

RICARDO MATHEUS PIRES

**Análise da decomposição de madeira em
fragmento de mata atlântica: estrutura da
comunidade fúngica, caracterização do
substrato e o processo sucessional**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE,
na Área de Concentração de Plantas
Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2019

RICARDO MATHEUS PIRES

Análise da decomposição de madeira em fragmento de mata atlântica: estrutura da comunidade fúngica, caracterização do substrato e o processo sucessional

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE,
na Área de Concentração de Plantas
Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2019

RICARDO MATHEUS PIRES

**Análise da decomposição de madeira em
fragmento de mata atlântica: estrutura da
comunidade fúngica, caracterização do
substrato e o processo sucessional**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE,
na Área de Concentração de Plantas
Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. ADRIANA DE MELLO GUGLIOTTA

2019

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Pires, Ricardo Matheus

P667a Análises da decomposição de madeira em fragmento de mata atlântica: estrutura da comunidade fúngica, caracterização do substrato e o processo sucessional / Ricardo Matheus Pires -- São Paulo, 2019.
108p.; il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2019.

Bibliografia.

1. Ecologia microbiana. 2. Sucessão fúngica. 3. Floresta tropical. I. Título.

CDU: 582.284

*À minha família, que sonhou junto
comigo essa realização de vida,
Sandra Ap. C. A. Pires, Helio A. Pires e
Helen Marina Pires. Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Adriana de Mello Gugliotta, que abriu as portas do seu laboratório para me receber desde que eu comecei o mestrado e teve coragem junto comigo de desenvolver esse projeto de pesquisa, que ia além da taxonomia e da sistemática e adicionava a ecologia. É uma satisfação muito grande ter concluído essa "loucura" junto com ela.

Para esse trabalho ser realizado, ele contou com a colaboração de muita gente e várias instituições. Agradeço ao Instituto de Botânica e ao programa de Pós-Graduação pela oportunidade de cursar o doutorado, também ao CNPq (Processo 151999/2015-5) e à FAPESP (Processo 2015/13240-5) pelas bolsas de estudos a mim concedida.

Agradeço aos gestores do Parque estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) pela autorização de coleta e desenvolvimento do trabalho. Dentre essas parcerias realizadas, agradeço ao meu co-orientador, Dmitry Schigel e ao meu supervisor do doutorado sanduíche em Copenhague, Dinamarca, Rasmus Kjøller. Também ao pesquisador Tobias Frøsløv pelas análises em bioinformática.

Para análise dos compostos da madeira, agradeço a professora Adriane Milagres e André Ferraz da EEL-USP, de Lorena. E para os dados microclimáticos, agradeço ao pesquisador Gustavo Armani, do Instituto Geológico do estado de São Paulo, pelo empréstimo dos equipamentos e ajuda nas análises dos dados.

Também gostaria de agradecer a todos o suporte dos amigos, técnicos de laboratório, e demais profissionais. Em Copenhague, meus amigos que foram fundamentais na minha adaptação e bom desenvolvimento das atividades, Rafael Rodrigues, Camilla Pereira, Susana Santos, Fernanda Ferreira, Júlia Sobral, Júlia Chao,

Rebeca Andersen, Carol, Jamille, Gosha. Agradeço a Laís Petri pela imensa ajuda com a identificação das espécies arbóreas.

Aos amigos da EEL-USP, seu Zé Moreira, Ângela, Lucas Queiroz. E aos amigos do Instituto de Botânica, Ana Lúcia, Letícia Lima, Viviana Motato-Vasquez, Mariana Drewinski, Mauro Westphalen, Gustavo Jerônimo.

Além de todos meus amigos da vida, dos que conheci nas diferentes casas que morei e aos familiares, que mesmo longe, sempre muito preocupados com meu desenvolvimento na pesquisa.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies arbóreas selecionadas para o estudo.....	30
Tabela 2 – Localização dos pontos de amostragem.	31
Tabela 3 – Divisão dos quadrimestres de amostragem.	33
Tabela 4 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 1 (Tempo 0). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra.....	41
Tabela 5 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 2 (Tempo 1). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra.....	41
Tabela 6 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 3 (Tempo 2). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra.....	42
Tabela 7 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 4 (Tempo 3). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra.....	43
Tabela 8 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 5 (Tempo 4). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra.....	43
Tabela 9 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 6 (Tempo 5). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra.....	44
Tabela 10 – Combinação de <i>primers</i> (<i>Reverse – Forward</i>) para a biblioteca 7 (Tempo 6). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>). “Cód.” é o código de cada amostra. ...	45
Tabela 11 – Volume usado para combinar as bibliotecas (em μL). O código “Blk” é o controle (“ <i>Blank</i> ” <i>samples</i>).....	46
Tabela 12 – Quantidade de amostra de reagentes (em μL).....	48

Tabela 13 – Índice de <i>primers</i> usados em cada biblioteca.....	48
Tabela 14 – Quantificação de DNA após purificação da PCR.	49
Tabela 15 – Correlação entre as porcentagens de perda e os fatores abióticos.	59
Tabela 16 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Tempos.	77
Tabela 17 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Pontos.	77
Tabela 18 – Resultados da análise de PERMANOVA ordenada pelos Tempos. R2 em porcentagem.	81
Tabela 19 – Resultados da análise de PERMANOVA ordenada pelos Pontos. R2 em porcentagem.	81
Tabela 20 – Resultados da análise de PERMANOVA ordenada pelas Árvores. R2 em porcentagem.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, com destaque para as áreas onde os experimentos foram instalados. Barra de escala = 200 m. Fonte: modificado de Google Earth.	31
Figura 2 – Montagem do experimento em campo. As setas em amarelo indicam alguns dos galhos que foram selecionados para o experimento.	32
Figura 3 – Esquema do desenho amostral.	33
Figura 4 – Sensores para caracterização microclimática no campo instalados em miniabrigos de ventilação passiva.	37
Figura 5 – Laboratório da Universidade de Copenhagen. Fragmentação das amostras com furadeira e broca.	39
Figura 6 – Abundância de OTU entre os filos, na somatória de todas as amostras de todos os tempos.	52
Figura 7 – Abundância de OTU entre as classes, na somatória de todas as amostras de todos os tempos.	53
Figura 8 – Boxplot com as densidades das amostras do Tempo 0 (em g/mL).	55
Figura 9 – Gráfico de linhas da média e erro padrão da densidade das amostras ao longo do tempo das três espécies arbóreas do estudo.	56
Figura 10 – Histograma da taxa de degradação (% de perda de massa) nos quatro Pontos.	57
Figura 11 – Porcentagens de perda de massa entre um Tempo e o seguinte das três espécies de árvore.	58

Figura 12 – Gráfico de linha da média e erro padrão da porcentagem de perda de massa entre um Tempo e o seguinte das três espécies de árvore.	59
Figura 13 – Regressão linear entre as porcentagens de perda e os fatores microclimáticos: A. temperatura ($p = 0,012$ e $r^2 = 0,029$), B. chuva ($p = 0,001$ e $r^2 = 0,049$), C. umidade absoluta ($p = 0,017$ e $r^2 = 0,027$) e D. umidade relativa ($p = 0,25$ e $r^2 = 0,006$).....	60
Figura 14 – Gráfico de linhas da média e erro padrão da quantidade de nitrogênio ao longo do tempo.	61
Figura 15 – Gráfico de linhas da média e erro padrão da quantidade de A. lignina, B. celulose, C-E. hemiceluloses (C. xilana, D. arabinose, E. acetil) e F. extrativos da madeira ao longo do tempo.	63
Figura 16 – Porcentagem de decaimento dos componentes da madeira.	64
Figura 17 – Boxplot da razão lignina/celulose ao longo do tempo.	65
Figura 18 – Boxplot da razão lignina/hemicelulose ao longo do tempo.....	65
Figura 19 – Razão lignina/celulose e lignina/hemicelulose ao longo do tempo.	66
Figura 20 – Riqueza das OTUs dos sete Tempos amostrados.	66
Figura 21 – Riqueza de OTUs ao longo do tempo. A. <i>Alchornea</i> . B. <i>Piptadenia</i> . C. <i>Calypttranthes</i>	67
Figura 22 – Riqueza de OTUs nos 36 galhos amostrados. ALC = <i>Alchornea</i> ; PJC = <i>Piptadenia</i> e CAL = <i>Calypttranthes</i> . 1, 2 e 3 = Ponto 1; 4, 5 e 6 = Ponto 2; 7, 8 e 9 = Ponto 3 e 10, 11 e 12 = Ponto 4.	68
Figura 23 – Riqueza de OTUs nas espécies de árvores.....	68
Figura 24 – Diagrama de Venn para presença de OTUs nas espécies de árvore.	69
Figura 25 – Riqueza de OTUs dos quatro locais no fragmento florestal.	69

Figura 26 – Riqueza de OTUs entre borda e interior do fragmento.....	71
Figura 27 – Histograma de abundância de filos de fungos entre todas as amostras. ...	73
Figura 28 – Cluster de abundância de OTUs com o método do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis.	76
Figura 29 – Mapa de calor da abundância de OTU com o método de índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Quanto mais vermelho, mais similar; quanto mais amarelo, mais dissimilar. T0 = Tempo 0, T1 = Tempo 1, T2 = Tempo 2, T3 = Tempo 3, T4 = Tempo 4, T5 = Tempo 5 e T6 = Tempo 6.	76
Figura 30 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Tempos, com os vetores das variáveis abióticas. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.....	79
Figura 31 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Pontos, com os vetores das variáveis abióticas. A. Ponto 1, B. Ponto 2, C. Ponto 3 e D. Ponto 4.....	80
Figura 32 – Gráficos de rank-abundância. A. comunidade geral, B. comunidade presente em <i>Alchornea</i> , C. comunidade presente em <i>Piptadenia</i> e D. comunidade presente em <i>Calypttranthus</i>	84
Figura 33 – Abundância (em log de 10) das OTUs mais abundantes na amostra ALC1, um dos galhos de <i>Alchornea</i> do Ponto 1.....	86
Figura 34 – Abundância (em log de 10) das OTUs mais abundantes na amostra PJC1, um dos galhos de <i>Piptadenia</i> do Ponto 1.....	86
Figura 35 – Abundância (em log de 10) das OTUs mais abundantes na amostra CAL1, um dos galhos de <i>Calypttranthus</i> do Ponto 1.....	87

Figura 36 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC1, um dos três galhos de <i>Alchornea</i> do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4 e F. Tempo 5.	89
Figura 37 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC2, um dos três galhos de <i>Alchornea</i> do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.	90
Figura 38 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC3, um dos três galhos de <i>Alchornea</i> do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4 e F. Tempo 5.	91
Figura 39 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC1, um dos três galhos de <i>Alchornea</i> do Ponto 2. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.	92
Figura 40 – Gráficos de rank-abundância da amostra PJC1, um dos três galhos de <i>Piptadenia</i> do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.....	93
Figura 41 – Gráficos de rank-abundância da amostra CAL1, um dos três galhos de <i>Calypttranthes</i> do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.....	94

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
HIPÓTESES.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
ÁREA DE ESTUDO	29
AUTORIZAÇÃO SisGEN	30
DESENHO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM	30
ANÁLISE BIOQUÍMICA DA MADEIRA	33
ANÁLISE DE CARBONO E NITROGÊNIO	35
ANÁLISE DOS FATORES ABIÓTICOS.....	37
ANÁLISE DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE	38
<i>Extração de DNA.....</i>	38
<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction)</i>	39
<i>PCR pooling e purificação.....</i>	46
<i>Biblioteca Illumina TruSeq DNA PCR-free (LT).....</i>	47
<i>Combinação de bibliotecas</i>	49
<i>Bioestatística</i>	49
TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
DESCRITORES BÁSICOS DAS SEQUÊNCIAS E OTUs.....	52
DECOMPOSIÇÃO DA MADEIRA E OS FATORES ABIÓTICOS	54
ESTUDOS DA RIQUEZA DE OTUs.....	66
COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE	74
ANÁLISE TAXONÔMICA E GRUPOS FUNCIONAIS	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS	105
ANEXO 1 – COMPROVANTE SisGEN.....	105
ANEXO 2 – CÓDIGOS USADOS PARA NOMEAR AS AMOSTRAS	106

Resumo

Esse trabalho descreveu o processo de degradação da madeira num fragmento de Mata Atlântica paulista, avaliando a variação das espécies de fungos que ocorrem ao longo de dois anos de estudo presentes nos galhos de três espécies arbóreas que ocorrem na área. Além disso, também foram avaliadas possíveis diferenças nas taxas de decomposição no interior e na borda do fragmento e qual o efeito do impacto urbano (matriz) na estrutura da comunidade fúngica e no processo de decomposição. Ramos vivos ainda presos às árvores foram cortados e reunidos dentro de uma parcela de 1 m². Para cada espécie vegetal foram escolhidos três espécimes (*Alchornea sidifolia*, *Piptadenia gonoacantha* e *Calypttranthes grandifolia*), que foram colocados em quatro pontos diferentes da floresta, dois nas bordas e dois no interior do fragmento. Esses galhos foram monitorados por dois anos, com coletas de amostras a cada 4 meses (chamados de "Tempo 0" até "Tempo 6") para a identificação de espécies fúngicas. Os teores de lignina, celulose, hemicelulose e nitrogênio nos galhos em decomposição ao longo do tempo foram quantificados, além de serem caracterizados o microclima dos diferentes pontos de amostragem. Foi possível perceber a gradual redução da densidade da madeira, bem como de seus componentes principais, mostrando que há um processo intenso de ciclagem de nutrientes, em algumas amostras a perda de massa ao longo dos dois anos chegou a 70%. Percebeu-se uma baixa correlação na associação da estrutura e sucessão da comunidade com a variação bioquímica da madeira, bem como entre as variações da comunidade e os fatores microclimáticos. Quando correlacionados os padrões da comunidade fúngica e a bioquímica da madeira em função da borda e interior do fragmento florestal, não houve influência no processo de

decomposição. Usando sequenciamento de nova geração, obteve-se um total de 3 037 OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Entre eles, foram identificados 10 filos, 33 classes, 88 ordens, 177 famílias e 319 gêneros, sendo que as OTUs mais abundantes nas amostras foram invariavelmente espécies do filo Ascomycota. Foi avaliado ainda se as amostras variavam em riqueza e abundância de espécies ao longo do tempo. Em termos de riqueza de OTUs, verificou-se que, houve uma variação na comunidade fúngica ao longo do tempo; inicialmente a riqueza é maior e que ao longo do tempo essa riqueza de OTUs decresce. O mapa de calor mostrou uma maior dissimilaridade entre as amostras do Tempo 0 para o Tempo 6. O Tempo 1 e o Tempo 2, mostraram uma alta similaridade, sugerindo uma sobreposição de riqueza e abundância de espécies. No Tempo 3, é possível notar uma fase de transição; os Tempos 4, 5 e 6 por sua vez, são mais dissimilares entre si, constituindo outra fase da sucessão. Em uma comparação de presença/ausência de OTUs nas três espécies de árvores é possível notar uma relação mais próxima entre as espécies de *Alchornea* e *Piptadenia*, e *Calypttranthes* como a mais diferente. Do Tempo 0 ao Tempo 2, especialmente no tempo 1 e 2, o filo Ascomycota é altamente abundante e, a partir do tempo 3, observa-se uma predominância do filo Basidiomycota, juntamente com um declínio geral na abundância. Com base na exploração de dados aqui apresentada, conclui-se que o padrão na decomposição da madeira depende das (ou é influenciado pelas) espécies que participam da sucessão e da abundância das mesmas durante o processo e que há uma tendência de sucessão de espécies durante a decomposição da madeira, além de que a abundância de espécies pode ser um indicativo do padrão de decomposição da madeira.

Abstract

This work aimed to understand the process of wood decay in a fragment of Atlantic Forest in the state of São Paulo, evaluating the variation of fungi species that occur during two years of study present on the branches of three tree species that occur in the area. In addition, we also evaluated possible differences in the decomposition rates in the interior and at the border of the fragment and what the effect of the urban impact (matrix) on the structure of the fungal community and the decomposition process. Living branches still attached to the trees were cut and gathered inside a 1 m² plot. For each plant species, three specimens (*Alchornea sidifolia*, *Piptadenia gonoacantha* e *Calyptrocalyx grandifolia*), that were placed in four different Sites of the forest, two in the borders and two in the interior of the fragment. These branches were monitored for two years, with samples taken every 4 months (called "Time 0" to "Time 6") for the identification of fungal species. The levels of lignin, cellulose, hemicellulose and nitrogen in the decomposing branches over time were quantified, besides the microclimate of the different sampling Sites were characterized. It was possible to notice the gradual reduction of wood density as well as its main components, demonstrating that there is an intense process of nutrient cycling, in some samples the loss of mass during the two years reached 70%. A low correlation was found in the association of community structure and succession with biochemical variation of wood, as well as between community variations and microclimatic factors. When correlated the fungal community patterns and the biochemistry of wood as a function of the edge and interior of the forest fragment, there was no influence on the decomposition process. Using new generation sequencing, a total of 3,037 OTUs (Operational Taxonomic Units) were

recorded. Among them, 10 phyla, 33 classes, 88 orders, 177 families and 319 genera were identified, and the most abundant OTUs in the samples were invariably species of the Ascomycota phylum. It was also evaluated if the samples varied in species abundance and abundance over time. In terms of OTUs richness, it was found that there was a variation in the fungal community over time; initially the wealth is greater and that of the time this wealth of species falls sharply. The heat map showed a greater dissimilarity between the samples from Time 0 to Time 6. Time 1 and Time 2 showed a high similarity, suggesting an overlap of species abundance and abundance. At Time 3, it is possible to note a transition phase; Times 4, 5 and 6 are, in turn, more dissimilar to each other, constituting another phase of succession. In a comparison of the presence / absence of OTUs in the three tree species it is possible to notice a closer relation between *Alchornea* and *Piptadenia*, and *Calypttranthes* as the most different. From Time 0 to Time 2, especially at time 1 and 2, the Ascomycota phylum is highly abundant and, from time 3, a predominance of the phylum Basidiomycota is observed along with a general decline in abundance. Based on the data exploration presented here, it is concluded that the pattern in the decomposition of the wood depends on (or is influenced by) the species that participate in the succession and the abundance of the wood during the process and that there is a trend of succession of species during the decomposition of the wood, in addition to that the abundance of species can be an indicative of the decomposition pattern of the wood.

Introdução

O ambiente florestal possui uma dinâmica ecológica particular, onde seus processos biológicos estão em conexão. Desde a fixação do carbono atmosférico até seu retorno à forma gasosa, muitos seres vivos contribuem para esse processo. Esses mecanismos disponibilizam informações sobre as funcionalidades dos ecossistemas biológicos (LOREAU et al., 2001).

A comunidade fúngica representa, em sua grande maioria, os principais decompositores da matéria orgânica desses ecossistemas, absorvendo nutrientes e liberando dióxido de carbono para a atmosfera e compostos de menor massa molar no ambiente (CORNELISSEN et al., 2012). Os compostos liberados a partir desses fungos são disponibilizados para o ambiente e utilizados pelos demais componentes da comunidade como, por exemplo, microrganismos e plantas. O dióxido de carbono liberado é utilizado na fotossíntese pela comunidade vegetal. Assim, eles possuem um papel essencial na natureza uma vez que impedem o contínuo acúmulo de matéria orgânica no ambiente e representam um importante elo no ciclo do carbono na Terra (CORNELISSEN et al., 2012; TSUNEDA, 1983).

O material decomposto é a biomassa vegetal, formada pelo metabolismo dos organismos autotróficos, acumulando carbono nos tecidos vegetais, como folhas, galhos, troncos, raízes, frutos e sementes. Os principais componentes dessa biomassa são polissacarídeos e o polímero aromático lignina. Os polissacarídeos das plantas podem ser divididos em polissacarídeos da parede celular, como celulose, várias hemiceluloses e pectinas e polissacarídeos de reserva, principalmente amido e inulina (MISCHNICK; MOMCILOVIC, 2010; VRIES; VISSER, 2001). Os polissacarídeos da parede

celular podem formar até 70% da biomassa e contém uma vasta gama de compostos monoméricos e ligações (JØRGENSEN et al., 2007; KOWALCZYK; BENOIT; VRIES, 2014). A lignina é um polímero aromático amplamente heterogêneo que é constituído a partir de três precursores fenilpropanoicos, álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (HIGUCHI, 2006).

A madeira é uma fração dessa biomassa vegetal de importância inestimável para a estruturação do ambiente florestal natural, e sua produção é estimada em cerca de $1,24 \times 10^{12}$ T, contribuindo com 80% da biomassa total da Terra (AJTAY; KETNER; DURIGNEUD, 1979; BOLIN et al., 2000). Esse composto biológico é muito complexo e heterogêneo, produzido pelas plantas lenhosas para fins de sustentação vegetal, onde predominam fibras de celulose e hemicelulose unidas por lignina. Esse recurso natural renovável tem extrema importância na sociedade humana, sendo usada em diversas áreas das atividades industriais desde a produção de papel até seu emprego na produção de móveis e edificações, além de ser um biocombustível, devido à queima e obtenção de carvão (NIMZ et al., 2012).

Dessa forma, pode-se encarar que a madeira é um elemento essencial no ciclo do carbono; onde a sua degradação representa a volta desse carbono na atmosfera e os fungos são um dos principais agentes desse processo, sendo beneficiados por fatores como alta temperatura e umidade e baixos teores de extrativos totais presentes na madeira (OLIVEIRA et al., 1986). Com isso a madeira representa um substrato único, rico em celulose, hemicelulose e lignina além de, em quantidades menores, substâncias solúveis em água e solventes, como açúcares, gorduras, óleos, ceras e proteínas (TSUNEDA, 1983). Os principais componentes da madeira estão fortemente interligados na parede celular, o que a torna muito resistente ao ataque de microrganismos. E, além

disso, a madeira contém baixíssimas quantidades de nitrogênio, raramente maior que 0,3%, tornando esse substrato um meio bastante específico para os microrganismos (BLANCHETTE, 2000; TSUNEDA, 1983).

Por se tratar de um substrato tão complexo e diverso, a madeira em decomposição compõe um microambiente em que comunidades de fungos vão se estabelecendo ao longo do tempo e as características físico-químicas vão sendo alteradas com as fases do processo sucessional da comunidade fúngica (TSUNEDA, 1983). A esse processo, denominamos sucessão fúngica, que pode ser definido como a ocupação sequencial do mesmo substrato pelas estruturas somáticas (usualmente micélio) das diferentes espécies de fungos ou associações de fungos (RAYNER; TODD, 1979).

