geom_bar(aes(color = Phylum, fill = Phylum), stat = "identity", position = "stack") +
  labs(x = "", y = "Relative Abundance\n") +
  facet_wrap(~sample_type, scales = "free") +
  theme(panel.background = element_blank(),
        axis.text.x=element_blank(),
        axis.ticks.x=element_blank())

```

```
###Bray-Curtis dissimilarity for all samples
```

```

#Extract OTU table and compute BC
ps_rel_otu <- data.frame(phyloseq::otu_table(ps_rel_abund))
ps_rel_otu <- t(ps_rel_otu)
bc_dist <- vegan::vegdist(ps_rel_otu, method = "bray")
as.matrix(bc_dist)[1:5, 1:5]

```

```

#Save as dendrogram
ward <- as.dendrogram(hclust(bc_dist, method = "ward.D2"))

```

```

#Provide color codes
met <- data.frame(phyloseq::sample_data(ps_rel_abund))
colorCode <- c(`Cortex` = "red", `Rhizosphere` = "blue")
labels_colors(ward) <- colorCode[meta$vegetal][order.dendrogram(ward)]
#Plot
plot(ward)

```

```

#####
#creting a tree

```

```
results<-read_qza("differentials.qza")$data
```

```
results<-results %>% mutate(Significant=if_else(we.eBH<0.1,"*", ""))
```

```
##### Aldex2
```



```

aldex2_da <- ALDEX2::aldex(data.frame(phyloseq::otu_table(physeq)),
                          phyloseq::sample_data(physeq)$Status, test="t", effect = TRUE, denom="iqlr")

##### phylotree

#plotar o resumo das riquezas do nosso phyloseq
plot_richness(physeq, color = "sample_type")
plot_richness(physeq, color = "soil_type")
plot_richness(physeq, color = "soil_texture")
plot_richness(physeq, color = "vegetal")
plot_richness(physeq, color = "setor")
plot_richness(physeq, color = "soil_fertility")

#venn diagram

install.packages("VennDiagram")
library(VennDiagram)

##### analise que nao fiz
wUF.ordu <- ordinate(physeq, method="NMDS", distance="unifrac", weighted=TRUE)
plot(wUF.ordu, type="n", main="Weighted UniFrac")
points(wUF.ordu, pch=20, display="sites", col=c("blue", "green", "red")[metadata$sample_type])
legend(0.3,0.15, legend=c("2w","8w","1yr"), col=c("green","red","blue"), pch=20)

#####
#####geramos imagens por grupo taxonomico#####
#####

##### trabalhando a nÃ-vel de Chaetothyriales

#### isolamos da amostra os Chaetothyriales
Chaeto<-subset_taxa(physeq, Order=="Chaetothyriales")
Chaeto_rel_abund = phyloseq::transform_sample_counts(Herpo, function(x){x / sum(x)})
##### a partir daqui eu gero uma img pra cada analise

#filtrado os nao identificados a nivel de Ordem
Chaeto_wit_uni_ord <- subset_taxa(Chaeto, !is.na(Order) & !Order %in% c("", "unidentified"))
Chaeto_o_fami_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Chaeto_wit_uni_ord, function(x){x / sum(x)})

## geramos as imagens a nÃ-verl de ordem

#plot "Description"

plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="Description", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "Description", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "Description", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```
#plot "sample_type"
```

```
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="sample_type", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="sample_type", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#plot "soil_type"
```

```
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="soil_type", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="soil_type", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#plot "soil_texture"
```

```
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="soil_texture", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="soil_texture", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#plot "vegetal"
```

```
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="vegetal", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="vegetal", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
```

```

    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="vegetal", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="vegetal", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "setor"

plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="setor", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="setor", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "setor", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "setor", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "setor", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="setor", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="setor", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="setor", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_fertility"

plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="soil_fertility", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_o_fami_abun, color="soil_fertility", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_o_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="soil_fertility", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "soil_fertility", distance="bray",
  sample.label="soil_fertility", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_o_fami_abun, "soil_fertility", distance="bray",
  sample.label="vegetal", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

## geramos as imagens a nÃ-vel de familia

#filtrado os nao identificados a nivel de familia
Chaeto_wit_uni_fam <- subset_taxa(Chaeto, !is.na(Family) & !Family %in% c("", "unidentified"))
Chaeto_f_fami_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Chaeto_wit_uni_fam, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="Description", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="Description", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",

```

```

    sample.label="Description", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "sample_type"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="sample_type", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="sample_type", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="sample_type", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="sample_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="sample_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_type"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="soil_type", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="soil_type", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="soil_type", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="soil_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="soil_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_texture"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="soil_texture", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="soil_texture", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="soil_texture", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="soil_texture", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
    sample.label="soil_texture", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
    high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "vegetal"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="vegetal", shape="Order", size="abundance")

```