Os estudos de sucessão fúngica em vários substratos têm estabelecido padrões similares, como a questão do tempo (colonizadores iniciais, intermediários e tardios), com o tempo e o substrato variando em cada estudo (JONES; HYDE, 2002; TSUNEDA, 1983; ZHOU; HYDE, 2002). Estudos realizados enfocam, em sua maioria, os aspectos do substrato, como esterco (KUTHUBUTHEEN; WEBSTER, 1986; RICHARDSON, 2002), folhas (SCHOENLEIN-CRUSIUS; MILANEZ, 1989, 1998; SCHOENLEIN-CRUSIUS; PIRES-ZOTTARELLI; MILANEZ, 1990), madeira em ambiente terrestre (LANGE, 1992; ZHOU; HYDE, 2002) e madeira submersa (FRYAR et al., 2004; PANEBIANCO; TAM; JONES, 2002).

Existem alguns trabalhos que acompanharam o processo de degradação da madeira na natureza (BAKYS et al., 2009; LANGE, 1992; ZHOU; HYDE, 2002), com destaque aos estudos de TSUNEDA(1983). Esse autor analisou a sucessão ecológica em troncos de carvalho e determinou quatro grupos de fungos colonizadores definidos nas seguintes fases: (i) pioneiros de crescimento rápido, como espécies de *Mucor* e

Rhizopus, que foram rapidamente substituídos por *Penicillium* e *Aspergillus*. Esses últimos gêneros são caracterizados por espécies que tem seu crescimento ótimo com a disponibilidade de açúcares mais simples e compostos solúveis em água, contudo possuem pouca ou nenhuma habilidade para degradar celulose. Na segunda fase (ii) passam a existir os primeiros colonizadores, formados principalmente por fungos de solo, como *Fusarium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, dentre outros; esses fungos possuem enzimas degradadoras de celulose, porém aparentemente não causam danos consideráveis na madeira. A terceira etapa da sucessão (iii) é reconhecida pela presença de fungos manchadores da madeira, sendo mais proeminentes que os anteriores, incluindo as espécies de leveduras negras, *Ceratocystis*, *Hypoxylon*, *Hypocrea* e outros fungos xylarioides; responsáveis pelo escurecimento da madeira e reconhecidos por apresentarem enzimas capazes de degradar a celulose e a lignina. Por fim, o grupo dos (iv) fungos degradadores de madeira, representado principalmente pelos basidiomicetos, especialmente políporos e agaricoides, os últimos organismos do processo de decomposição da madeira por serem mais lentos e apresentarem menores habilidades de competição, entretanto possuem um aparato enzimático bastante desenvolvido para degradar o substrato.

Um dos pontos fundamentais em Ecologia é entender como a comunidade se estrutura, qual a composição dessa comunidade ao longo do tempo e quais são os fatores que influenciam essa estruturação. As espécies chegam ao ambiente das formas mais diversas e imprevisíveis e a composição da comunidade passa a ser determinada estocasticamente (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2006). Todavia em comunidades abertas, uma vez que as espécies estão estabelecidas, vários fatores podem influenciar sua persistência. Entender como tais fatores influenciam o recrutamento e

estabelecimento das espécies, poderia promover ideias de como tais mecanismos influenciam a estrutura de comunidades abertas (ALMANY, 2003).

Dentro desse sucessivo estabelecimento de espécies, tem-se hierarquias na dominância entre os competidores, onde as espécies subordinadas coexistem entre os competidores mais eficazes, dominantes. Entender quais são os mecanismos que permitem a coexistência dessas espécies é fundamental para se compreender como a biodiversidade se mantém (PALMER; YOUNG; STANTON, 2002). Quando um competidor subordinado se estabelece, sua persistência naquele lugar depende de vários fatores, como resistir às variações e distúrbios ambientais, por exemplo. Mas quando temos ambientes mais estáveis, a longevidade do competidor subordinado está atrelada à sua capacidade de resistir à chegada de competidores mais fortes (WILBUR; ALFORD, 1985).

Uma das formas que esses competidores mais fracos podem obter alguma vantagem, é através do "efeito de prioridade", onde a espécie chega antes do competidor mais forte, se estabelece e, de certa forma, modifica as condições locais para se manter por mais tempo. Ele se refere às relações interespecíficas cujo resultado depende do tempo relativo ou absoluto de chegada, reprodução, ou atividade da segunda espécie da interação (LAWLER; MORIN, 1993). Essa diferença no tempo de chegada pode re-caracterizar a comunidade e novas condições surgirem, facilitando ou dificultando o recrutamento das espécies sucessoras.

Um dos fatores que pode colaborar com o entendimento do papel do efeito de prioridade sobre a comunidade é a similaridade ecológica das espécies que co-habitam um espaço. Ou seja, uma derivação do Princípio da exclusão competitiva (HARDIN, 1960), onde quanto mais similares os nichos ecológicos das espécies, mais as espécies

estabelecidas primeiro podem influenciar negativamente a colonização das sucessoras. Entretanto, quantificar os nichos não é uma tarefa fácil e uma alternativa para testar essa hipótese seria considerar o parentesco filogenético das espécies. Espécies mais próximas filogeneticamente tendem (ou podem tender) a possuir nichos que se sobrepõem e se tornarem competidoras quando dividem o mesmo espaço (TAN et al., 2012). Darwin (1859) já sugeria a hipótese de uma relação de maior competição entre organismos próximos filogeneticamente.

Trabalhos em vários grupos de seres vivos tem sido realizado para testar essa teoria, como testes *in vitro* com bactérias (TAN et al., 2012), formigas de *Acacia* na África (PALMER; YOUNG; STANTON, 2002), em anuros (LAWLER; MORIN, 1993; WILBUR; ALFORD, 1985), peixes de recife de coral (ALMANY, 2003), zooplâncton (LOUETTE; DE MEESTER, 2007), macroalgas de costão rochoso na Itália (BENEDETTI-CECCHI, 2000).

Nos estudos com fungos, um trabalho com leveduras foi realizado com a proposta de ser um sistema modelo (PEAY; BELISLE; FUKAMI, 2011). O experimento foi realizado *in vitro* para quantificar a força do efeito de prioridade em leveduras que vivem no néctar floral de um arbusto polinizado por beija-flor. No estudo, pode-se notar que houveram efeitos de prioridade entre as espécies, onde as espécies tardias sofreram efeitos negativos em relação as pioneiras. E esse efeito não foi filogeneticamente randômico, pois quanto mais filogeneticamente relacionado, maior foi o efeito sobre a espécie sucessora, corroborando com a hipótese Darwiniana de naturalização, como sugere o trabalho.

Em outro estudo com fungos, KENNEDY; PEAY; BRUNS (2009) usaram quatro espécies do gênero ectomicorrízico *Rhizopogon* para testar como se dá a colonização de

raízes de *Pinus muricata* (pinheiro). Os resultados confirmaram que os efeitos de prioridade desempenham um papel importante na dinâmica da colonização da ponta radicular, pelo menos na colonização precoce das mudas, e que a proporção do sistema radicular ocupado por uma espécie parece ser um fator determinante do sucesso competitivo.

Em madeira morta, um substrato muito peculiar de dinâmica própria, podem ser encontradas muitas espécies de diferentes grupos, que se sucedem ao longo do tempo. No trabalho de WESLIEN et al. (2011), os autores estudaram os efeitos de prioridade sob a comunidade de besouros em troncos de *Picea abies* L. Karst. (Espruce-da-Noruega). Num monitoramento de quinze anos, foi possível notar que besouros da espécie *Hylurgops palliatus*, quando eram os colonizadores, facilitavam o estabelecimento de *Peltis grossa*, um raro besouro europeu. Quando *Monochamus sutor* era o inicial, *P. grossa* tinha seu desenvolvimento prejudicado.

Em um estudo de fungos degradadores de madeira, HISCOX et al. (2015) usou discos de *Fagus sylvatica* (Faia-Europeia) que haviam sido pré-colonizados separadamente com nove espécies de vários estádios de sucessão fúngica. Claras diferenças na composição da comunidade foram evidentes após a pré-colonização por diferentes espécies com três comunidades sucessoras identificadas, indicando que espécies individuais podem ter efeitos cruciais na história de composição das comunidades. Os autores ainda dizem que os efeitos de prioridade podem estar ligados à alteração bioquímica do substrato e à capacidade combativa do predecessor. HISCOX et al. (2016) trazem resultados similares e sinalizam que variáveis como fatores abióticos

e *pool* de espécies historicamente presentes nos locais podem ser fatores importantes também na estruturação das comunidades.

O ideal para analisar a sucessão fúngica, é observar as hifas de cada espécie, mensurando o espaço ocupado no substrato ao longo do tempo. Entretanto, isso é metodologicamente muito difícil e muitas vezes inviável (FRYAR, 2002). Historicamente, os micologistas estudaram a documentação da diversidade nos mais diversos ecossistemas e substratos e secundariamente deram ênfase à sucessão das espécies, sejam elas as que esporulavam ou produziam estruturas sexuais (ascomas, basidiomas). As espécies que só apresentavam estruturas somáticas e, portanto, não havia meios para identificá-las, não eram abordadas (BETTUCCI; SILVA, 1992; LANGE, 1992).

Diversas técnicas têm sido empregadas com relativo êxito, como por exemplo, as técnicas destrutivas que consistem em destruir o substrato durante as amostragens. Dessa forma os fungos são isolados e subsequentemente identificados (MARANO et al., 2011; PONGE, 1991; ZHOU; HYDE, 2002), além de outros trabalhos que se valem de medições indiretas *in vitro* para inferir as interações fúngicas no processo de decomposição, como a quantificação do CO₂ liberado (HISCOX et al., 2015b).

A partir da década de 2000, as técnicas moleculares tornaram-se mais acessíveis e, embora destrutivas também, mostram-se importantes ferramentas na investigação da sucessão fúngica por detectarem diretamente o micélio presente no substrato, não apenas os fungos com estruturas reprodutivas (FRYAR, 2002). Até o presente momento, técnicas avançadas de biologia molecular, aliadas ao grande incremento de informações no banco de dados de sequências (GenBank), uma coleção de todas as sequências de DNA publicamente disponíveis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), têm sido amplamente utilizadas nos trabalhos de sucessão fúngica (BAKYS et al., 2009;

KUBARTOVÁ et al., 2012; VAN DER WAL; OTTOSSON; DE BOER, 2015). A técnica molecular, todavia, deve ser usada com certa precaução e com muita clareza de suas possíveis falhas, como a não distinção entre micélio ativo e eventuais esporos dormentes no substrato, mas que esses problemas podem ser superados com mais estudos, repetições e discussão de resultados de diferentes trabalhos (JONES; HYDE, 2002; LIEW et al., 1998).

Assim como em nível mundial, os estudos na América do Sul são focados principalmente em taxonomia. Poucos trabalhos abordam a ecologia e estrutura da comunidade fúngica, ou mesmo os mecanismos que envolvem as dinâmicas de decomposição de madeira de uma forma interligada. Conhecem-se estudos sobre taxas de decomposição da madeira na floresta amazônica brasileira (CHAMBERS et al., 2000, 2004), na Amazônia da Guiana Francesa (BLANC et al., 2009; HÉRAULT et al., 2010) e estudos com decomposição de troncos submersos (ABRIL et al., 2013; FEARNside, 2015), mas pouco se conhece sobre a atuação dos fungos degradadores de madeira nesses ecossistemas.

Atualmente, o estudo da degradação de biomassa vegetal por fungos é um campo de pesquisa de grande potencial, pois atrai interesse tanto da academia quanto da indústria (MÄKELÄ; DONOFRIO; DE VRIES, 2014). Com o avanço da tecnologia, hoje são possíveis estudos mais aprofundados dos processos que ocorrem na degradação, como a genômica, proteômica, metabolômica, além das técnicas de visualização como microscopia de imunifluorescência e de *scanning* com laser confocal (HYDE; JONES, 2002). Os estudos nessa área demonstram que a ação dos fungos no processo de degradação vai além da carga enzimática e, para o futuro muitos outros aspectos deverão ser elucidados; para que sejam compreendidas as complexas relações entre os

microrganismos e seu eficiente mecanismo de degradação da madeira como parte essencial no ciclo do carbono na Terra (MÄKELÄ; DONOFRIO; DE VRIES, 2014).

As árvores mortas decompõem-se de forma relativamente lenta na natureza, e mortalidade de árvores é episódica. Por este motivo; os poucos estudos sobre decomposição têm-se centrado sobre a biogeoquímica de serapilheira de superfície, e são especialmente escassos na América do Sul (CHAMBERS et al., 2000).

As florestas tropicais representam um grande reservatório de carbono global, sendo responsável por até metade do estimado de carbono armazenado em vegetação (HOUGHTON, 2005). Mudanças do uso da terra nos trópicos, como agricultura, pecuária extensiva, desmatamentos, entre outras ações, tornaram-se uma preocupação crescente para os seus potenciais impactos sobre o ciclo do carbono e as alterações climáticas globais (CARPENTER et al., 2006; SOLOMON et al., 2007). E essas ações antrópicas separam as áreas contínuas de mata em ilhas continentais de vegetação, processo conhecido como fragmentação florestal. Essa fragmentação tem efeitos bastante negativos sobre a biodiversidade e o ecossistema em si, como o efeito causado pela formação de bordas ao redor da mata e como esse fragmento se relaciona com seu entorno – chamado de matriz. Sobre esse efeito, HARPER et al.(2005) apontam que esse processo resulta em uma diferença detectável na composição, estrutura ou função próximo à borda, em comparação com o ecossistema em seu interior.

Os efeitos de borda são mudanças nas condições físicas e biológicas em um delimitado ecossistema. Efeitos de borda abióticos referem-se a mudanças nas variáveis físicas, como a umidade, temperatura, luminosidade, velocidade do vento e nutrientes do solo. Efeitos de borda bióticos são mudanças em variáveis biológicas, tais como a composição de espécies, padrões de competição, predação e parasitismo; e a

profundidade de penetração dos efeitos de borda podem variar muito de dezenas de a vários quilômetros (FISCHER; LINDENMAYER, 2007; HARPER et al., 2005).

Alguns estudos monitoram essas taxas de carbono estocadas nas florestas, na forma de biomassa e tem-se notado que as árvores de grande porte e, portanto, as que possuem maior biomassa, não estão resistindo aos efeitos da fragmentação pois não toleram o microclima das bordas do fragmento (FINEGAN et al., 2015; RÉJOU-MÉCHAIN et al., 2014). No entanto, pouco se sabe acerca dos efeitos da fragmentação no estoque de carbono e quais os padrões estabelecidos na sucessão e estrutura da comunidade fúngica diante da fragmentação intensa dos ecossistemas.

Portanto algumas questões necessitam de serem aprofundadas, como por exemplo a relação existente entre a dinâmica do ciclo do carbono e as taxas de decomposição. Dessa forma, esse trabalho tratou de duas escalas de discussão: escala microecológica procurando reconhecer e identificar a comunidade de fungos presente nos substratos lignocelulósicos; avaliar o processo de sucessão dessa comunidade ao longo do tempo; identificar a constituição bioquímica do substrato e sua variação ao longo do tempo; e em escala macroecológica avaliar o efeito da borda sobre o processo de decomposição, identificando as possíveis diferenças no microclima e na comunidade de fungos, além de avaliar a constituição do substrato e estado de degradação em função da sua posição no fragmento florestal como borda e interior na mata.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi descrever o processo de degradação da madeira num fragmento de Mata Atlântica, Floresta Ombrófila Densa, avaliando a variação das espécies de fungos que ocorrem ao longo de dois anos de estudo e a variação dos compostos bioquímicos (lignina, celulose, hemicelulose, nitrogênio) presentes nos galhos das árvores. Objetivou ainda avaliar possíveis diferenças no processo de decomposição no interior e na borda do fragmento pela estrutura da comunidade fúngica.

Objetivos específicos

- Identificar molecularmente as espécies de fungos que ocorrem ao longo do tempo nos galhos em decomposição para caracterizar a comunidade.
- Quantificar os teores de lignina, celulose, hemicelulose e nitrogênio nos galhos em decomposição ao longo do tempo.
- Caracterizar o microclima dos diferentes pontos de amostragem.
- Associar a estrutura e sucessão da comunidade com a variação bioquímica da madeira.
- Correlacionar os padrões da comunidade fúngica e a bioquímica da madeira em função da borda e interior do fragmento florestal.

Hipóteses

- Há o aumento na riqueza de OTUs ao longo do tempo.

- Não há uma especificidade por substrato em florestas tropicais, a influência é determinada pela distância espacial.
- A borda desacelera o processo de decomposição: a comunidade fúngica e a taxa de degradação da madeira.

Material e Métodos

Área de estudo

O fragmento selecionado para a realização do estudo foi o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), localizado no município de São Paulo, capital do estado de São Paulo – Brasil. O PEFI possui vegetação característica de Mata Atlântica, ocupado principalmente por Floresta Ombrófila Densa Montana Atlântica, com elementos de Floresta Ombrófila Mista e Estacional Semidecídua, localizado à latitude 23°38'08"S a 23°40'18"S e longitude 46°36'48"O a 46°38'00"O. Com uma área total de 495 ha, o parque possui clima úmido mesotérmico e temperatura média anual de 19,1°C (PLANO DE MANEJO DO PEFI, 2008).

O Parque possui o maior fragmento de Mata Atlântica inserido na área urbana da região metropolitana de São Paulo, as nascentes do Riacho do Ipiranga (várias delas totalmente preservadas), uma rede hídrica com vários corpos d'água preservados, muitos exemplares de fauna silvestre e a presença de espécies ameaçadas de extinção. Entretanto, o Parque é um fragmento isolado, a cerca de 25 km do Parque Estadual da Serra da Cantareira e de 17 km das matas situadas ao redor da represa Billings e, além disso os espaços entre os fragmentos florestais são ocupados por densas áreas urbanas e, as poucas áreas verdes existentes, são constituídas na sua maioria, por espécies exóticas. Tal situação dificulta a permeabilidade e a conectividade genética entre os fragmentos (PLANO DE MANEJO DO PEFI, 2008). Esse fato promove a existência de bordas florestais muito abruptas, geradas pela urbanização intensa da vizinhança, facilitando a geração de impactos, principalmente no que tange os efeitos de borda.

Autorização SisGen

Conforme Portaria SECEX/CGEN nº 1, de 3 de outubro de 2017, o SisGen foi implementado e disponibilizado no dia 6 de novembro de 2017. Como solicitado na legislação, o cadastro foi realizado sob o número de registro: A8EB7CB (**Anexo 1 – Comprovante SisGen**).

Desenho experimental e amostragem

Para o estudo, foram selecionadas três espécies de plantas arbóreas (**Tabela 1**), típicas da flora brasileira, que ocorrem no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, onde esse trabalho foi desenvolvido, e representam as espécies com maior Valor de Importância (IVI)¹ segundo o estudo de TANUS et al. (2012).

Tabela 1 – Espécies arbóreas selecionadas para o estudo.

Espécie	Família	Grupo sucessional
<i>Alchornea sidifolia</i> Müll. Arg.	Euphorbiaceae	Pioneira
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F.Macbr.	Fabaceae	Pioneira tardia
<i>Calypttranthes grandifolia</i> O.Berg.	Myrtaceae	Secundária

As plantas foram identificadas com o auxílio de literatura e botânicos especialistas (MELHEM et al., 1981). As espécies de árvores escolhidas estavam

¹ O IVI da espécie, proposto por CURTIS; MCINTOSH (1951), é obtido pela somatória dos valores relativos da abundância (nº de indivíduos da espécie / nº total de indivíduos), frequência (nº de parcelas em que ocorre a espécie / soma do nº de parcelas em que ocorre a espécie, para todas as espécies) e dominância dos indivíduos de cada espécie registrada na amostra (área seccional total dos indivíduos da espécie / área seccional total de todos os indivíduos das espécies) (SALOMÃO; SANTANA; NETO, 2012).

Das espécies selecionadas, galhos² visualmente saudáveis foram cortados diretamente das árvores para o experimento. De diâmetro entre 3 e 5 cm, os galhos selecionados foram cuidadosamente e com a menor manipulação possível acomodados no chão, simulando uma queda natural dos galhos na natureza (**Figura 2**).



Figura 2 – Montagem do experimento em campo. As setas em amarelo indicam alguns dos galhos que foram selecionados para o experimento.

No tempo 0 (zero) foram coletadas amostras da porção terminal do galho em experimento, aproximadamente 2 cm de comprimento. Dessa alíquota, foram separadas uma porção para os testes bioquímicos e uma porção para identificação da micota. O experimento foi realizado em triplicata, assim, foram três galhos do mesmo indivíduo que foram amostrados em cada tratamento ao longo do trabalho (**Figura 3**). A

Tabela 3 demonstra a divisão dos tempos de coleta nos quadrimestres.

² Agrupados dentro da categoria “*dead branches*”, segundo a classificação dos grupos funcionais de substratos lignocelulolíticos (Urcelay & Robledo 2004, Borba-Silva *et al.* 2015)

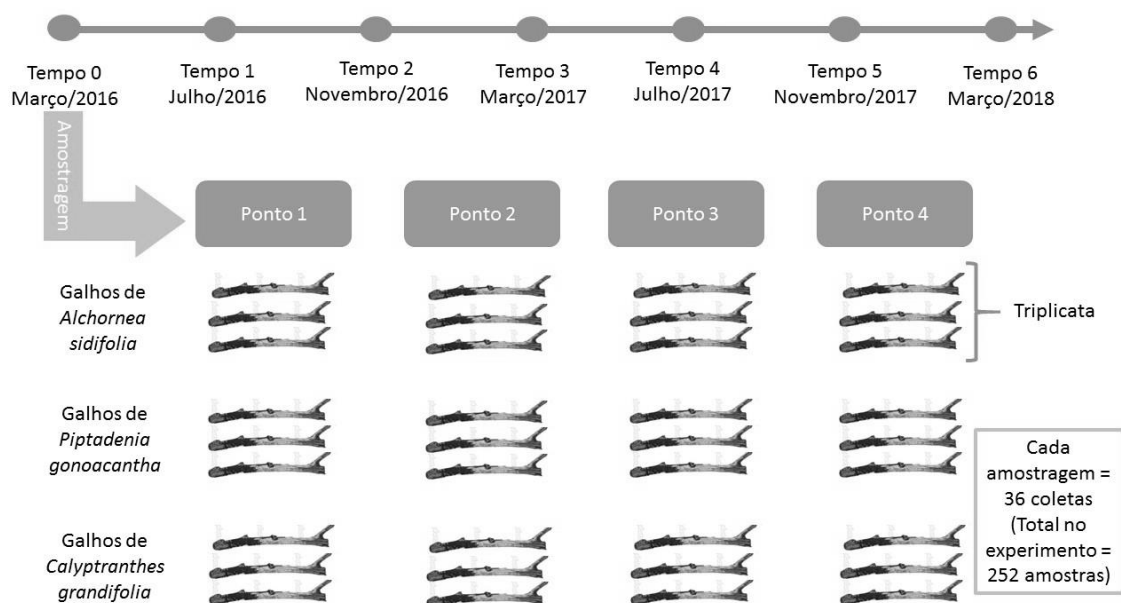


Figura 3 – Esquema do desenho amostral.

Tabela 3 – Divisão dos quadrimestres de amostragem.

Tempos	Correspondência em meses	Mês da coleta
Tempo 0	Março/2016 – Início do experimento, amostras retiradas diretamente dos galhos, antes de serem colocadas no solo.	Março/2016
Tempo 1	Março/2016 a Junho/2016	Julho/2016
Tempo 2	Julho/2016 a Outubro/2016	Novembro/2016
Tempo 3	Novembro/2016 a Fevereiro/2017	Março/2017
Tempo 4	Março/2017 a Junho/2017	Julho/2017
Tempo 5	Julho/2017 a Outubro/2017	Novembro/2017
Tempo 6	Novembro/2017 a Fevereiro/2018	Março/2018

Análise bioquímica da madeira

Das porções dos ramos das amostras coletadas foram realizados os cálculos da densidade básica (TRUGILHO et al., 1990). Adicionou-se aproximadamente 70 mL de água destilada em Becker de 100 mL e em seguida as amostras foram adicionadas individualmente cada uma em um Becker diferente. O conjunto foi colocado em

dessecador e submetido à vácuo até completa submersão das amostras dos galhos na água. As amostras foram inseridas em proveta com volume inicial de água destilada conhecido e o volume foi determinado pela diferença entre o volume inicial e o deslocado. Logo após as medições, as amostras foram secas em estufa à 105°C por 1 hora (ou até peso constante) e pesados em balança analítica. A densidade básica foi obtida a partir da seguinte fórmula (TRUGILHO et al., 1990):

$$DB = \frac{PAS}{VAAg - VAg} \text{ onde,}$$

DB = Densidade Básica da amostra (g/mL);

PAS = Peso da amostra absolutamente seca (g);

VAAg = Volume da amostra imersa mais o conteúdo de água (mL);

VAg = Volume de água (mL)

Depois de determinada a densidade básica, a madeira foi previamente seca em temperatura ambiente, seccionada em cavacos e depois disso moída em um moinho de facas até passarem por uma malha com perfurações de 0,75 mm. As amostras moídas foram submetidas a extração por 6 horas em Soxhlet com etanol 95%. O teor de componentes solúveis em etanol (extrativos) foi calculado através da massa inicial e após a extração, sendo a diferença entre elas o teor de extrativos.

O teor de componentes (celulose, polioses e lignina,) foi determinado a partir da hidrólise do material residual livre de extrativos com H₂SO₄ 72% (FERRAZ et al., 2000). Cerca de 300 mg de amostra seca ao ar foram tratados com 3 mL de H₂SO₄ 72% (peso/peso) por uma hora a 30°C. Em seguida, ao conteúdo do tubo de ensaio foi adicionado 79 mL de água. A mistura foi autoclavada a 121°C por 60 min., resfriada e

avolumada a 200 mL. Após isso, filtrada em filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3, previamente secos a 105°C e pesados.

O material retido corresponde à lignina insolúvel em ácido (Klason). O teor de lignina insolúvel foi feito através do método de gravimetria. Onde foi anotado o valor residual de sólidos retidos no filtro e relacionando-o com a quantidade inicial de material utilizado para as análises de caracterização química.

O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura em 205 nm de uma diluição 1:10 do hidrolisado, tomando-se como padrão uma absortividade de 105 L/g.cm neste comprimento de onda (DENCE, 1992).

O filtrado foi também analisado quanto aos teores de açúcares em um sistema de cromatografia líquida. A análise cromatográfica foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando uma coluna BIORAD HPX-87H, aquecida a 45°C e H₂SO₄ 5 mM a 0,6 mL/min como eluente e um detector de índice de refração (SHIMADZU).

A concentração de açúcares foi determinada através de curvas de calibrações preparadas com padrões de grau analítico, secos sob sílica e vácuo. A celulose foi obtida através da detecção em sua forma monomérica, de unidades de glicose. A hemicelulose (polioses) foi obtida através da detecção de suas formas monoméricas: xiloses (das cadeias de xilana), arabinose e ácido acético (grupos pendentos presente nas cadeias de xilana nas formas arabinosil e acetil).

Análise de Carbono e Nitrogênio

O conteúdo de nitrogênio na madeira foi quantificado; apesar de ser um elemento raro na madeira (HOPPE et al., 2014; STOKLAND; SIITONEN; JONSSON, 2012),

a comunidade fúngica (e bacteriana) tem relação com a concentração de nitrogênio e este elemento está envolvido na dinâmica de decomposição da madeira. As amostras liofilizadas³ foram esmagados usando um moinho de bolas (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany) para homogeneizar as amostras. Os conteúdos de Carbono (%C) e nitrogênio (%N) das amostras e sua assinatura isotópica foram mensurados pesando subamostras de 10 mg em copos de combustão de estanho para análise elementar. Razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ foram medidos pela combustão de Dumas (1 020°C) em um analisador elementar (EA Flash 2000; Thermo Scientific, Bremen, Germany) acoplado em modo de fluxo contínuo a um espectrômetro de massa Delta V Advantage isotope ratio (Thermo Scientific).

Acetanilida (Merck, Darmstadt, Germany) e padrões do solo (Elemental Microanalysis, Okehampton, UK) foram utilizados como calibração de massa do analisador elementar. Como padrão de trabalho para a análise da razão de isótopos, usamos gases puros de CO_2 e N_2 , calibrados contra materiais de referência certificados de ^{13}C -sucrose e ^{15}N -(NH_4) $_2\text{SO}_4$, respectivamente (IAEA, Vienna, Austria). As razões isotópicas de C ($\delta^{13}\text{C}$) e N ($\delta^{15}\text{N}$) são apresentadas como por mil (‰) em δ -notação ($\delta = [\text{R}_{\text{amostra}}/\text{R}_{\text{padrão}} - 1] * 1\,000$; *R depicting $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ ratios*). As amostras secas homogeneizadas foram analisadas em um analisador Antaris II Fourier-transform NIR (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA) em *vials* de vidro em um amostrador automático RS. Cada amostra foi analisada cinco vezes com *repacking* para uma faixa espectral entre 4 000–10 000/cm, cada média do espectro com 32 varreduras.

³ As amostras vieram do pó da madeira obtida com furadeira, usada nas extrações de DNA.

Análise dos fatores abióticos

A caracterização do microclima (temperatura, umidade absoluta do ar e umidade relativa do ar) foi feita com a utilização de registradores digitais autônomos de temperatura e umidade relativa com exatidão de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $\pm 2,5\%$, respectivamente, programados para armazenar a média de 60 minutos das interrogações realizadas a cada dois segundos ao elemento sensor. Os equipamentos foram instalados nos 4 locais de amostragem próximos aos galhos, a aproximadamente 20 cm do nível do solo. Os sensores foram instalados nos miniabrigos de ventilação passiva desenvolvidos por ARMANI; GALVANI (2006) (**Figura 4**).



Figura 4 – Sensores para caracterização microclimática no campo instalados em miniabrigos de ventilação passiva.

O resgate dos dados foi realizado a cada quatro meses por meio do programa BoxCar® Pro (versão 4.3.1.1) que descarregava e reprogramava os registradores para continuar em operação sem interromper a série de dados.

Além dos dados de variação de temperatura e umidade, foram consultados os dados de pluviosidade obtidos pela estação meteorológica do Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo (IAG-USP), localizado dentro do PEFI. A pluviosidade foi medida pelo pluviógrafo instalado no cercado meteorológico, enquanto que os pluviômetros do tipo Ville de Paris e dois do tipo Paulista foram utilizados para a acumulação de chuva às 07h, 14h, 21h e 24h e a precipitação diária.

Análise da estrutura da comunidade

Extração de DNA

Para extrair o DNA das amostras foi preciso fragmentá-las, transformando-as em pó. Para isso, foi utilizada uma furadeira e uma broca de 4 mm (HOPPE et al., 2015; HU et al., 2017; KUBART et al., 2015). Cada amostra foi fixada em uma morsa fixa de bancada previamente esterilizada com lança-chamas de autoignição (**Figura 5**). Aproximadamente 1,5 a 3 g de material fragmentado foram armazenados em tubos Falcon estéreis.



Figura 5 – Laboratório da Universidade de Copenhagen. Fragmentação das amostras com furadeira e broca.

Depois da pulverização de todas as amostras, perfazendo um total de 246 amostras⁴, foi realizada a extração do DNA com DNeasy PowerSoil™ DNA Isolation Kit (QUIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A massa inicial de madeira pulverizada foi entre 50 a 120 mg⁵. Para quantificar o material extraído, foi utilizado Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

Depois de normalizar todas as amostras a 1 ng μL^{-1} de DNA, as PCRs foram feitas com as seguintes alíquotas, 14,6 μL de água ultrapura, 0,2 μL de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, 2,5 μL de PCR buffer (10x), 2,5 μL de MgCl_2 , 1 μL de BSA⁶ (20 mg mL^{-1}), 0,2

⁴ Durante as coletas em campo, seis amostras não foram mais encontradas, PJC 2 (P2/Tempo 5), ALC 1 (P1/Tempo 6), ALC 3 (P1/Tempo 6), ALC 2 (P2/Tempo 6), PJC 2 (P2/Tempo 6) e ALC 1 (P4/Tempo 6). Provavelmente, os galhos foram completamente decompostos ou algum animal, ou mesmo a chuva os tenha removido dos locais do experimento.

⁵ Essa diferença de 50 a 120 mg da massa é devido a variabilidade da densidade da madeira e grau de umidade das amostras.

⁶ Bovine Serum Albumin (BSA).

μL de dNTP mix (25 nM), 1,5 μL de *forward primer*, 1,5 μL de *reverse primer* e 1 μL de amostra de DNA. O volume final foi de 25 μL para cada reação.

Os *primers* usados foram gITS7 (GTGAATCATCGAATCTTTG) como *forward* (IHRMARK et al., 2012) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) como *reverse* (WHITE et al., 1990). Cada amostra foi marcada com diferentes pares de *primers* (**Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10**) (**Anexo 2 – Códigos usados para nomear as amostras**).

Os parâmetros usados nas PCRs foram desnaturação inicial a 95°C por 5 min., 31 ciclos de amplificação a 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min., e extensão final a 72°C por 7 min. O resultado foi qualificado em gel de agarose a 1% com 2.5 μL de GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. O gel de electrofoorese foi feito com 5 μL de produto de PCR, 5 μL de *loading* DNA e 1 μL de DNA *ladder*.

Tabela 4 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 1 (Tempo 0). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_01			R1A_02			R1A_03			R1A_04			R1A_05		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
1	ITS4_001	gITS7_001	9	ITS4_009	gITS7_009	17	ITS4_017	gITS7_017	25	ITS4_025	gITS7_025	33	ITS4_033	gITS7_033
2	ITS4_002	gITS7_002	10	ITS4_010	gITS7_010	18	ITS4_018	gITS7_018	26	ITS4_026	gITS7_026	34	ITS4_034	gITS7_034
3	ITS4_003	gITS7_003	11	ITS4_011	gITS7_011	19	ITS4_019	gITS7_019	27	ITS4_027	gITS7_027	35	ITS4_035	gITS7_035
4	ITS4_004	gITS7_004	12	ITS4_012	gITS7_012	20	ITS4_020	gITS7_020	28	ITS4_028	gITS7_028	36	ITS4_036	gITS7_036
5	ITS4_005	gITS7_005	13	ITS4_013	gITS7_013	21	ITS4_021	gITS7_021	29	ITS4_029	gITS7_029	Blk	ITS4_037	gITS7_037
6	ITS4_006	gITS7_006	14	ITS4_014	gITS7_014	22	ITS4_022	gITS7_022	30	ITS4_030	gITS7_030	Blk	ITS4_038	gITS7_038
7	ITS4_007	gITS7_007	15	ITS4_015	gITS7_015	23	ITS4_023	gITS7_023	31	ITS4_031	gITS7_031	Blk	ITS4_039	gITS7_039
8	ITS4_008	gITS7_008	16	ITS4_016	gITS7_016	24	ITS4_024	gITS7_024	32	ITS4_032	gITS7_032	Blk	ITS4_040	gITS7_040

Tabela 5 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 2 (Tempo 1). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_06			R1A_07			R1A_08			R1A_09			R1A_10		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
37	ITS4_041	gITS7_041	45	ITS4_049	gITS7_049	53	ITS4_057	gITS7_057	61	ITS4_065	gITS7_065	69	ITS4_073	gITS7_073
38	ITS4_042	gITS7_042	46	ITS4_050	gITS7_050	54	ITS4_058	gITS7_058	62	ITS4_066	gITS7_066	70	ITS4_074	gITS7_074
39	ITS4_043	gITS7_043	47	ITS4_051	gITS7_051	55	ITS4_059	gITS7_059	63	ITS4_067	gITS7_067	71	ITS4_075	gITS7_075
40	ITS4_044	gITS7_044	48	ITS4_052	gITS7_052	56	ITS4_060	gITS7_060	64	ITS4_068	gITS7_068	72	ITS4_076	gITS7_076

R1A_06			R1A_07			R1A_08			R1A_09			R1A_10		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
41	ITS4_045	gITS7_045	49	ITS4_053	gITS7_053	57	ITS4_061	gITS7_061	65	ITS4_069	gITS7_069	Blk	ITS4_077	gITS7_077
42	ITS4_046	gITS7_046	50	ITS4_054	gITS7_054	58	ITS4_062	gITS7_062	66	ITS4_070	gITS7_070	Blk	ITS4_078	gITS7_078
43	ITS4_047	gITS7_047	51	ITS4_055	gITS7_055	59	ITS4_063	gITS7_063	67	ITS4_071	gITS7_071	Blk	ITS4_079	gITS7_079
44	ITS4_048	gITS7_048	52	ITS4_056	gITS7_056	60	ITS4_064	gITS7_064	68	ITS4_072	gITS7_072	Blk	ITS4_080	gITS7_080

Tabela 6 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 3 (Tempo 2). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_11			R1A_12			R1A_13			R1A_14			R1A_15		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
73	ITS4_009	gITS7_001	81	ITS4_017	gITS7_009	89	ITS4_025	gITS7_017	97	ITS4_033	gITS7_025	105	ITS4_041	gITS7_033
74	ITS4_010	gITS7_002	82	ITS4_018	gITS7_010	90	ITS4_026	gITS7_018	98	ITS4_034	gITS7_026	106	ITS4_042	gITS7_034
75	ITS4_011	gITS7_003	83	ITS4_019	gITS7_011	91	ITS4_027	gITS7_019	99	ITS4_035	gITS7_027	107	ITS4_043	gITS7_035
76	ITS4_012	gITS7_004	84	ITS4_020	gITS7_012	92	ITS4_028	gITS7_020	100	ITS4_036	gITS7_028	108	ITS4_044	gITS7_036
77	ITS4_013	gITS7_005	85	ITS4_021	gITS7_013	93	ITS4_029	gITS7_021	101	ITS4_037	gITS7_029	Blk	ITS4_045	gITS7_037
78	ITS4_014	gITS7_006	86	ITS4_022	gITS7_014	94	ITS4_030	gITS7_022	102	ITS4_038	gITS7_030	Blk	ITS4_046	gITS7_038
79	ITS4_015	gITS7_007	87	ITS4_023	gITS7_015	95	ITS4_031	gITS7_023	103	ITS4_039	gITS7_031	Blk	ITS4_047	gITS7_039
80	ITS4_016	gITS7_008	88	ITS4_024	gITS7_016	96	ITS4_032	gITS7_024	104	ITS4_040	gITS7_032	Blk	ITS4_048	gITS7_040

Tabela 7 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 4 (Tempo 3). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_16			R1A_17			R1A_18			R1A_19			R1A_20		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
109	ITS4_049	gITS7_041	117	ITS4_057	gITS7_049	125	ITS4_065	gITS7_057	133	ITS4_073	gITS7_065	141	ITS4_081	gITS7_073
110	ITS4_050	gITS7_042	118	ITS4_058	gITS7_050	126	ITS4_066	gITS7_058	134	ITS4_074	gITS7_066	142	ITS4_082	gITS7_074
111	ITS4_051	gITS7_043	119	ITS4_059	gITS7_051	127	ITS4_067	gITS7_059	135	ITS4_075	gITS7_067	143	ITS4_083	gITS7_075
112	ITS4_052	gITS7_044	120	ITS4_060	gITS7_052	128	ITS4_068	gITS7_060	136	ITS4_076	gITS7_068	144	ITS4_084	gITS7_076
113	ITS4_053	gITS7_045	121	ITS4_061	gITS7_053	129	ITS4_069	gITS7_061	137	ITS4_077	gITS7_069	Blk	ITS4_085	gITS7_077
114	ITS4_054	gITS7_046	122	ITS4_062	gITS7_054	130	ITS4_070	gITS7_062	138	ITS4_078	gITS7_070	Blk	ITS4_086	gITS7_078
115	ITS4_055	gITS7_047	123	ITS4_063	gITS7_055	131	ITS4_071	gITS7_063	139	ITS4_079	gITS7_071	Blk	ITS4_087	gITS7_079
116	ITS4_056	gITS7_048	124	ITS4_064	gITS7_056	132	ITS4_072	gITS7_064	140	ITS4_080	gITS7_072	Blk	ITS4_088	gITS7_080

Tabela 8 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 5 (Tempo 4). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_21			R1A_22			R1A_23			R1A_24			R1A_25		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
145	ITS4_017	gITS7_001	153	ITS4_025	gITS7_009	161	ITS4_033	gITS7_017	169	ITS4_041	gITS7_025	177	ITS4_049	gITS7_033
146	ITS4_018	gITS7_002	154	ITS4_026	gITS7_010	162	ITS4_034	gITS7_018	170	ITS4_042	gITS7_026	178	ITS4_050	gITS7_034
147	ITS4_019	gITS7_003	155	ITS4_027	gITS7_011	163	ITS4_035	gITS7_019	171	ITS4_043	gITS7_027	179	ITS4_051	gITS7_035
148	ITS4_020	gITS7_004	156	ITS4_028	gITS7_012	164	ITS4_036	gITS7_020	172	ITS4_044	gITS7_028	180	ITS4_052	gITS7_036

R1A_21			R1A_22			R1A_23			R1A_24			R1A_25		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
149	ITS4_021	gITS7_005	157	ITS4_029	gITS7_013	165	ITS4_037	gITS7_021	173	ITS4_045	gITS7_029	Blk	ITS4_053	gITS7_037
150	ITS4_022	gITS7_006	158	ITS4_030	gITS7_014	166	ITS4_038	gITS7_022	174	ITS4_046	gITS7_030	Blk	ITS4_054	gITS7_038
151	ITS4_023	gITS7_007	159	ITS4_031	gITS7_015	167	ITS4_039	gITS7_023	175	ITS4_047	gITS7_031	Blk	ITS4_055	gITS7_039
152	ITS4_024	gITS7_008	160	ITS4_032	gITS7_016	168	ITS4_040	gITS7_024	176	ITS4_048	gITS7_032	Blk	ITS4_056	gITS7_040

Tabela 9 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 6 (Tempo 5). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_26			R1A_27			R1A_28			R1A_29			R1A_30		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
181	ITS4_057	gITS7_041	189	ITS4_065	gITS7_049	198	ITS4_073	gITS7_057	206	ITS4_081	gITS7_065	214	ITS4_089	gITS7_073
182	ITS4_058	gITS7_042	190	ITS4_066	gITS7_050	199	ITS4_074	gITS7_058	207	ITS4_082	gITS7_066	215	ITS4_090	gITS7_074
183	ITS4_059	gITS7_043	191	ITS4_067	gITS7_051	200	ITS4_075	gITS7_059	208	ITS4_083	gITS7_067	216	ITS4_091	gITS7_075
184	ITS4_060	gITS7_044	192	ITS4_068	gITS7_052	201	ITS4_076	gITS7_060	209	ITS4_084	gITS7_068	Blk	ITS4_092	gITS7_076
185	ITS4_061	gITS7_045	193	ITS4_069	gITS7_053	202	ITS4_077	gITS7_061	210	ITS4_085	gITS7_069	Blk	ITS4_093	gITS7_077
186	ITS4_062	gITS7_046	195	ITS4_070	gITS7_054	203	ITS4_078	gITS7_062	211	ITS4_086	gITS7_070	Blk	ITS4_094	gITS7_078
187	ITS4_063	gITS7_047	196	ITS4_071	gITS7_055	204	ITS4_079	gITS7_063	212	ITS4_087	gITS7_071	Blk	ITS4_095	gITS7_079
188	ITS4_064	gITS7_048	197	ITS4_072	gITS7_056	205	ITS4_080	gITS7_064	213	ITS4_088	gITS7_072	Blk	ITS4_096	gITS7_080

Tabela 10 – Combinação de *primers* (Reverse – Forward) para a biblioteca 7 (Tempo 6). O código “Blk” é o controle (“Blank” samples). “Cód.” é o código de cada amostra.

R1A_21			R1A_22			R1A_23			R1A_24			R1A_25		
Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1	Cód.	R1	F1
218	ITS4_025	gITS7_001	228	ITS4_033	gITS7_009	237	ITS4_041	gITS7_017	246	ITS4_049	gITS7_025	Blk	ITS4_057	gITS7_033
220	ITS4_026	gITS7_002	229	ITS4_034	gITS7_010	238	ITS4_042	gITS7_018	247	ITS4_050	gITS7_026	Blk	ITS4_058	gITS7_034
221	ITS4_027	gITS7_003	231	ITS4_035	gITS7_011	239	ITS4_043	gITS7_019	248	ITS4_051	gITS7_027	Blk	ITS4_059	gITS7_035
222	ITS4_028	gITS7_004	232	ITS4_036	gITS7_012	240	ITS4_044	gITS7_020	249	ITS4_052	gITS7_028	Blk	ITS4_060	gITS7_036
223	ITS4_029	gITS7_005	233	ITS4_037	gITS7_013	241	ITS4_045	gITS7_021	250	ITS4_053	gITS7_029	Blk	ITS4_061	gITS7_037
224	ITS4_030	gITS7_006	234	ITS4_038	gITS7_014	242	ITS4_046	gITS7_022	251	ITS4_054	gITS7_030	Blk	ITS4_062	gITS7_038
225	ITS4_031	gITS7_007	235	ITS4_039	gITS7_015	243	ITS4_047	gITS7_023	252	ITS4_055	gITS7_031	Blk	ITS4_063	gITS7_039
226	ITS4_032	gITS7_008	236	ITS4_040	gITS7_016	245	ITS4_048	gITS7_024	Blk	ITS4_056	gITS7_032	Blk	ITS4_064	gITS7_040

PCR pooling e purificação

Todos os produtos de PCR de cada biblioteca foram combinados de acordo com os esquemas da **Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10.**

O volume usado foi baseado nas bandas de cada gel: 7,5 µL para bandas fracas, 5 µL para bandas de média intensidade e 2,5 µL para bandas fortes (**Tabela 11**). Os controles negativos foram incluídos nas bibliotecas.