```

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="vegetal", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="vegetal", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="vegetal", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="vegetal", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "setor"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="setor", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="setor", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "setor", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "setor", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "setor", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="setor", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="setor", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="setor", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_fertility"

plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="soil_fertility", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_f_fami_abun, color="soil_fertility", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_f_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="soil_fertility", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="soil_fertility", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
  sample.label="soil_fertility", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
  high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

## geramos as imagens a nivel de genero

#filtrado os nao identificados a nivel de gene
Chaeto_wit_uni_gen <- subset_taxa(Chaeto, !is.na(Genus) & !Genus %in% c("", "unidentified"))
Chaeto_g_filt_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Chaeto_wit_uni_gen, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="Description", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")

```

```

plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "sample_type"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="sample_type", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="sample_type", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "sample_type", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "sample_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "sample_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_type"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="soil_type", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="soil_type", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_type", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_texture"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="soil_texture", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="soil_texture", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_texture", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_texture", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_texture", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```

plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "vegetal"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="vegetal", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="vegetal", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "vegetal", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "vegetal", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "vegetal", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "setor"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="setor", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="setor", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "setor", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "setor", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "setor", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_fertility"

plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="soil_fertility", shape="Order", size="abundance")
plot_tree(Chaeto_g_filt_abun, color="soil_fertility", shape="Family", size="abundance")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Family", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Chaeto_g_filt_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Family", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Chaeto_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

##### trabalhando somente com Herpotrichiellaceae

#isolamos Herpotrichiellaceae da amostra total
Herpo<-subset_taxa(physeq, Family=="Herpotrichiellaceae")
Herpo_rel_abund = phyloseq::transform_sample_counts(Herpo, function(x){x / sum(x)})

```

```

#### geramos as imagens

#filtrado a nivel de familia
Herp_wit_uni_fam <- subset_taxa(Herpo, !is.na(Family) & !Family %in% c("", "unidentified"))
Herpo_f_fami_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Herp_wit_uni_fam, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"

plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="Description", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "sample_type"

plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="sample_type", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="sample_type", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "sample_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="sample_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_type"

plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="soil_type", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="soil_type", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "soil_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_texture"

plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="soil_texture", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="soil_texture", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "soil_texture", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```



```
#plot "vegetal"
```

```
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="vegetal", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="vegetal", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "vegetal", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#plot "setor"
```

```
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="setor", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="setor", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "setor", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "setor", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#plot "soil_fertility"
```

```
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="soil_fertility", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_f_fami_abun, color="soil_fertility", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_f_fami_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#### geramos as imagens a nÃ-verl de genero
```

```
#filtrado os nao identificados a nivel de gene
```

```
Herp_wit_uni <- subset_taxa(Herpo, !is.na(Genus) & !Genus %in% c("", "unidentified"))
Herp_g_filt_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Herp_wit_uni, function(x){x / sum(x)})
```

```
#plot "Description"
```

```
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="Description", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
```

```
#plot "sample_type"
```

```

plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="sample_type", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="sample_type", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "sample_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "sample_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```
#plot "soil_type"
```

```

plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="soil_type", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="soil_type", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "soil_type", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "soil_type", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_type", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```
#plot "soil_texture"
```

```

plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="soil_texture", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="soil_texture", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "soil_texture", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "soil_texture", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_texture", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```
#plot "vegetal"
```

```

plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="vegetal", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="vegetal", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "vegetal", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "vegetal", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="vegetal", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```
#plot "setor"
```

```

plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="setor", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="setor", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "setor", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "setor", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