Tabela 11 – Volume usado para combinar as bibliotecas (em µL). O código “Blk” é o controle (“Blank samples”)

Bib1	Volume (µl)	Bib2	Volume (µl)	Bib3	Volume (µl)	Bib4	Volume (µl)	Bib5	Volume (µl)	Bib6	Volume (µl)	Bib7	Volume (µl)
1	2,5	37	5	73	5	109	7,5	145	5	181	5	218	7,5
2	2,5	38	2,5	74	2,5	110	5	146	2,5	182	5	220	2,5
3	2,5	39	2,5	75	5	111	5	147	5	183	7,5	221	5
4	7,5	40	2,5	76	2,5	112	5	148	2,5	184	5	222	5
5	5	41	2,5	77	2,5	113	5	149	2,5	185	5	223	5
6	7,5	42	2,5	78	2,5	114	2,5	150	2,5	186	2,5	224	5
7	2,5	43	2,5	79	2,5	115	2,5	151	2,5	187	5	225	5
8	2,5	44	2,5	80	2,5	116	2,5	152	2,5	188	5	226	7,5
9	2,5	45	2,5	81	2,5	117	2,5	153	2,5	189	5	228	7,5
10	2,5	46	2,5	82	2,5	118	2,5	154	2,5	190	7,5	229	7,5
11	2,5	47	2,5	83	2,5	119	5	155	2,5	191	7,5	231	2,5
12	2,5	48	5	84	2,5	120	7,5	156	5	192	7,5	232	2,5
13	5	49	2,5	85	5	121	2,5	157	2,5	193	5	233	2,5
14	7,5	50	2,5	86	2,5	122	2,5	158	2,5	195	5	234	2,5
15	7,5	51	2,5	87	2,5	123	2,5	159	2,5	196	5	235	5
16	2,5	52	2,5	88	5	124	5	160	2,5	197	2,5	236	5
17	2,5	53	2,5	89	2,5	125	2,5	161	2,5	198	2,5	237	5
18	2,5	54	2,5	90	2,5	126	2,5	162	2,5	199	5	238	2,5
19	5	55	2,5	91	2,5	127	2,5	163	2,5	200	2,5	239	5
20	5	56	5	92	2,5	128	5	164	2,5	201	2,5	240	5
21	5	57	2,5	93	2,5	129	2,5	165	2,5	202	5	241	5
22	7,5	58	2,5	94	2,5	130	5	166	2,5	203	5	242	5

23	7,5	59	7,5	95	2,5	131	5	167	2,5	204	5	243	2,5
24	7,5	60	2,5	96	2,5	132	2,5	168	5	205	2,5	245	7,5
25	2,5	61	5	97	2,5	133	2,5	169	2,5	206	5	246	7,5
26	5	62	2,5	98	2,5	134	2,5	170	5	207	2,5	247	7,5
27	2,5	63	2,5	99	2,5	135	2,5	171	2,5	208	7,5	248	2,5
28	2,5	64	5	100	7,5	136	7,5	172	2,5	209	7,5	249	7,5
29	2,5	65	2,5	101	2,5	137	2,5	173	5	210	5	250	7,5
30	2,5	66	2,5	102	2,5	138	2,5	174	2,5	211	5	251	5
31	7,5	67	2,5	103	5	139	2,5	175	2,5	212	2,5	252	7,5
32	7,5	68	2,5	104	2,5	140	2,5	176	7,5	213	5	Blk	7,5
33	7,5	69	2,5	105	2,5	141	2,5	177	2,5	214	2,5	Blk	7,5
34	2,5	70	2,5	106	5	142	5	178	2,5	215	7,5	Blk	7,5
35	2,5	71	2,5	107	5	143	2,5	179	5	216	5	Blk	7,5
36	2,5	72	2,5	108	5	144	2,5	180	5	Blk	7,5	Blk	7,5
Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5
Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5
Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5
Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5	Blk	7,5
Vol. final	185	Vol. final	137,5	Vol. final	145	Vol. final	160	Vol. final	145	Vol. final	207,5	Vol. final	227,5

Para a purificação das oito bibliotecas foi usado MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. E para quantificar o DNA purificado foi usado Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen) com HS-High Sensitivity e Agilent 2100 Bioanalyzer.

Biblioteca Illumina TruSeq DNA PCR-free (LT)

As oito bibliotecas tiveram seus *ends repaired* e *library size* selecionados usando TruSeq® DNA PCR-Free Library Prep kit. Cada biblioteca começa com uma concentração inicial de $\cong 400$ ng, calculada baseada na concentração obtida pelo Qubit (**Tabela 12**).

Tabela 12 – Quantidade de amostra de reagentes (em μL).

Biblioteca	Amostras (400 ng)	Buffer de ressuspensão (RSB)	End Repair Mix (ERP2)	Volume Final
LIB 1	15.9	44.1	40	100
LIB 2	17.2	42.8	40	100
LIB 3	14.0	46.0	40	100
LIB 4	16.4	43.6	40	100
LIB 5	18.2	41.8	40	100
LIB 6	19.4	40.6	40	100
LIB 7	34.5	25.5	40	100
LIB BLANK	-	60	40	100

Em seguida, todas as amostras foram purificadas novamente usando MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) e um nucleotídeo 'A' foi adicionado ao final 3' dos fragmentos (Adenylate 3' ends). O próximo processo foi ligar adaptadores múltiplos de indexação para as extremidades dos fragmentos de DNA (**Tabela 13**) e purificados com Agencourt® AMPure® XP. Para quantificar o DNA purificado foi usado Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen) com HS-High Sensitivity e Agilent 2100 Bioanalyzer.

Tabela 13 – Índice de *primers* usados em cada biblioteca.

Bibliotecas	Index primers	Sequência
LIB 1	AD006	GCCAAT(A)
LIB 2	AD018	GTCCGC(A)
LIB 3	AD002	CGATGT(A)
LIB 4	AD019	GTGAAA(C)
LIB 5	AD016	CCGTCC(C)
LIB 6	AD005	ACAGTG(A)
LIB 7	AD014	AGTTCC(G)
LIB BLANK	AD007	CAGATC(A)

Combinação de bibliotecas

Após a quantificação, foi feita a combinação das amostras para o sequenciamento. A fórmula para calcular a concentração (em nM) foi: $[(\text{Concentração em ng } \mu\text{L}^{-1}) / (660 \text{ g/mol} * \text{tamanho médio da biblioteca})] * 10^6$, onde a concentração em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ é calculada a partir do resultado obtido no Qubit depois de ligar os adaptadores e a purificação com AMPure XP beads. O tamanho médio da biblioteca é descrito na

Tabela 14.

Tabela 14 – Quantificação de DNA após purificação da PCR.

Biblioteca	Qubit ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	BioAnalyser ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	BioAnalyser – tamanho do fragmento (Pares de base)	Tamanho médio + 120 bp (adaptadores, index)
LIB 1	25.2	24.9	306, 331, 342, 364, 436	476
LIB 2	23.2	17.2	308, 350, 361, 396	474
LIB 3	28.6	23.4	268, 309, 336, 349, 393	451
LIB 4	24.4	20.6	309, 349, 361, 383	471
LIB 5	22.0	17.5	312, 351, 382, 417, 510	514
LIB 6	20.6	14.6	280, 306, 350, 434, 457, 503	508
LIB 7	11.6	8.6	302, 313, 328, 348, 357, 384, 404, 452	481

Bioestatística

Primers e remanescentes de adaptadores foram removidos com um script personalizado baseado em *cutadapt* (MARTIN, 2013). Tabelas de OTU⁷ (tabela de local de espécies) foram construídas, visando uma definição de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) que se aproximem da delimitação de nível de espécie (ver FRØSLEV et al. 2017). Isso foi realizado por um processamento inicial com DADA2 (CALLAHAN et al., 2016) para identificar as variantes das sequências de amplicon exatas, seguida pela

⁷ operational taxonomic unit (OTU)

extração do ITS com ITSx (BENGTSSON-PALME et al., 2013) e subsequente agrupamento com VSEARCH (ROGNES et al., 2016) à 98,5 % – nível de agrupamento consenso usado para delimitar as hipóteses de espécies (HEs) na base de dados UNITE (KÖLJALG et al., 2013), e posterior curadoria pós-cluster usando LULU (FRØSLEV et al., 2017) para eliminar sequências redundantes restantes. A atribuição taxonômica das OTUs foi feita por correspondência das OTUs com VSEARCH através do banco de dados 2017 UNITE general FASTA release (<http://dx.doi.org/10.15156/BIO/587475>). Usamos 98, 90, 85, 80, 75 e 70% de identidade sequencial para designar OTUs para espécie, gênero, família, ordem ou classe e reino, respectivamente.

Tratamento estatístico

Depois de compilados todos os dados, foram agregados à tabela de OTUs, os dados referentes ao posicionamento das amostras (interior ou borda do fragmento) e Pontos (1 a 4); momento em que foram feitas as coletas (Tempo 0 a 6); fatores microclimáticos (chuva, temperatura, umidade relativa e umidade absoluta); componentes da madeira (lignina, celulose, hemiceluloses e extrativos); densidade da madeira; nitrogênio e carbono total. Para os descritores básicos de estatística foi utilizado o programa R (R CORE TEAM, 2017). Foi feita uma análise de Cluster (R CORE TEAM, 2017) com o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis usando o pacote Vegan versão 2.5-1 (OKSANEN et al., 2018), distância cofenética = 0,876. Para criar o mapa de calor das amostras foi utilizado o pacote gclus versão 1.3.1 (HURLEY, 2012)

Os estudos envolvendo a riqueza de OTUs foram realizados com análise de variância (ANOVA) quando os dados se apresentavam normais, e o teste de Kruskal-Wallis, quando os mesmos não seguissem a distribuição normal; ambas as análises no

programa R. Nos fatores abióticos foi utilizado a ANOVA de medidas repetidas, pois os dados coletados referiam-se às mesmas amostras numa sucessão temporal. Além disso, realizou-se também a regressão linear e a correlação para comparar os dados microclimáticos e a porcentagem de perda de massa das amostras.

Para a apresentação dos dados de ordenação da comunidade, foram feitas duas organizações, em função dos Tempos (0 a 6) e em função dos Pontos (1 a 4). E para todas as ordenações foi realizada uma análise de NMDS (Escalonamento multidimensional não-métrico) com a matriz de distância da comunidade fúngicas e os fatores abióticos como preditores lineares da ordenação.

Para as análises multivariadas, utilizou-se o pacote Vegan version 2.5-1 (OKSANEN et al., 2018). Foram realizadas as análises de NMDS, envfit⁸ e ANOVA multivariada permutacional (PERMANOVA). O mapa de calor das amostras foi criado utilizando-se o pacote gclus version 1.3.1 (HURLEY, 2012); e para criar o Diagrama de Venn, utilizou-se o pacote Limma (RITCHIE et al., 2015). A fim de verificar a distribuição dos filós de fungos entre as amostras, utilizou-se o pacote Phyloseq no R (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

⁸ Função que encaixa ou ajusta vetores ambientais na ordenação.

Resultados e Discussão

Descritores básicos das sequências e OTUs

O sequenciamento resultou num total de 1 861 279 *reads*, na somatória de todas as amostras de todos os tempos. Depois das sucessivas limpezas nos dados, de 3 037 OTUs foram deletados 728 (60 não-identificados em qualquer categoria taxonômica, 9 cercozoa, 3 Plantae, 1 Rotifera e 665 com $P \text{ Ident} < 70\%$), resultando em 2 309 OTUs usados nas análises. Desses, foram identificados 10 filos (**Figura 6**), 33 classes (**Figura 7**), 88 ordens, 177 famílias e 319 gêneros, considerando “não-identificados” (“*unidentified*”) como uma categoria em todos os níveis taxonômicos.

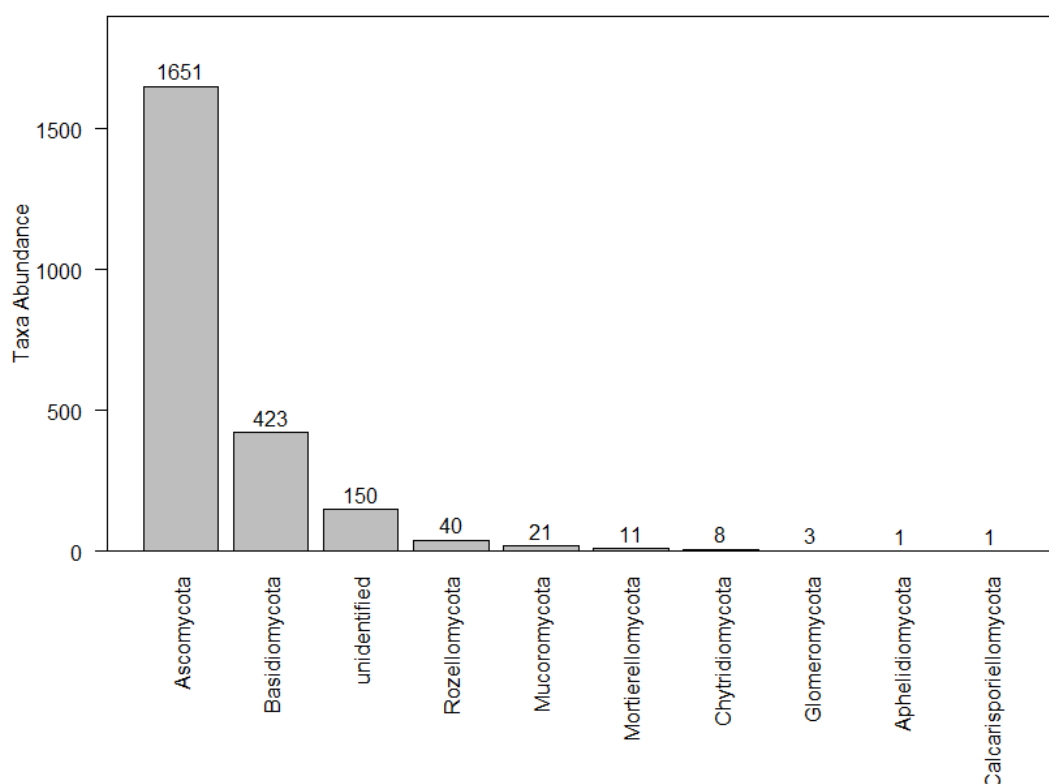


Figura 6 – Abundância de OTU entre os filos, na somatória de todas as amostras de todos os tempos.

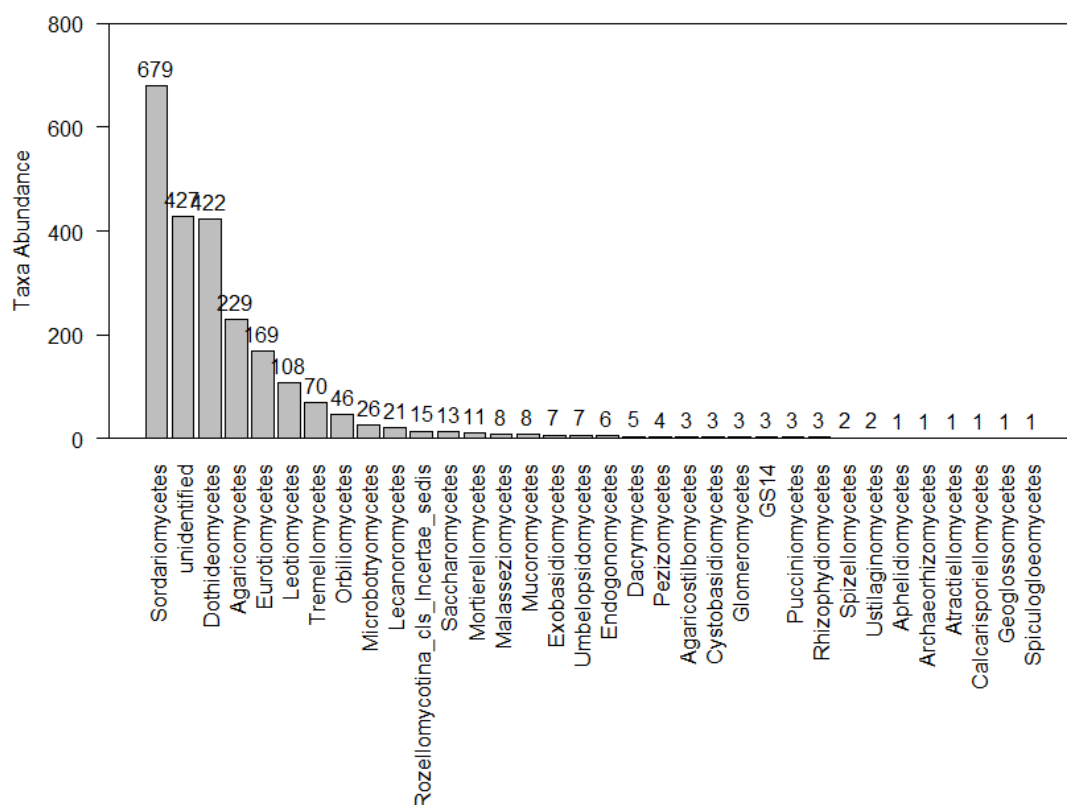


Figura 7 – Abundância de OTU entre as classes, na somatória de todas as amostras de todos os tempos.

Em outros trabalhos usando técnicas de Sequenciamento de Nova Geração a quantidade de OTUs é inferior à encontrada no presente estudo – 2 309 –, com algumas variações referentes a diferentes técnicas de amostragem e quantidade de amostras sequenciadas, além dos diferentes ecossistemas. Foram 525 OTUs em troncos de pinheiros no Japão (FUKASAWA; MATSUOKA, 2015), 616 em troncos de pinheiros na Estônia (RUNNEL; TAMM; LÖHMUS, 2015), 1 990 em troncos de abeto na Noruega (MÄKIPÄÄ et al., 2017), 1 914 em troncos de abeto na Suécia, outro estudo com 1 910, e outro com 1 355 OTUs (KUBARTOVÁ et al., 2012; OTTOSSON et al., 2015; KUBART et al., 2016).

Quando observada a riqueza de espécies nos diferentes filos, Ascomycota mostra-se o mais rico, com destaque para a classe Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka

que possui 15 ordens, 64 famílias, 1 119 gêneros, 10 564 espécies. e que contém a maioria dos ascomicetes periteciais não liquenizados com ascos não fissitunicados (KIRK et al., 2008) e podem ser sapróbios encontrados em madeira, no solo, em esterco ou ainda parasitas de plantas animais e humanos (TANG; JEEWON; HYDE, 2007). O filo Basidiomycota foi o segundo mais rico, tendo a classe Agaricomycetes Doweld como principal representante, e que possui 17 ordens, 100 famílias, 1 147 gêneros, 20 951 espécies e representa um dos principais grupos dentro do filo com representantes sapróbios, mutualísticos e parasitas. Os dados assemelham-se muito com os apresentados por VAZ et al. (2017), onde Sordariomycetas foi o grupo mais representativo, seguido por Dothideomycetes e Agaricomycetes. Com isso, é possível compreender quais grupos de fungos usam a madeira como substrato para seu desenvolvimento total ou parcial durante a vida.

Decomposição da madeira e os fatores abióticos

Para que se pudesse compreender o processo de decomposição da madeira, os valores da densidade da madeira dos galhos foram monitorados durante todo o experimento. As amostras do Tempo zero representam as densidades iniciais do processo, onde *Calyptrotrantes* possui a maior densidade 0,61 g/mL, seguido por *Piptadenia*, de densidade média, 0,40 g/mL e *Alchornea*, com a densidade mais baixa, 0,26 g/mL (**Figura 8**).

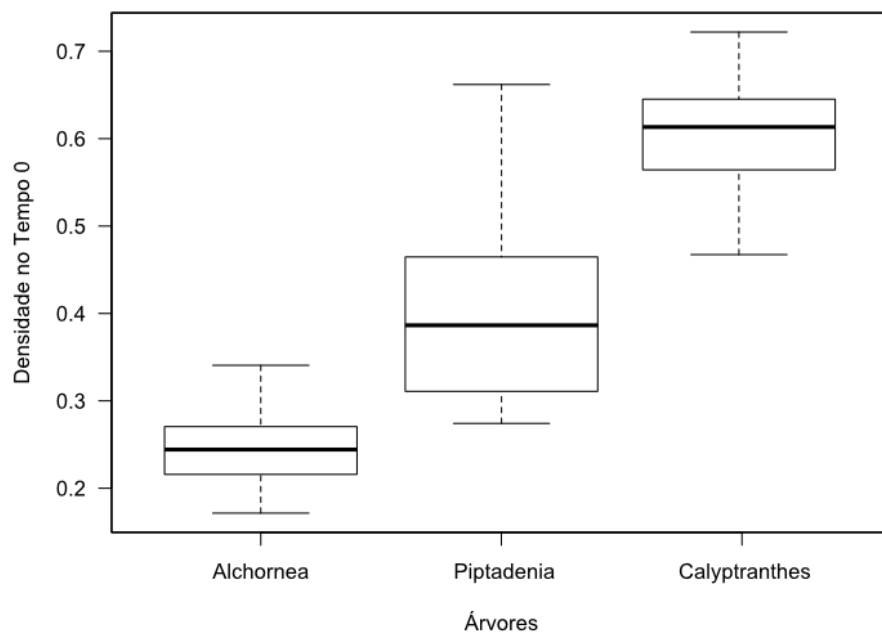


Figura 8 – Boxplot com as densidades das amostras do Tempo 0 (em g/mL).

Ao longo do experimento foi possível notar uma diminuição na densidade dos galhos, o que denota que houve perda de massa, ou conseqüentemente, decomposição. Entretanto, foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas que não apresentou diferenças significativas entre as médias ao longo do tempo ($p = 0,084$) (**Figura 9**). Apesar de quatro amostras terem sido supostamente decompostas totalmente, pois não foram mais encontradas no Tempo 6 durante as coletas, os demais galhos ainda se encontravam conspícuos no ambiente, ou seja, mais tempo seria necessário para a completa mineralização das amostras.

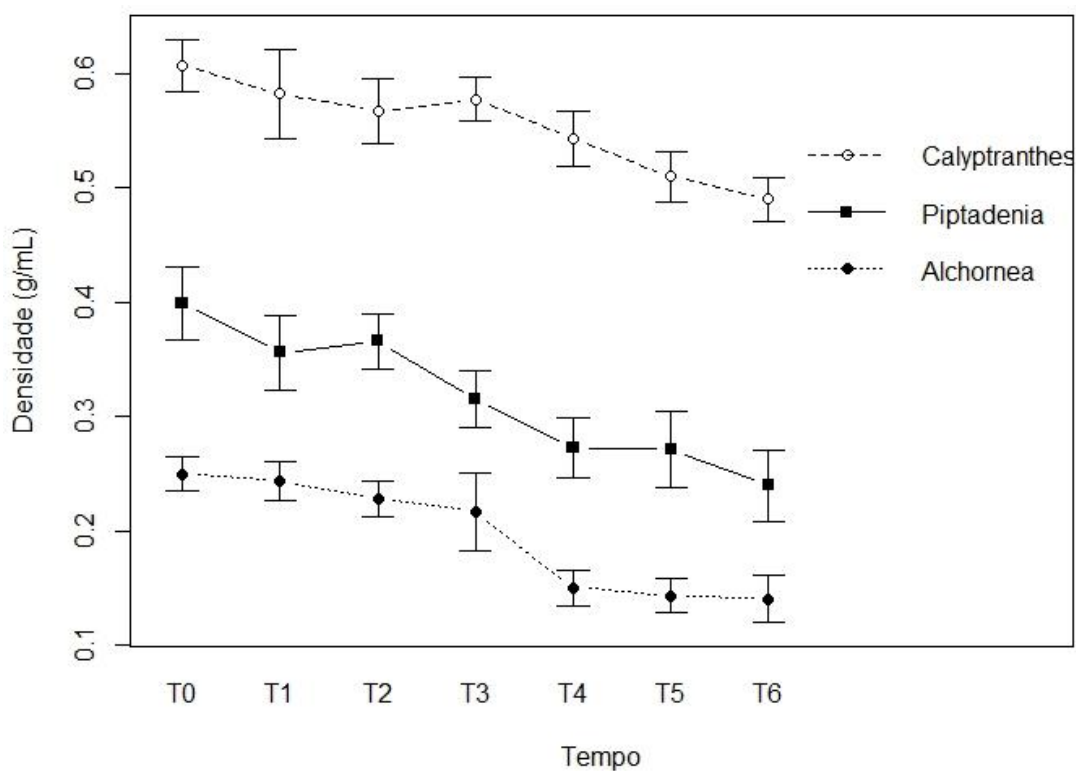


Figura 9 – Gráfico de linhas da média e erro padrão da densidade das amostras ao longo do tempo das três espécies arbóreas do estudo.

Quando comparada taxa de degradação (% de perda de massa) das amostras do Tempo 0 com o Tempo 6, foi notada bastante diferença entre os quatro pontos para as espécies de *Alchornea* e *Piptadenia* (**Figura 10**). Essa variação chegou a 30-35% entre os Pontos 1 e 2 com relação aos Pontos 3 e 4. As amostras de *Calyptranthes* demonstraram uma perda média (entre 15-25%) nos quatro Pontos estudados.

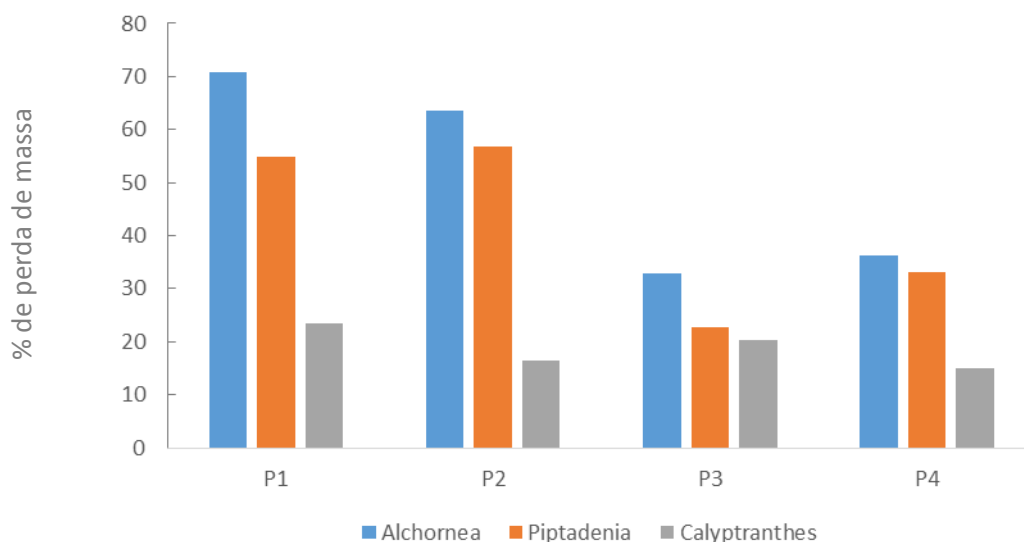


Figura 10 – Histograma da taxa de degradação (% de perda de massa) nos quatro Pontos.

Tais diferenças também foram reportadas por outros autores, como ANGERS; DRAPEAU; BERGERON (2011) que realizaram um trabalho com árvores em pé mortas, e MÄKINEN et al. (2006) que trabalharam com árvores em pé mortas e troncos caídos no chão da floresta de *Pinus sylvestris* L. e *Picea abies* (L.) Karst., onde foram notadas diferenças nas perdas de massa entre as diferentes espécies. Os fatores usados para descrever essa variação usado em ambos os trabalhos foram as condições microclimáticas que, por sua vez, influenciam a presença e atividade da comunidade de decompositores e, portanto, as taxas de mineralização.

Mas esses trabalhos apresentados são estudos com troncos de grande diâmetro, incluídos dentro da categoria *Coarse Woody Debris*⁹ (CWD). Neste presente trabalho, outro extrato do material em decomposição foi estudado, *Fine Woody Debris*¹⁰ (FWD), ou seja, galhos entre 2 a 10 cm de diâmetro. O estudo de SWIFT et al. (1976) com galhos de espécies de árvores em uma floresta na Inglaterra, cujas principais espécies são

⁹ Em tradução livre, “Resíduos lenhosos grossos”.

¹⁰ Em tradução livre, “Resíduos lenhosos finos”.

Carvalho, Freixo, Bétula e Azeiteira, mostrou que no solo da floresta, a taxa média anual de perda de peso na decomposição foi de 17,1%. Diferenças consideráveis nas taxas de decomposição foram observadas entre os ramos individuais e não foram encontradas diferenças significativas entre os ramos das quatro espécies de árvores investigadas.

Quando calculamos as porcentagens de perda de massa entre um Tempo e o seguinte, também é possível observar uma maior taxa nas espécies de *Alchornea* e *Piptadenia* (**Figura 11, Figura 12**). Numa ANOVA de medidas repetidas, foi possível notar uma diferença significativa entre as médias ($p = 0,001$). Ou seja, a perda de massa não é uniforme ao longo do tempo e é dependente de outros fatores, corroborando os achados de outros estudos (FRAVOLINI et al., 2018; HARMON et al., 2011; MÄKINEN et al., 2006; MEANS; CROMACK JR.; MACKMILLAN, 1985; ROMERO; SMITH; FOURQUREAN, 2005).

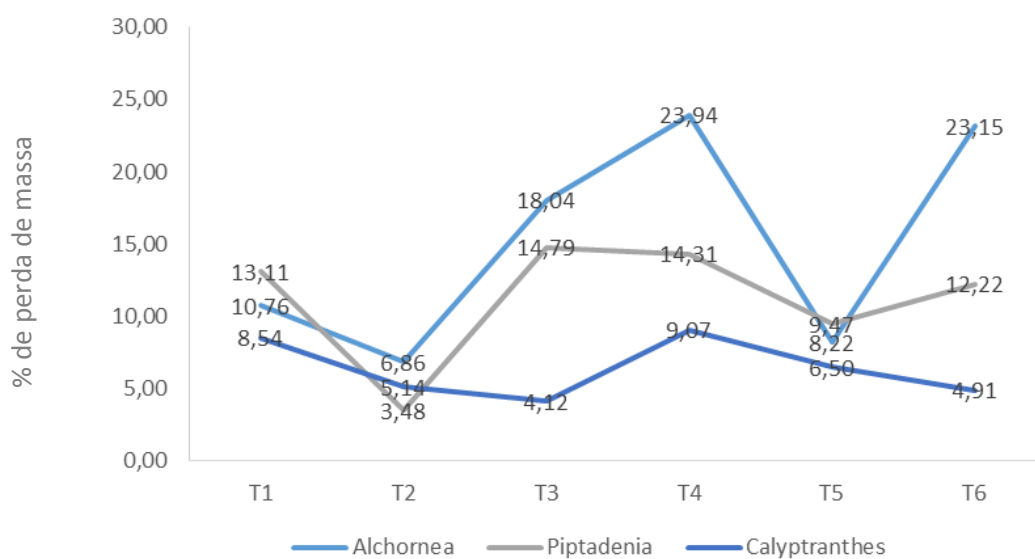


Figura 11 – Porcentagens de perda de massa entre um Tempo e o seguinte das três espécies de árvore.

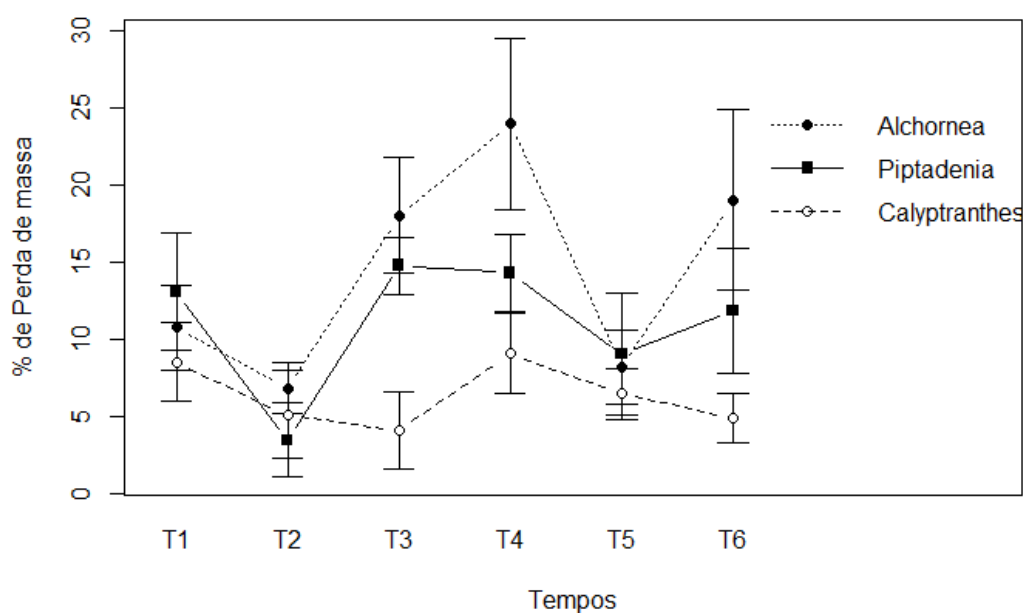


Figura 12 – Gráfico de linha da média e erro padrão da porcentagem de perda de massa entre um Tempo e o seguinte das três espécies de árvore.

Numa análise de correlação entre as porcentagens de perda e os fatores abióticos medidos nesse estudo (temperatura, chuva, umidade absoluta e umidade relativa), notou-se uma baixa correlação (**Tabela 15**). Num teste de regressão, apesar dos dados serem significativos (exceto em relação a umidade relativa), o valor do r^2 foi muito baixo, não passando de 5% de poder de explicação da correlação (**Figura 13**).

Tabela 15 – Correlação entre as porcentagens de perda e os fatores abióticos.

	Temperatura	Umidade Absol.	Umidade Relat.	Chuva	Perda
Temperatura	1	0,93	0,35	0,90	0,17
Umidade Absoluta	0,93	1	0,67	0,90	0,16
Umidade Relativa	0,35	0,67	1	0,48	0,08
Chuva	0,90	0,90	0,48	1	0,22
Perda	0,17	0,16	0,08	0,22	1

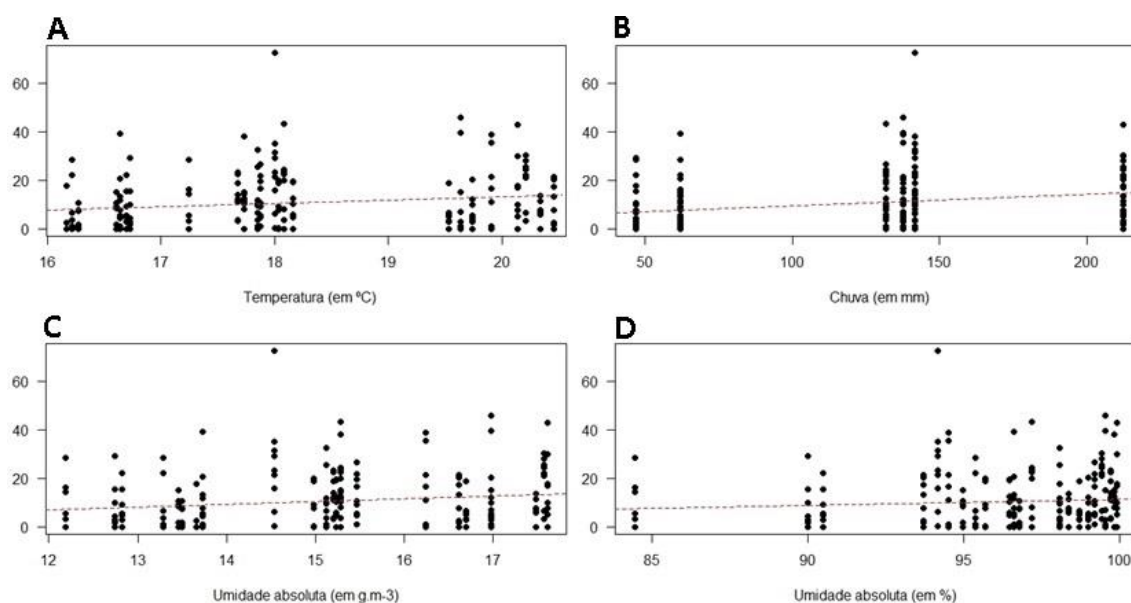


Figura 13 – Regressão linear entre as porcentagens de perda e os fatores microclimáticos: A. temperatura ($p = 0,012$ e $r^2 = 0,029$), B. chuva ($p = 0,001$ e $r^2 = 0,049$), C. umidade absoluta ($p = 0,017$ e $r^2 = 0,027$) e D. umidade relativa ($p = 0,25$ e $r^2 = 0,006$).

Com esses dados, pode-se inferir que o que determinou as maiores diferenças entre as perdas de massa está mais relacionado com os fatores bióticos, pois os quatro Pontos amostrados apresentaram pouca variação em termos de temperatura, umidade relativa e absoluta e chuva (que foi a mesma para os quatro pontos). Para um melhor entendimento dos fatores abióticos no processo de decomposição seria necessário escolher locais muito mais distantes geograficamente e de características fitogeográficas mais marcantes. Resultados semelhantes foram encontrados por MÄKINEN et al. (2006) e YATSKOV; HARMON; KRANKINA (2003), pois como as condições climáticas nas áreas amostradas eram bastante semelhantes, elas não tiveram nenhum efeito profundo na taxa de decomposição quando comparadas entre si.

Quanto à dinâmica do nitrogênio ao longo do experimento foi possível notar um aumento leve na massa desse elemento, principalmente nos galhos de *Calypttranthes* (Figura 14). Em *Piptadenia*, pode-se notar uma diminuição dos valores de nitrogênio nos Tempos 1 e 2 e posterior aumento. Os galhos de *Alchornea*, que possuem os valores

mais baixos de nitrogênio apresentaram um leve aumento na concentração, mas ainda dentro do intervalo de confiança. Uma ANOVA de medidas repetidas apresentou significantes diferenças entre as médias ao longo do tempo ($p < 0,001$), ou seja, há uma variação ao longo do tempo.

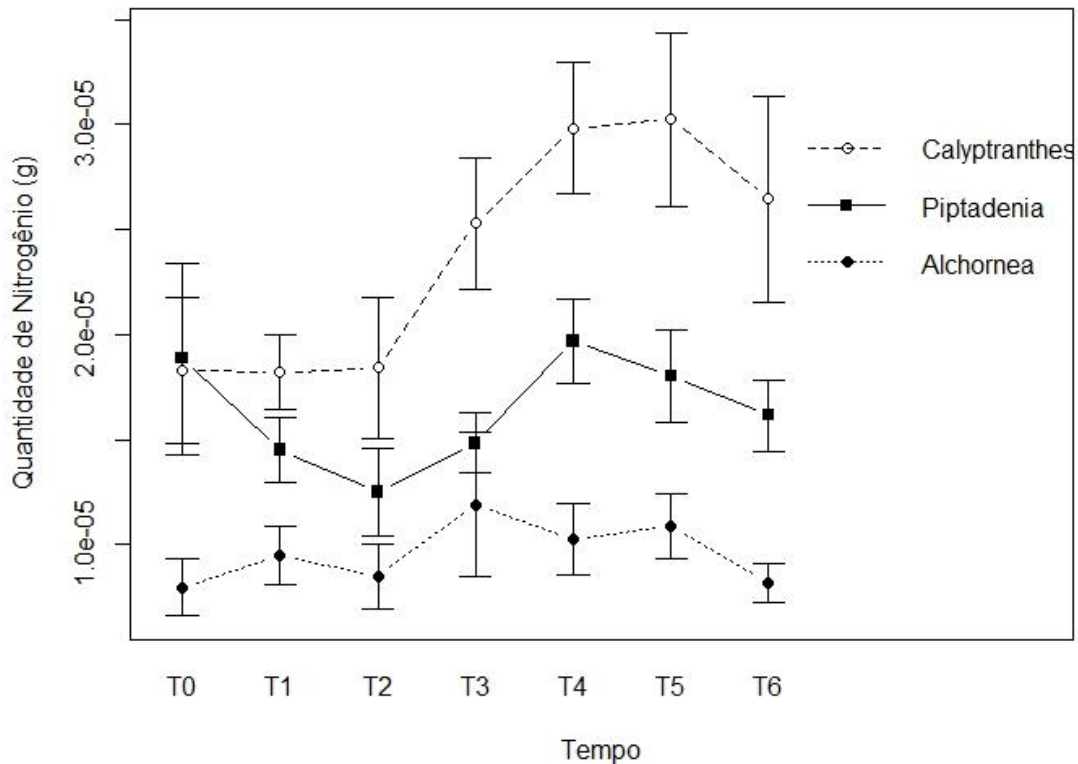


Figura 14 – Gráfico de linhas da média e erro padrão da quantidade de nitrogênio ao longo do tempo.

Os dados estão de acordo com a maioria dos trabalhos que estudam a dinâmica do nitrogênio na madeira em decomposição (FUKASAWA et al., 2014; MÄKIPÄÄ et al., 2017; ROMERO; SMITH; FOURQUREAN, 2005), onde a madeira – pobre em nitrogênio – tem seus teores aumentados graças a ação de fungos micorrízicos e formadores de rizomorfos, além de bactérias nitrificantes. Nos tempos iniciais do experimento, os valores de nitrogênio não aumentaram, ou seja, ele estava sendo usado pelos fungos (mineralização) (ROMERO; SMITH; FOURQUREAN, 2005). A partir do Tempo 3, o nitrogênio passa a aumentar – imobilização do nitrogênio. E esse uso mais intenso do

nutriente pode estar associado a grande riqueza e abundância de OTUs nos tempos iniciais.

Também foram analisados os teores de lignina, celulose, hemiceluloses e extrativos da madeira ao longo de todo o experimento (**Figura 15**). Com uma ANOVA de medidas repetidas apresentou diferenças significativas dos teores dessas moléculas ao longo do tempo, lignina ($p = 0,001$), celulose ($p = 0,003$), hemiceluloses ($p < 0,001$) e extrativos ($p < 0,001$). Isso indica que houve uma atuação efetiva dos fatores bióticos sobre as amostras.

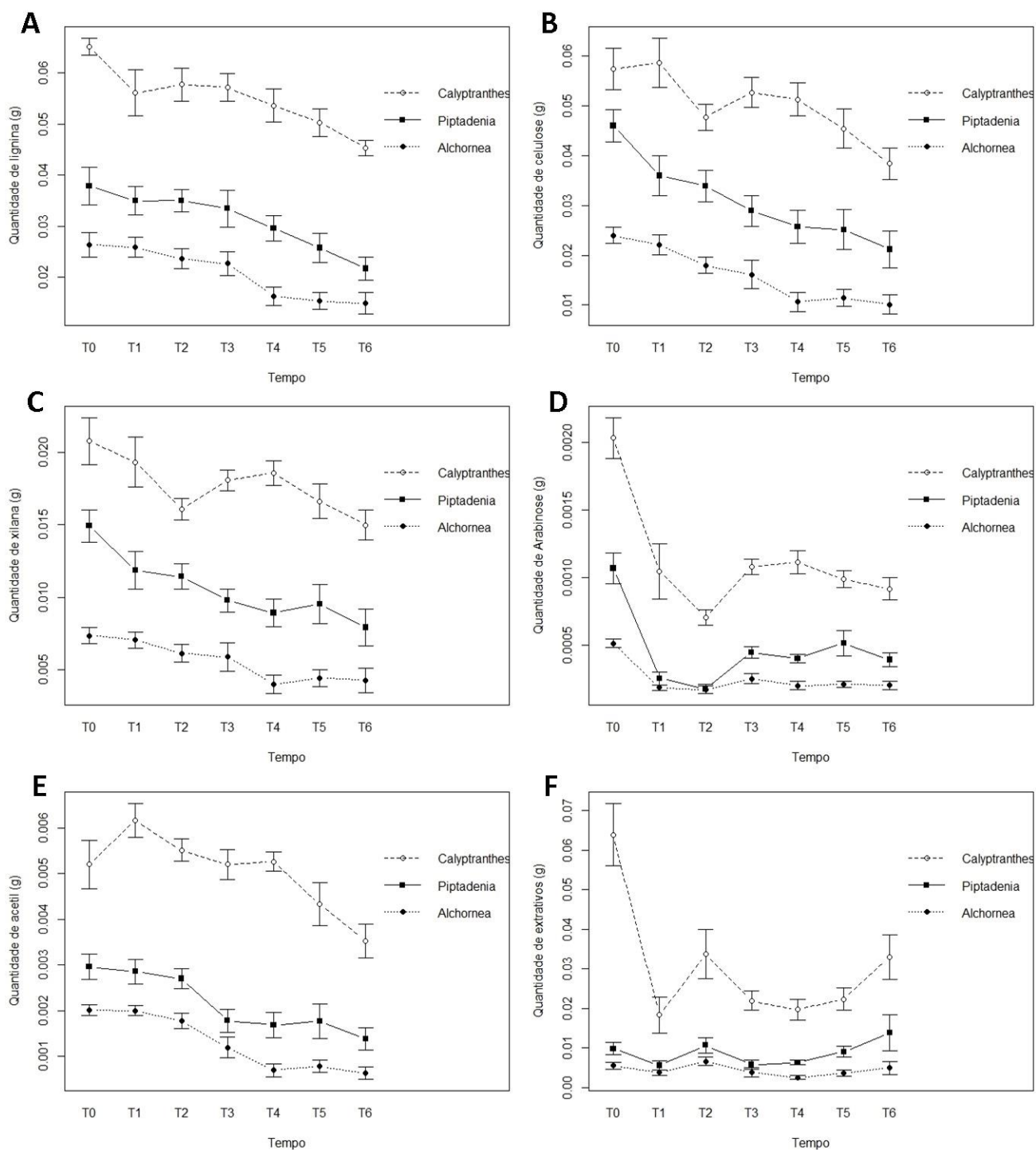


Figura 15 – Gráfico de linhas da média e erro padrão da quantidade de A. lignina, B. celulose, C-E. hemiceluloses (C. xilana, D. arabinose, E. acetil) e F. extrativos da madeira ao longo do tempo.