```

```

plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="setor", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#plot "soil_fertility"

plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="soil_fertility", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Herpo_g_filt_abun, color="soil_fertility", shape="Genus", size="abundance")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Genus", title="")
plot_bar(Herpo_g_filt_abun, "soil_fertility", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Genus", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)
plot_heatmap(Herpo_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="soil_fertility", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#### trabalhando somente com Mucoraceae

#isolando Mucoraceae da amostra total
Mucor<-subset_taxa(physeq, Family=="Mucoraceae")
Mucor_rel_abund = phyloseq::transform_sample_counts(Mucor, function(x){x / sum(x)})

#filtrado a nivel de familia
Mucor_wit_uni_fam <- subset_taxa(Mucor, !is.na(Family) & !Family %in% c("", "unidentified"))
Mucor_f_fami_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Mucor_wit_uni_fam, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"
plot_tree(Mucor_f_fami_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Mucor_f_fami_abun, color="Description", shape="Genus", size="abundance")
plot_tree(Mucor_f_fami_abun, color="Description", shape="Species", size="abundance")
plot_bar(Mucor_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Mucor_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#filtrado os nao identificados a nivel de gene
Mucor_wit_uni_genus <- subset_taxa(Mucor, !is.na(Genus) & !Genus %in% c("", "unidentified"))
Mucor_g_filt_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Mucor_wit_uni_genus, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"
plot_tree(Mucor_g_filt_abun, color="Description", shape="Family", size="abundance")
plot_tree(Mucor_g_filt_abun, color="Description", shape="Genus", size="abundance")
plot_tree(Mucor_g_filt_abun, color="Description", shape="Species", size="abundance")
plot_bar(Mucor_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Mucor_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

##### trabalhando somente com Ophiocordycipitaceae Pupurocillium

###isolando Ophiocordycipitaceae da amostra total
Purpur<-subset_taxa(physeq, Family=="Ophiocordycipitaceae")
Purpur_rel_abund = phyloseq::transform_sample_counts(Mucor, function(x){x / sum(x)})

##filtrado a nivel de familia
Purpur_wit_uni_fam <- subset_taxa(Purpur, !is.na(Family) & !Family %in% c("", "unidentified"))

```

```

Purpur_f_fami_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Purpur_wit_uni_fam, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"
plot_tree(Purpur_f_fami_abun, color="Description", shape="Species", size="abundance")
plot_bar(Purpur_f_fami_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Purpur_f_fami_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

##filtrado os nao identificados a nivel de gene
Purpur_wit_uni <- subset_taxa(Purpur, !is.na(Genus) & !Genus %in% c("", "unidentified"))
Purpur_g_filt_abun = phyloseq::transform_sample_counts(Purpur_wit_uni, function(x){x / sum(x)})

#plot "Description"
plot_tree(Purpur_g_filt_abun, color="Description", shape="Species", size="abundance")
plot_bar(Purpur_g_filt_abun, "Description", "Abundance", "Species", title="")
plot_heatmap(Purpur_g_filt_abun, "shannon", distance="bray",
             sample.label="Description", taxa.label="Species", low="#FFEAE6",
             high="#E60000", na.value="#00001A", na.rm = T)

#####
#####
### informaÃ§Ã£o por local

TopNOTUs<-names(sort(taxa_sums(Chaeto_family_abun), TRUE))
ent10<-prune_taxa(TopNOTUs, Chaeto_filt_genus)
plot_bar(ent10, "vegetal", fill = "shannon", facet_grid = ~Order)

tax_table(ent10)

##### trabalhando somente com Ajellomycetaceae

histo<-subset_taxa(physeq, Order=="Onygenales")
histo_wit_only_genus <- subset_taxa(histo, !is.na(Species) & !Species %in% c("", "unidentified", "NA"))
histo_abund = phyloseq::transform_sample_counts(histo_wit_only_genus, function(x){x / sum(x)})

plot_bar(histo_abund, "Description", "Abundance", "Species", title="")+
  theme_classic()+
  ylab("Relative Abundance")+
  xlab("Samples ID")

Herpo<-subset_taxa(physeq, Order=="Chaetothyriales")
herpo_wit_only_genus <- subset_taxa(Herpo, !is.na(Genus) & !Genus %in% c("", "unidentified", "NA"))
herpo_abund = phyloseq::transform_sample_counts(herpo_wit_only_genus, function(x){x / sum(x)})
tax_table(herpo_abund)

plot_bar(herpo_abund, "Description", "Abundance", "Genus", title="")+
  theme_classic()+
  ylab("Relative Abundance")+
  xlab("Samples ID")

physeq<-qza_to_phyloseq(features = "Results/table.qza",
                      tree = "Results/rooted-tree.qza",
                      "Results/taxonomy.qza",
                      metadata = "metadata_SP.tsv")

```

```
ITS_SP<-read_qza("Results/table.qza")
ITS_SP$data
```

```
taxonomy<-read_qza("Results/taxonomy.qza")
taxonomy.ti<-parse_taxonomy(taxonomy$data)
```

```
#analise total de todas as espécies
```

```
mucorales<-subset_taxa(physeq, Order=="Mucorales")
mucorales_wit_only_species <- subset_taxa(mucorales, !is.na(Species) & !Species %in% c("", "unidentified",
"NA"))
mucorales_abund = phyloseq::transform_sample_counts(mucorales_wit_only_species, function(x){x / sum(x)})
tax_table(total_abund)
```

```
plot_bar(mucorales_abund, "Description", "Abundance", "Species", title="")+
  theme_classic()+
  scale_fill_hue(aesthetics = "fill", h = c(0,360), l = 50, direction = 1,
                c = 200, na.value = "white", h.start = 200)+
  ylab("Relative Abundance")+
  xlab("Samples ID")
```

```
help(scale_fill_hue,)
```