Assim como a perda de densidade, a porcentagem de decaimento das moléculas também foi mais acentuada nas amostras de *Alchornea* e *Piptadenia* e menor em *Calyptanthes* (Figura 16). Nos três substratos, a celulose foi o composto que mais foi consumido, seguido pelas hemiceluloses e, por fim a lignina, de mais difícil

mineralização, como é descrito em vários trabalhos sobre a degradação da lignina, uma molécula mais recalcitrante e que é responsável por reter o carbono por mais tempo em sua forma imobilizada (HARMON et al., 1986; SANTHANAM et al., 2012; SUTHERLAND et al., 1979).

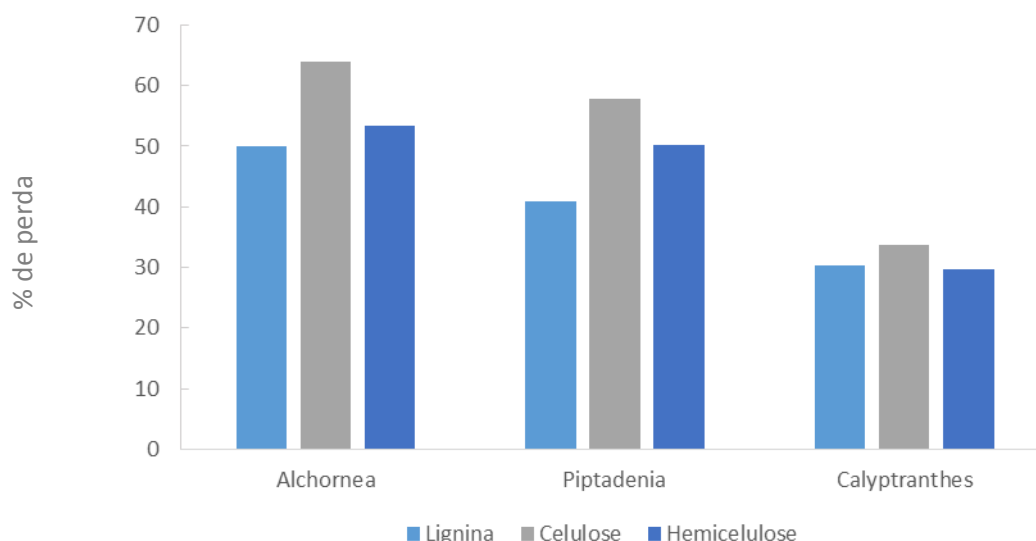


Figura 16 – Porcentagem de decaimento dos componentes da madeira.

Quando calculada a razão lignina/celulose, foi possível encontrar valores significativos de diferenças entre as razões médias entre os tempos na análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$) (**Figura 17**). E também a razão lignina/hemicelulose, com $p = 0,025$ (**Figura 18**). No trabalho de HARMON et al. (1986), os valores encontrados na razão lignina/celulose para troncos de madeira não-deteriorada variaram de 0,6 a 1,2 para angiospermas. Os dados obtidos no presente estudo são um pouco acima do apresentado, mas são referentes a galhos, de menor dimensão e estrutura da madeira. E tanto na razão lignina/celulose quanto lignina/hemicelulose é possível notar um incremento nas razões até o Tempo 4, ou seja, as celulosas e hemiceluloses são mais degradadas que a lignina e, a partir do Tempo 5

essa razão diminui, indicando o aparecimento de fungos mais especialistas na degradação da lignina (**Figura 19**).

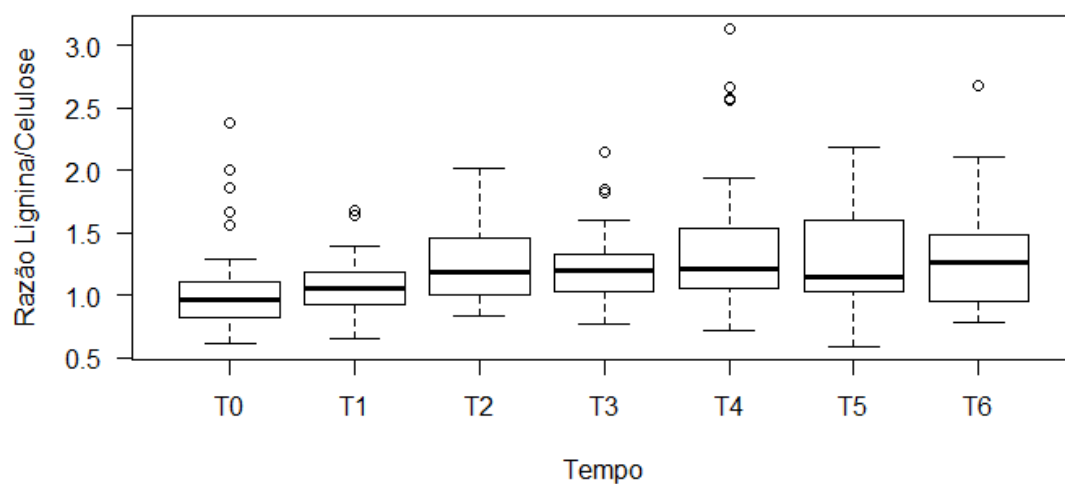


Figura 17 – Boxplot da razão lignina/celulose ao longo do tempo.

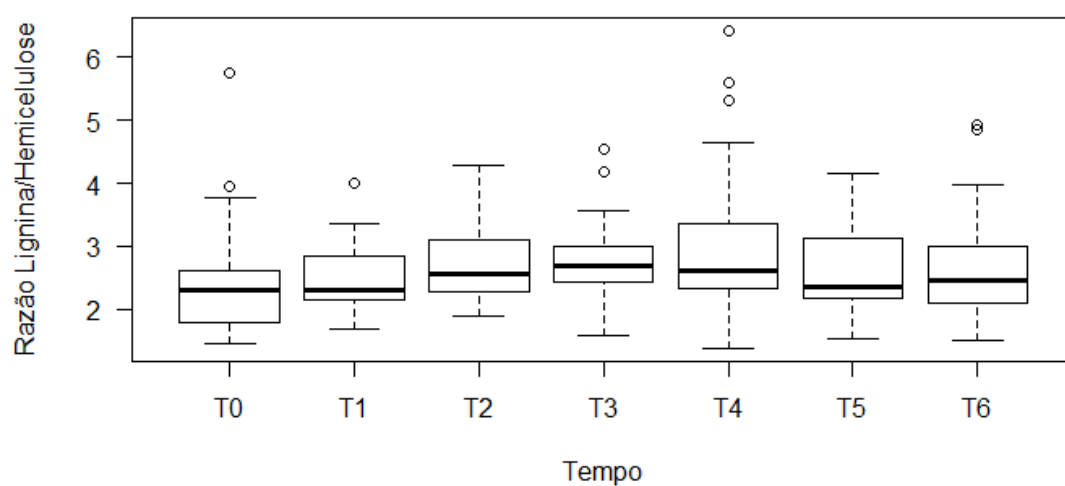


Figura 18 – Boxplot da razão lignina/hemicelulose ao longo do tempo.

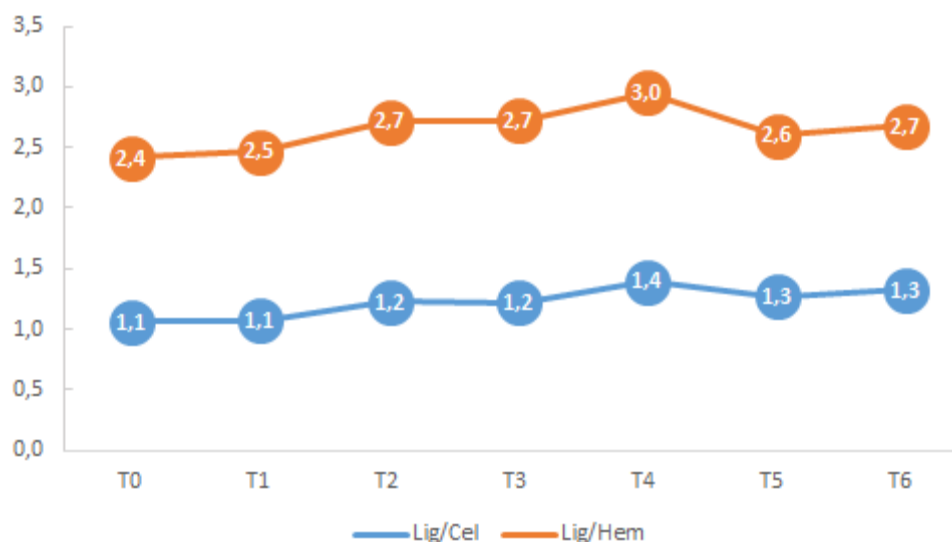


Figura 19 – Razão lignina/celulose e lignina/hemicelulose ao longo do tempo.

Estudos da riqueza de OTUs

Quando todas as amostras são agrupadas e analisamos a riqueza de espécies (OTUs) em cada Tempo (de 0 a 6), foi desenvolvida a hipótese de que a riqueza aumenta ao longo do tempo e a previsão é que o Tempo 0 tem a mais baixa riqueza de espécies e o Tempo 6 tem a mais alta. Para testar essa hipótese, utilizou-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$) que mostrou diferenças significativas entre os Tempos (**Figura 20**).

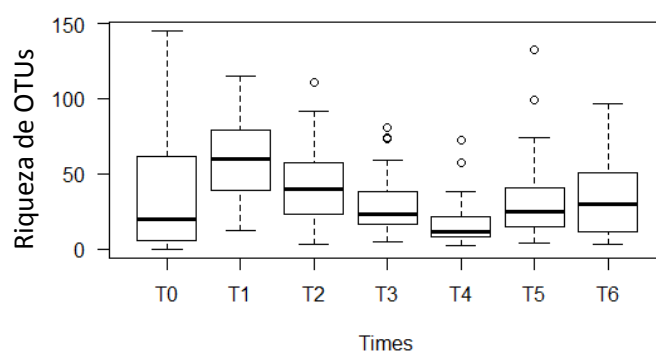


Figura 20 – Riqueza das OTUs dos sete Tempos amostrados.

Contradizendo a hipótese de incremento na riqueza de espécies ao longo da sucessão, os Tempos 1 e 2 representam os estágios de maior riqueza de espécies durante a degradação da madeira e, enquanto a sucessão continua, a riqueza de

espécies diminui. Nos estágios finais, Tempo 5 e 6, notamos um leve aumento na riqueza e no intervalo entre as amostras. Os resultados para o Tempo 0 indicam que as amostras começaram com diferentes níveis de riqueza de espécies, ou seja, algumas já com uma riqueza de espécies elevada e outras com pouquíssimas ou nenhuma espécie.

Considerando as espécies de árvores individualmente, e procedendo com a mesma análise de variância entre as médias de riqueza, com a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$), os resultados mostraram tendências quase semelhantes, com alta riqueza de OTUs nos Tempos 1 e 2 (**Figura 21**). No entanto, as espécies de *Piptadenia* diferiram das outras no Tempo zero, exibindo a maior riqueza de OTUs, maior até que os Tempos 1 e 2. O tempo zero é madeira fresca, coletada diretamente da árvore, é possível sugerir que esta espécie de árvore possui uma grande comunidade de fungos endofíticos.

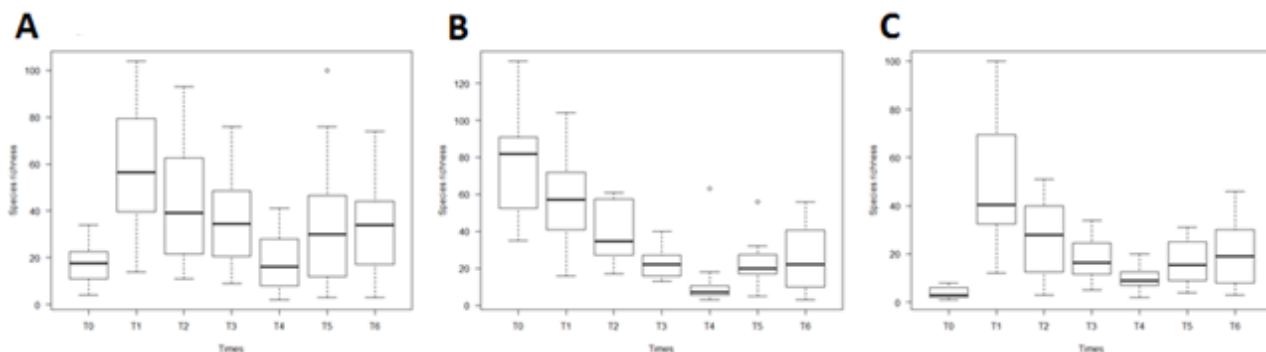


Figura 21 – Riqueza de OTUs ao longo do tempo. A. *Alchornea*. B. *Piptadenia*. C. *Calyptanthus*.

Quanto à diferença entre as espécies arbóreas, A riqueza de OTUs pode ser afetada pelas características desses substratos. Neste sentido, foram montadas todas as 7 subamostras (do tempo zero ao tempo 6) do mesmo ramo e comparadas a riqueza das OTUs, e foi utilizadas a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p = 0,2282$), não mostrando diferenças significativas entre as amostras agrupadas (**Figura 22**). No entanto, quando todas as amostras das mesmas espécies de árvores são reunidas, a

análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$) mostra diferenças significativas entre *Alchornea* e *Piptadenia* em um grupo e *Calypttranthes* em outro (**Figura 23**).

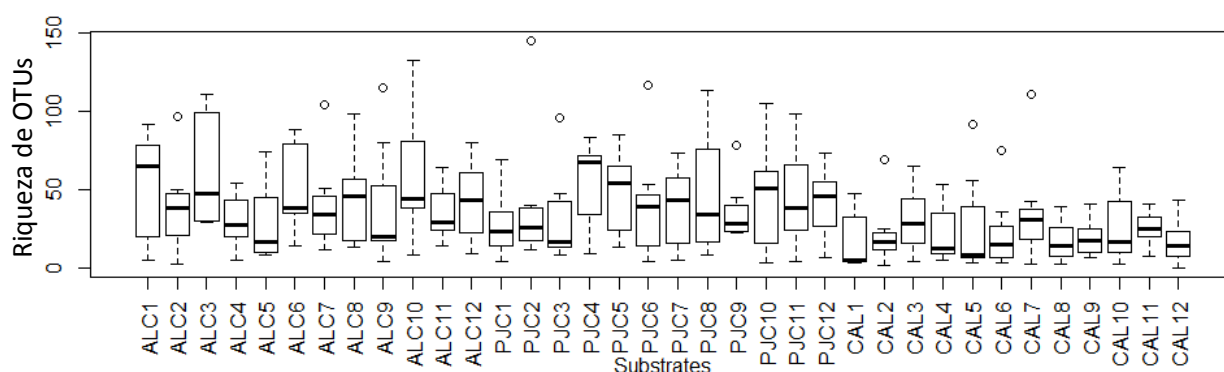


Figura 22 – Riqueza de OTUs nos 36 galhos amostrados. ALC = *Alchornea*; PJC = *Piptadenia* e CAL = *Calypttranthes*. 1, 2 e 3 = Ponto 1; 4, 5 e 6 = Ponto 2; 7, 8 e 9 = Ponto 3 e 10, 11 e 12 = Ponto 4.

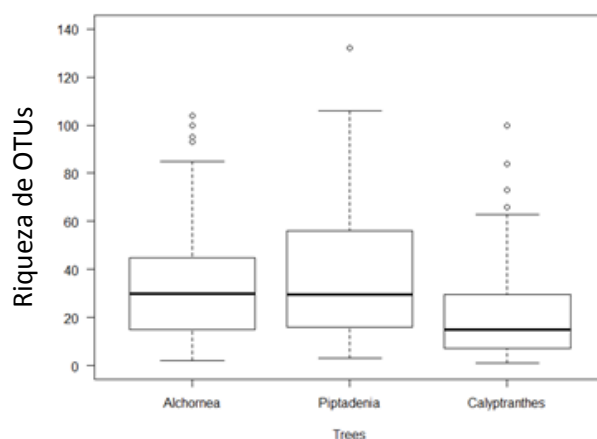


Figura 23 – Riqueza de OTUs nas espécies de árvores.

Para uma comparação de presença/ausência de OTUs nas três espécies de árvores, foi utilizado um diagrama de Venn (RITCHIE et al., 2015) (**Figura 24**). É possível notar uma relação mais próxima entre as espécies de *Alchornea* e *Piptadenia*, e *Calypttranthes* como a mais diferente. As espécies variam na densidade da madeira e *Calypttranthes* possui a densidade mais alta, o que torna os compostos mais inacessíveis para os fungos.



Figura 24 – Diagrama de Venn para presença de OTUs nas espécies de árvore.

Quanto à distribuição dos locais no fragmento florestal estudado, P1 e P3 estavam no interior do fragmento, P2 e P4 nas bordas da floresta. Nossa hipótese é que a riqueza das espécies (OTUs) poderia diferir entre os locais, considerando que temperatura e umidade nas bordas da floresta não poderiam ser estáveis e menos apropriadas ao desenvolvimento de fungos, nós previmos padrões diferentes entre esses microhabitats. Para isso, utilizou-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p = 0,8959$), não sendo observadas diferenças significativas (**Figura 25**).

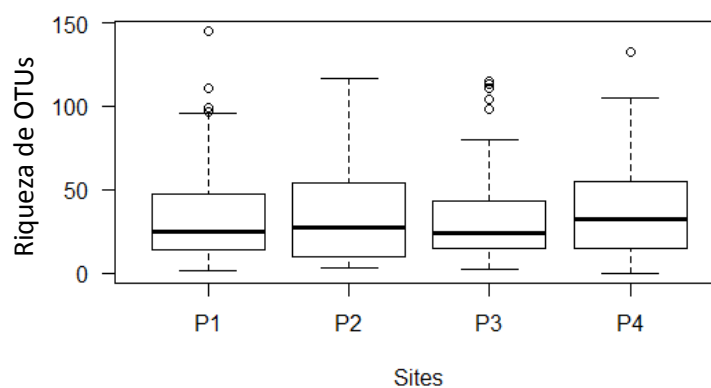


Figura 25 – Riqueza de OTUs dos quatro locais no fragmento florestal.

Se P1 e P3 (Interior do fragmento) e P2 e P4 (borda da floresta) são juntados, em relação à riqueza de OTUs, resultados próximos são obtidos usando análise não-

paramétrica de Kruskal-Wallis ($p = 0,5772$), ou seja, nenhuma variação significativa entre as médias de riquezas de OTUs. A área estudada possui uma matriz urbana muito contundente, uma das possíveis razões para a não variação entre as amostras poderia ser o efeito de borda em todo o fragmento, ou seja, toda a área comporta-se como borda pela intensidade dos efeitos da matriz e pelo tamanho do fragmento, que o incapacitaria de manter todas as características de uma floresta não ameaçada (FISCHER; LINDENMAYER, 2007; HARPER et al., 2005).

Entretanto, TANUS (2011) estudando o efeito de borda no PEFI, concluiu que trechos de mata à 15 m da borda são mais parecidos (em termos florísticos, perímetro à altura do peito, presença de lianas e troncos mortos) aos trechos de mata à 45 m de distância da borda que trechos à 5 metros. Ou seja, talvez nesse fragmento o posicionamento dos pontos tenha ficado em locais que, apesar de estar perto da borda, respondeu como interior da floresta.

Se P1 e P3 (interior do fragmento) e P2 e P4 (borda da floresta) são unidos, em relação à riqueza da OTU, resultados próximos são obtidos (**Figura 26**), ou seja, não há variação significativa entre a riqueza de OTUs (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,5772$).

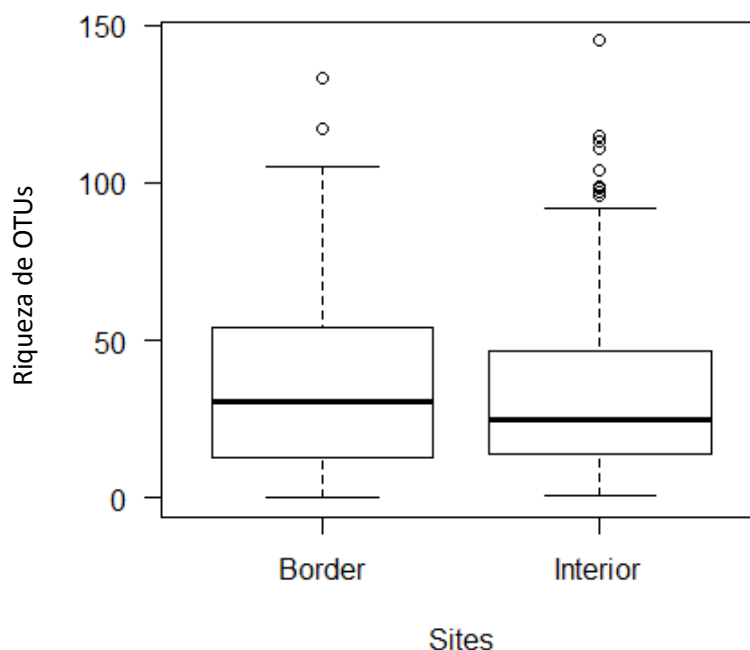


Figura 26 – Riqueza de OTUs entre borda e interior do fragmento

Para verificar a distribuição dos filos de fungos entre as amostras, utilizou-se o Phyloseq Package em R (MCMURDIE; HOLMES, 2013) (**Figura 27**). Esta é uma análise exploratória, mas indica uma tendência entre os filos. A partir do Tempo 0 até o Tempo 2, especialmente o Tempo 1 e 2, o filo Ascomycota é altamente abundante, a partir do Tempo 3, um aumento na riqueza de espécies do filo Basidiomycota é observada, juntamente com um declínio geral na abundância. Com base nessa exploração de dados, uma tendência de inversão entre espécies do Filo Ascomycota sendo substituídas por espécies de Basidiomycota e maior abundância de espécies nos meses iniciais é um indicativo de um padrão natural na decomposição da madeira.

Seria esperado que o Tempo 0 apresentasse dissimilaridades, pois cada galho possui uma origem e história natural independente. Os dados de grande riqueza de espécie no início da sucessão são corroborados pelos estudos de KUBARTOVÁ; OTTOSSON; STENLID (2015), onde, trabalhando com troncos de abeto, eles também constatam que troncos menos decompostos possuem uma maior diversidade e troncos mais decompostos apresentam menor diversidade. Justamente no Tempo 3, onde

chamamos de fase de transição pode-se notar uma tendência em se aumentar fungos do filo Basidiomycota em comparação com a quantidade existente nos Tempos 1 e 2.

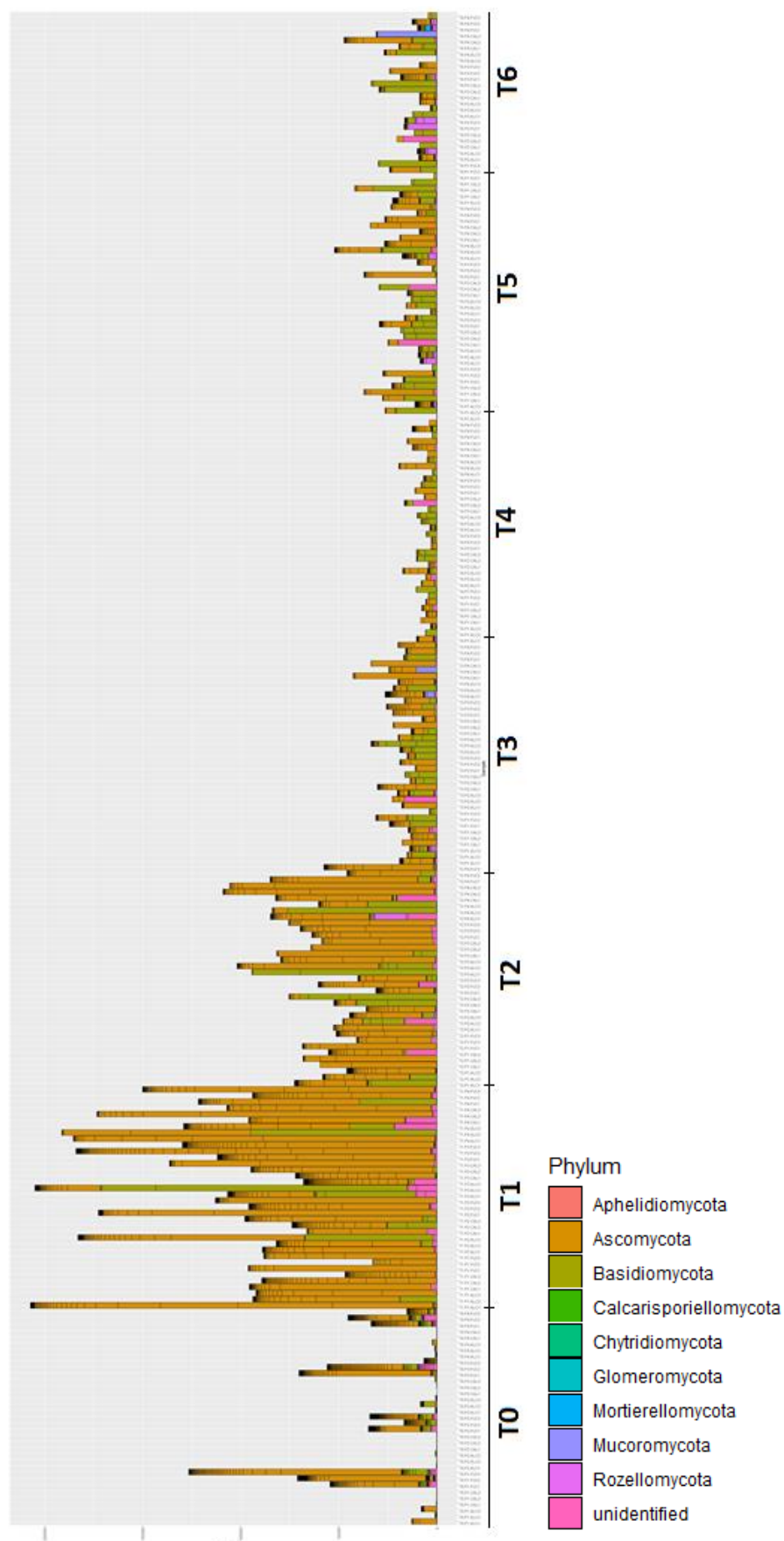
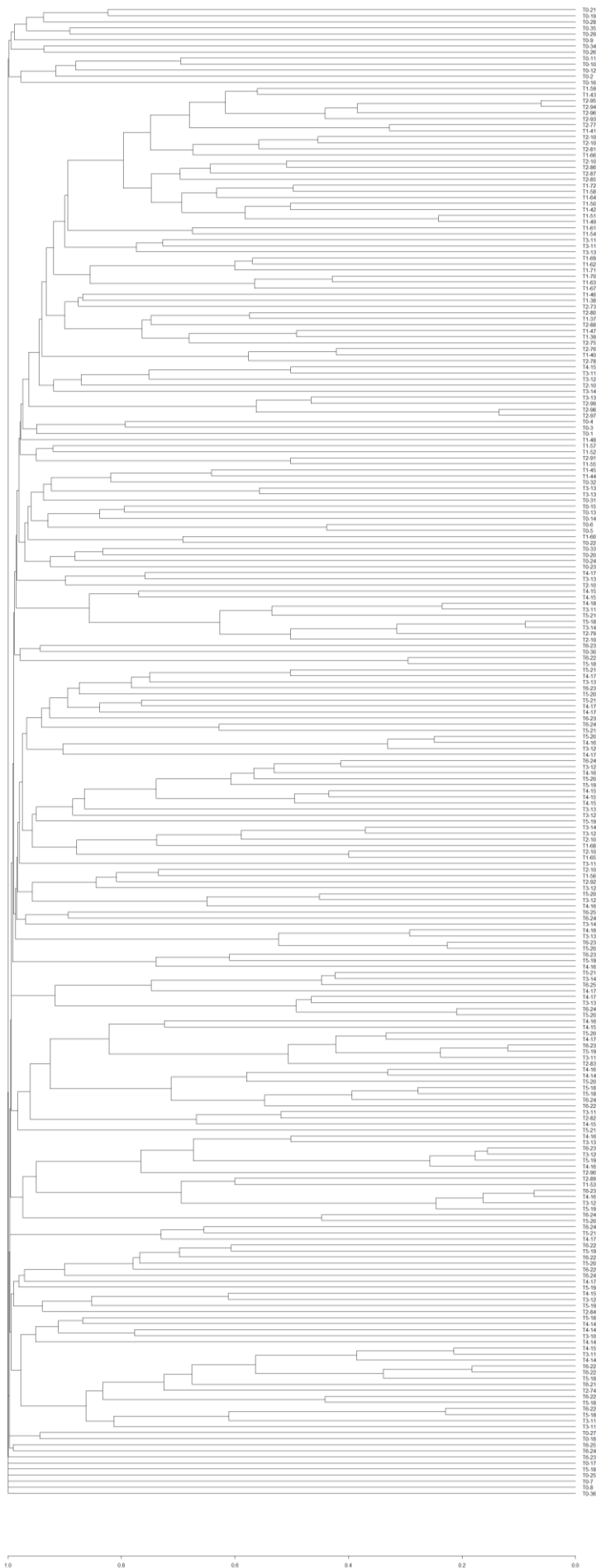


Figura 27 – Histograma de abundância de filos de fungos entre todas as amostras.

Composição da comunidade

Para se obter uma visão geral do experimento, foram testados se as amostras variam em riqueza e abundância de espécies ao longo do tempo. Nossa hipótese é que a comunidade variaria do Tempo 0 ao Tempo 6 e previmos que quanto mais o tempo passasse, mais a comunidade se diferenciaria(**Figura 29**).

Figura 28 – Cluster de abundância de OTUs com o método do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis.



O mapa de calor mostrou que a comunidade fúngica começa a sucessão com algumas semelhanças e diferenças entre si (em riqueza de espécies e abundância) (**Figura 29**). No Tempo 1 e 2 é onde se observa a maior convergência nas comunidades fúngicas de cada amostra. O Tempo 3 parece representar uma fase de transição para os Tempos 4, 5 e 6 onde as dissimilaridades aumentam.

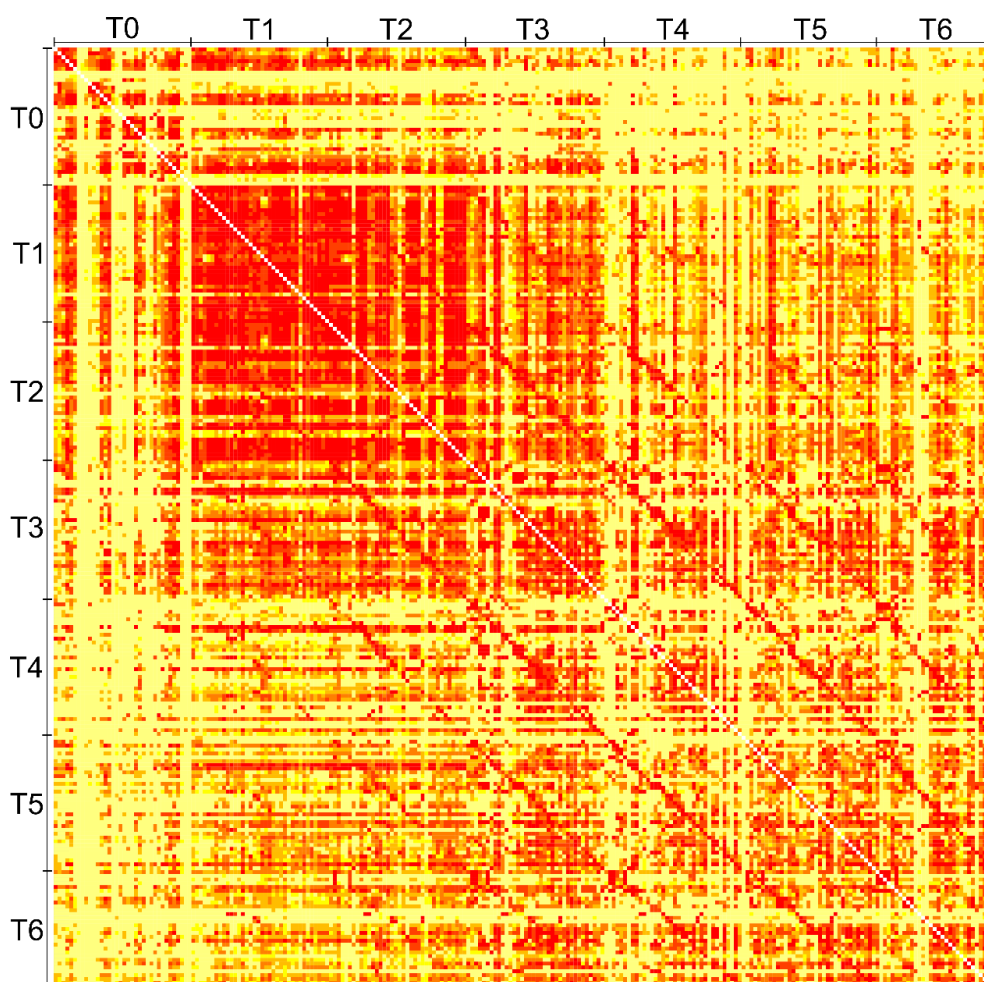


Figura 29 – Mapa de calor da abundância de OTU com o método de índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Quanto mais vermelho, mais similar; quanto mais amarelo, mais dissimilar. T0 = Tempo 0, T1 = Tempo 1, T2 = Tempo 2, T3 = Tempo 3, T4 = Tempo 4, T5 = Tempo 5 e T6 = Tempo 6.

Da mesma forma que não foram percebidos efeitos muito significativos do microclima em relação às perdas de densidade e das principais moléculas da madeira (lignina, celulose e hemiceluloses), também o microclima não foi o principal responsável pelas diferenças na comunidade de fungos (**Tabela 16** e **Tabela 17**). Além disso, apesar

de um efeito menor, a influência dos fatores microclimáticos e dos componentes da madeira demonstraram um efeito conjunto em quase todos os resultados, ou seja, estavam tendendo para o mesmo lado, de forma agrupada (**Figura 30 e Figura 31**).

Tabela 16 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Tempos. Valores de p: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; . p > 0,05.

	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		Tempo 4		Tempo 5		Tempo 6	
	R2	p	R2	p	R2	p	R2	p	R2	p	R2	p	R2	p
Nitrogênio	0,091	.	0,0441	.	0,255	*	0,021	.	0,269	**	0,325	**	0,085	.
Carbono	0,006	.	0,112	.	0,341	** *	0,210	*	0,298	**	0,440	***	0,005	.
Densidade	0,005	.	0,134	.	0,373	**	0,281	**	0,301	** *	0,428	***	0,004	.
Extrativos	0,015	.	0,197	*	0,140	.	0,216	*	0,126	.	0,501	***	0,012	.
Lignina	0,008	.	0,181	*	0,359	** *	0,381	**	0,292	**	0,423	***	0,007	.
Glucana	0,001	.	0,076	.	0,258	**	0,307	**	0,297	**	0,301	**	0,001	.
Xilana	0,004	.	0,078	.	0,338	**	0,300	**	0,284	**	0,366	***	0,005	.
Arabinose	0,067	.	0,248	**	0,396	**	0,332	**	0,223	**	0,444	***	0,071	.
Acetil	0,021	.	0,121	.	0,330	**	0,305	**	0,294	**	0,298	**	0,021	.
Temperatura	0,062	.	0,136	.	0,009	.	0,128	.	0,048	.	0,037	.	0,076	.
Umidade Absoluta	0,398	** *	0,216	*	0,006	.	0,228	*	0,033	.	0,074	.	0,386	**
Umidade Relativa	0,314	**	0,235	*	0,006	.	0,209	*	0,037	.	0,067	.	0,318	**
Chuva	0,000	.	0,000	.	0,000	.	0,000	.	0,141	.	0,000	.	0,000	.

Tabela 17 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Pontos. Valores de p: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; . p > 0,05.

	P1		P2		P3		P4	
	R2	p	R2	p	R2	p	R2	p
Nitrogênio	0,2873	***	0,0043	.	0,1179	*	0,1641	**
Carbono	0,5556	***	0,3078	***	0,1686	**	0,2129	**
Densidade	0,5904	***	0,3720	***	0,3225	***	0,1879	**
Extrativos	0,2679	**	0,4965	***	0,3454	***	0,0307	.
Lignina	0,5458	***	0,4077	***	0,3181	***	0,1664	**
Glucana	0,5184	***	0,4137	***	0,2875	***	0,1792	**
Xilana	0,5815	***	0,4029	***	0,2506	***	0,1685	*
Arabinose	0,4546	***	0,4197	***	0,2681	***	0,0402	.
Acetil	0,5064	***	0,3939	***	0,3562	***	0,1613	**
Temperatura	0,0943	.	0,1179	*	0,1856	**	0,1367	*

	P1		P2		P3		P4	
	R2	p	R2	p	R2	p	R2	p
Umidade Absoluta	0,0923	.	0,2160	**	0,1865	**	0,1592	*
Umidade Relativa	0,0262	.	0,2700	***	0,0543	.	0,1097	*
Chuva	0,1179	*	0,1829	**	0,2506	***	0,1550	**

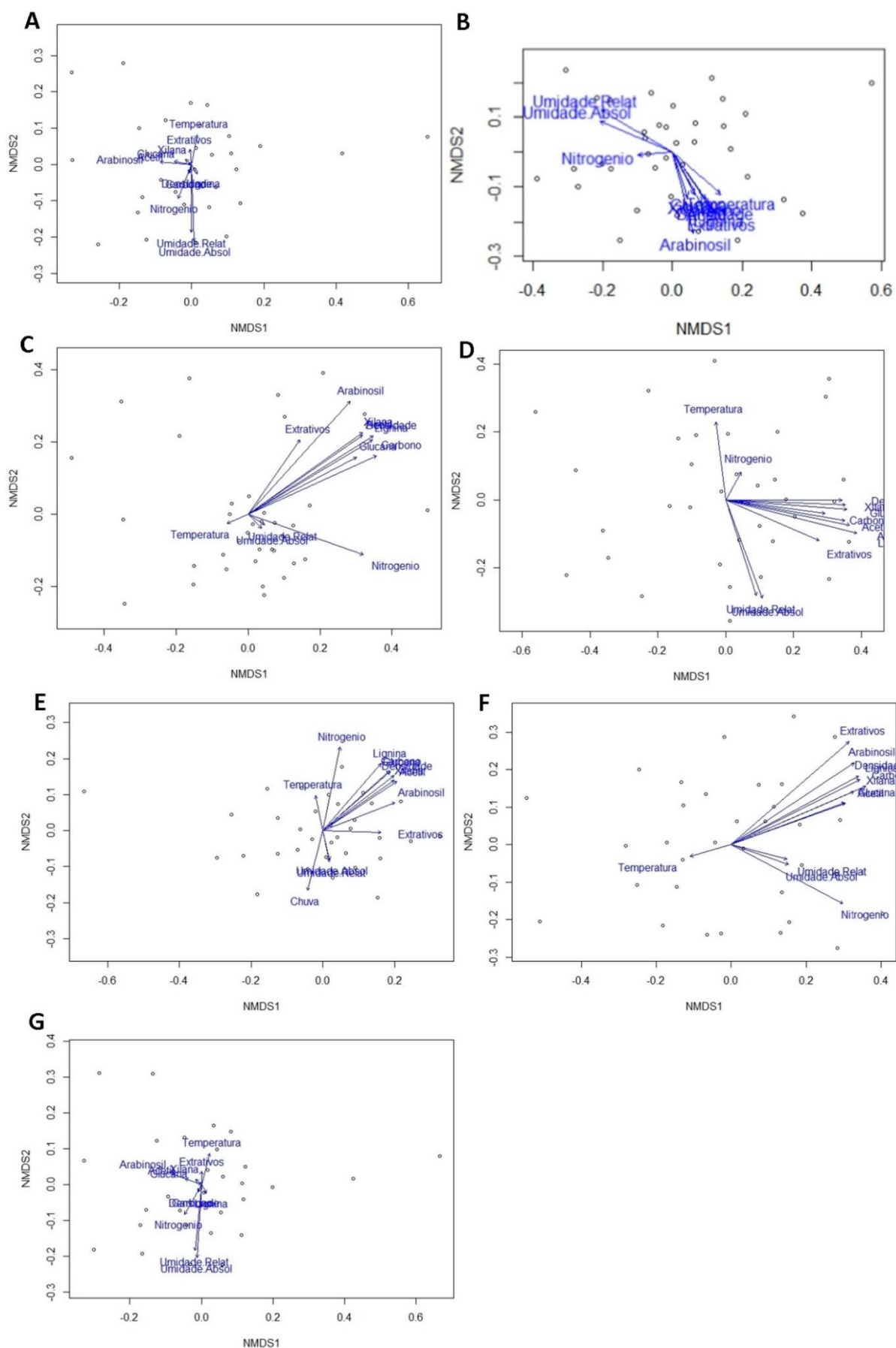


Figura 30 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Tempos, com os vetores das variáveis abióticas. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.

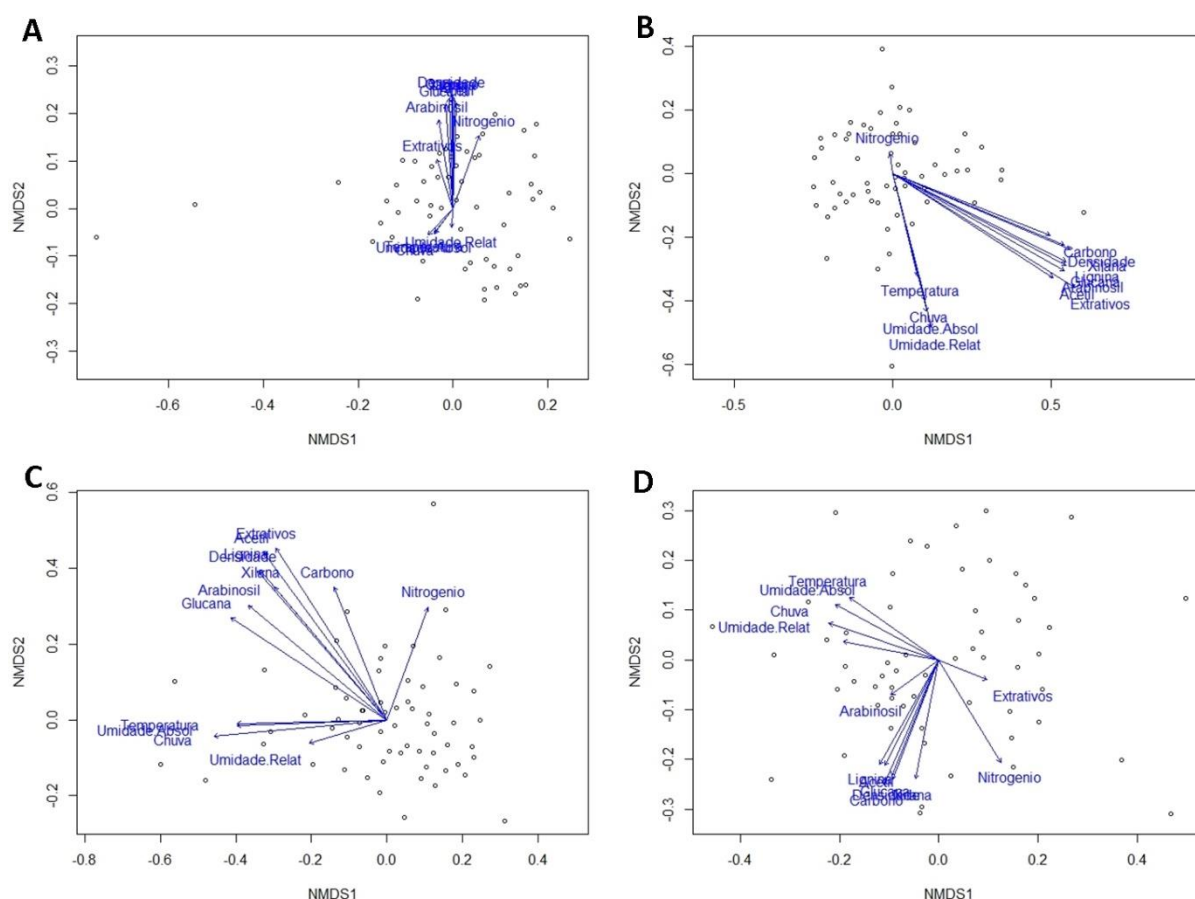


Figura 31 – Resultados da análise de NMDS ordenada pelos Pontos, com os vetores das variáveis abióticas. A. Ponto 1, B. Ponto 2, C. Ponto 3 e D. Ponto 4.

Em seguida, são apresentados os dados da PERMANOVA que relaciona os dados da comunidade fúngica com algumas variáveis. Quando analisado todo o conjunto de dados simultaneamente, pode-se observar que a diferença na comunidade fúngica responde às diferentes espécies de árvores com um poder explicativo de 3,13 % ($p < 0,001$). As diferenças entre estar na borda ou no interior do fragmento, 1,36% ($p < 0,001$), o posicionamento em um dos quatro Pontos, 4,39% ($p < 0,001$), os sete Tempos 7,07 ($p < 0,001$) e os substratos da mesma espécie de árvore de cada um dos Pontos analisados juntos correspondeu a 13,19% ($p < 0,001$) de poder explicativo.

Para essa análise, também foram feitas três ordenações, em função do Tempo, que incluiu as variáveis Ponto (de 1 a 4), Árvores (*Alchornea*, *Piptadenia* e *Calypttranthes*), Fragmento (borda e interior do fragmento) e Substrato (a mesma

espécie de árvore de cada um dos Pontos analisados juntos) (**Tabela 18**); em função dos quatro Pontos, incluindo as variáveis Tempo (de 1 a 6), Árvores e Substrato (**Tabela 19**); e em função das Árvores, que incluiu Ponto, Fragmento, Tempo e Substrato (**Tabela 20**).

Tabela 18 – Resultados da análise de PERMANOVA ordenada pelos Tempos. R2 em porcentagem. Valores de p: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; . p > 0,05.

	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		Tempo 4		Tempo 5		Tempo 6	
	r2	p	r2	p	r2	p	r2	p	r2	p	r2	p	r2	p
Ponto	15,54	***	15,44	***	12,03	**	12,23	***	12,17	***	12,09	**	15,54	***
Árvores	7,10	.	12,64	***	11,91	***	9,06	***	9,40	***	9,24	***	7,10	.
Fragmento	5,14	**	4,64	**	4,00	*	3,65	*	3,95	*	5,00	**	5,14	**
Substrato	42,36	***	49,37	***	45,41	***	41,50	***	41,16	***	39,74	***	42,36	***

Tabela 19 – Resultados da análise de PERMANOVA ordenada pelos Pontos. R2 em porcentagem. Valores de p: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; . p > 0,05.

	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3		Ponto 4	
	r2	p	r2	p	r2	p	r2	p
Tempo	15,81	***	14,12	***	16,38	***	16,39	***
Árvores	11,15	***	10,57	***	8,21	***	7,68	***
Substrato	26,03	***	27,45	***	19,25	***	24,47	***

Tabela 20 – Resultados da análise de PERMANOVA ordenada pelas Árvores. R2 em porcentagem. Valores de p: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; . p > 0,05.

	Alchornea		Piptadenia		Calyptranthes	
	r2	p	r2	p	r2	p
Ponto	11,30	***	10,11	***	10,31	***
Tempo	11,01	***	17,67	***	11,43	***
Fragmento	2,86	***	4,37	***	2,58	***
Substrato	11,30	***	10,11	***	10,31	***

Nessa análise, todos os Tempos, Pontos e Árvores se comportaram de maneira bastante similar entre si, ou seja, o efeito de cada variável na comunidade fúngica demonstrou uma tendência muito parecida. Quando comparados os 4 Pontos de coleta ao longo do tempo, entre 12 a 15% da diferença da comunidade em relação a sua localização é explicado pelos dados. Dessa forma, pode-se entender que o

posicionamento de um galho na mata estudada tem uma influência não muito alta na estruturação da comunidade, como aponta HISCOX et al. (2016), ao estudar o padrão de colonização de fungos em discos de madeira no sul do Reino Unido, observaram no mesmo ambiente diferentes composições de comunidade.

Quando observado o peso das diferentes espécies de árvores, o poder explicativo ficou por volta de 7-12%, sinalizando que existiu uma seletividade pelo substrato, mas que essa não é muito expressiva. O mesmo ocorre com o posicionamento das amostras no fragmento (borda ou interior), onde o poder preditivo do teste variou entre 3-5% apenas. O trabalho de BRISCHKE; RAPP (2008) estudou a relação entre decomposição de duas espécies de árvore (pinheiro silvestre e abeto) em 23 locais na Europa, e assim como os dados ora apresentados, não houve uma correlação expressiva entre locais diferentes e velocidade de decomposição.

Por outro lado, quando se observa o papel do substrato na organização das comunidades, o poder explicativo dessa variável é de 40-50%. A comunidade de cada amostra é mais determinada pelo próprio substrato, ou seja, cada galho tem uma história de composição da comunidade única, que depende mais do seu próprio desenvolvimento individual. O estudo de VAN DER WAL; OTTOSSON; DE BOER (2015b) foi o primeiro a indicar que os fatores mais importantes que explicam a variação nas taxas de decomposição da madeira podem mudar com o tempo e que essa variação, conforme o tempo passa, é mais determinada pela comunidade fúngica ainda. Então, os fatores que explicariam essas variações seriam a presença/ausência de espécies mais ou menos potentes no nível enzimático e também o grau de resiliência e competitividade para se manter presente no ambiente (FUKAMI, 2015; FUKAMI et al., 2010; HISCOX et al., 2015a; VAN DER WAL; OTTOSSON; DE BOER, 2015).

Se os dados são organizados em função dos Pontos, a variação do tempo explicou entre 14-16%. As espécies de árvores explicaram entre 7-11% e, mais uma vez, os diferentes substratos correspondem a 19-26% da variação. Isso é um indicativo da importância da comunidade fúngica individual de cada galho, ou seja, a comunidade sobre pressão da própria comunidade para que as novas espécies se estabeleçam no substrato. Dessa forma, pode-se indicar que o efeito de prioridade pode ser um dos principais responsáveis pela estruturação da comunidade fúngica ao longo do tempo (FUKAMI et al., 2010; HISCOX et al., 2015a).

Análise taxonômica e grupos funcionais

Quando levado em conta a identificação das espécies nas amostras, as OTUs mais abundantes nas amostras foram invariavelmente espécies do filo Ascomycota (**Figura 32**), corroborado pela maioria dos estudos de diversidade molecular em madeira em decomposição (KUBARTOVÁ; OTTOSSON; STENLID, 2015; PURAHONG et al., 2018; VAZ et al., 2017).

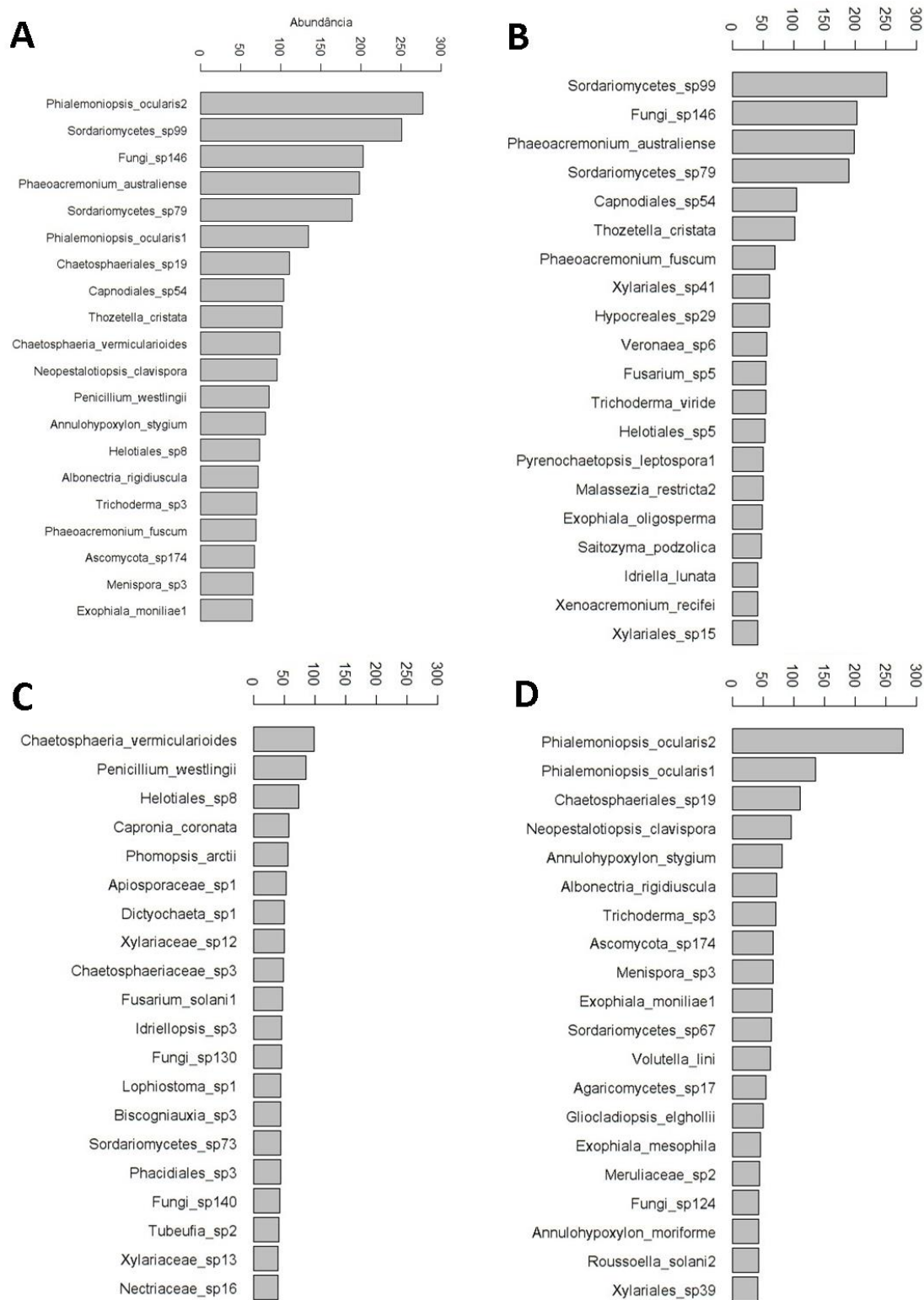


Figura 32 – Gráficos de rank-abundância. A. comunidade geral, B. comunidade presente em *Alchornea*, C. comunidade presente em *Piptadenia* e D. comunidade presente em *Calyptranthes*.

Dentre as amostras de *Alchornea*, os táxons (OTUs) mais abundantes foram uma espécie de *Sordariomycetes*, classe do Filo *Ascomycota*, bastante importante dentre os fungos xilófagos e também *Phaeoacremonium australiense* e *P. fuscum*, duas espécies

que curiosamente possuem importância médica, pois estão associadas a casos que envolveram abscessos subcutâneos, cistos ou osteoartrite crônica ou aguda em pacientes imunocompetentes ou imunocomprometidos; e fitossanitária por estarem associados a algumas pragas em árvores lenhosas, especialmente com doenças da videira, doença de petri e esca e em cerejeiras (DAMM et al., 2008; MOSTERT et al., 2005).

Em *Piptadenia*, os OTUs mais abundantes foram *Chaetosphaeria vermicularioides*, um ascomiceto que comumente ocorrem em madeira em decomposição ou no lado interno da casca de árvores e arbustos decíduos e coníferas (REBLOVÄ; BARR; SAMUELS, 1999); outro ascomiceto *Penicillium westlingii*, de distribuição mundial e comumente encontrado em solo (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011).

Nas amostras de *Calyptrothrix*, a OTU mais abundante foi *Phialemoniopsis ocularis*, uma espécie de ascomiceto da Classe Sordariomycetes, um gênero de fungo anamórfico com espécies amplamente distribuídas e comumente isoladas de ar, solo, água de dejetos industriais, esgoto e associada a infecções humanas, principalmente em pessoas imunodeprimidas (PERDOMO et al., 2013). Também apresentou uma grande abundância de OTUs *Neopestalotiopsis clavispora*, um ascomiceto patógeno de alguns cultivos, como morango, cardamomo e macadâmia (BIJU; PEERAN; GOWRI, 2018; OBREGÓN et al., 2018).

A comunidade analisada do ponto de vista temporal demonstrou que há a alternância de dominância de uma OTU por outra à medida que o tempo passa, mostrando assim que a sucessão fúngica ocorre. Algumas espécies vão sendo substituídas, surgem em algum momento e depois desaparecem; outras vezes, uma vez

que surgem elas se mantêm no substrato por algum tempo. Um exemplo disso pode ser visto na **Figura 33**, **Figura 34** e **Figura 35**, que mostram a ocorrência das OTUs mais abundantes ao longo do tempo em três amostras do Ponto 1.

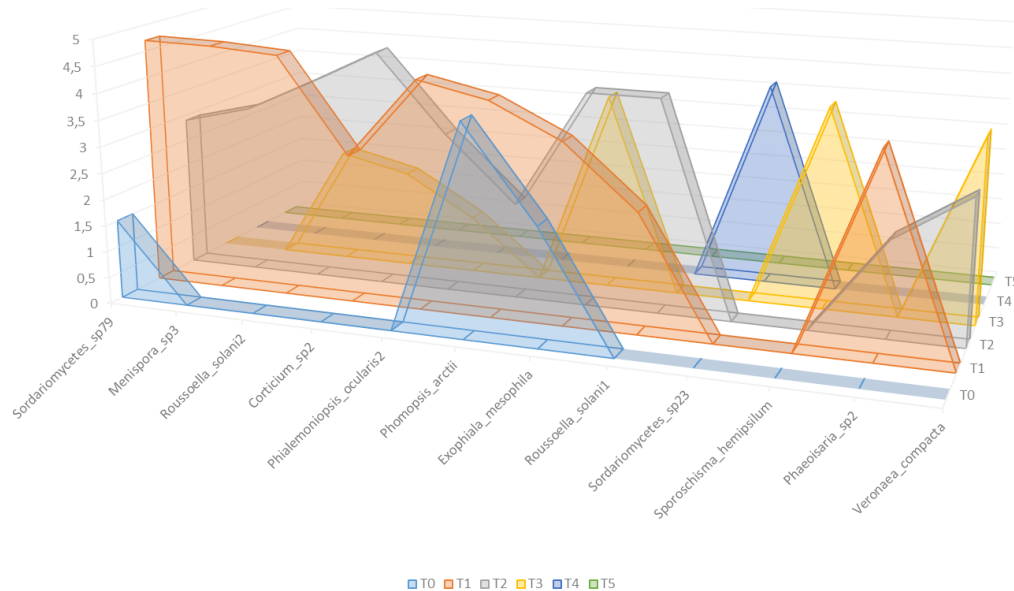


Figura 33 – Abundância (em log de 10) das OTUs mais abundantes na amostra ALC1, um dos galhos de *Alchornea* do Ponto 1.

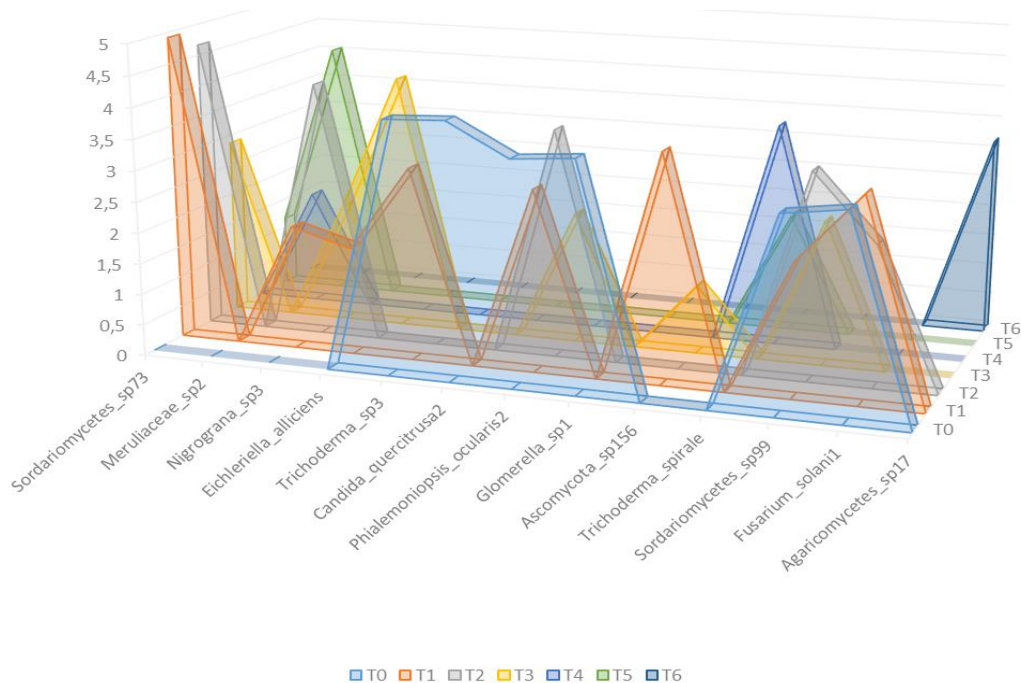


Figura 34 – Abundância (em log de 10) das OTUs mais abundantes na amostra PJC1, um dos galhos de *Piptadenia* do Ponto 1.

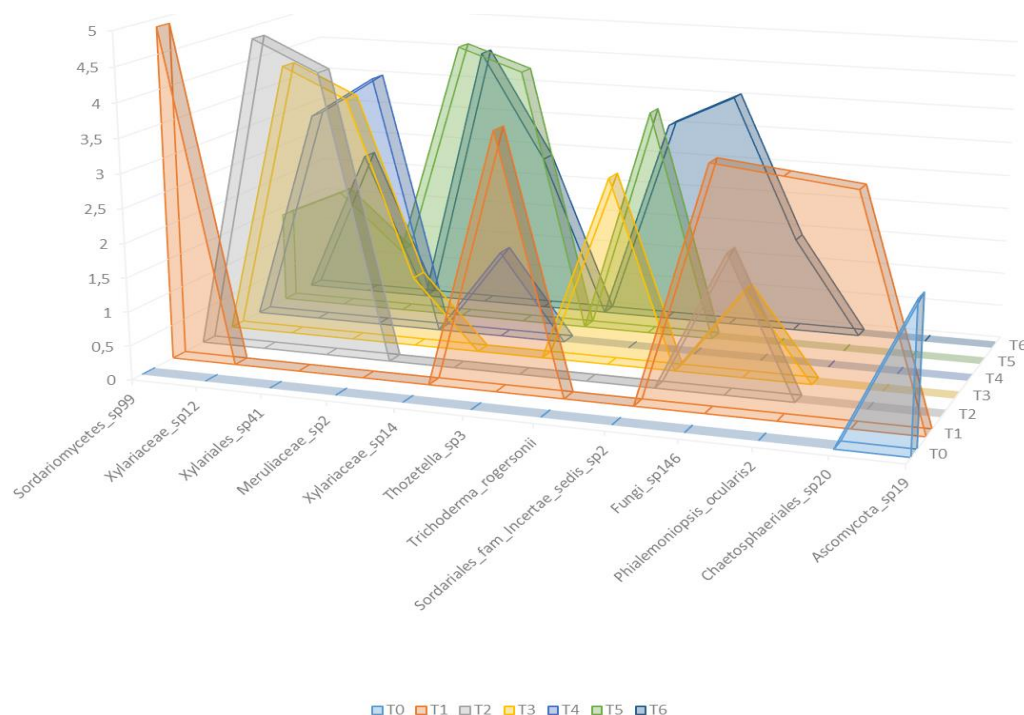


Figura 35 – Abundância (em log de 10) das OTUs mais abundantes na amostra CAL1, um dos galhos de *Calyptanthus* do Ponto 1.

Além disso, os galhos das diferentes espécies de árvore estudadas apresentaram comunidades diferentes, mesmo estando na mesma localização geográfica. A especificidade por substrato no reino Fungi ainda gera muita discussão e resultados díspares são encontrados na literatura. Quando comparados os três galhos de *Alchornea* do Ponto 1 (**Figura 36**, **Figura 37** e **Figura 38**), é possível notar algumas OTUs ocorrendo em ambas as amostras, como *Fusarium solani*, *Phomopsis arctii*, *Exophiala mesophila*, *Agaricomycetes* sp.17, etc, e não sendo vistas tão expresivamente nas amostras de *Piptadenia* e *Calyptanthus*, mesmo estando na mesma localidade. Todavia, quando comparadas com as amostras de *Alchornea* do Ponto 2 (**Figura 39**), já é possível notar um distanciamento em relação às OTUs do Ponto 1. Nas comparações entre as três espécies de árvore do mesmo Ponto (**Figura 40** e **Figura 41**), também não é possível notar semelhanças muito contundentes entre as comunidades.

Muitos trabalhos tratam da estocasticidade na formação das comunidades de fungos na madeira em decomposição e quais fatores interferem nessa formação. Nesse trabalho foi possível notar que pode existir uma preferência das espécies por um substrato ou outro quando localizados em locais próximos, havendo alguma especificidade, como apontado por PREWITT et al. (2014) e PURAHONG et al. (2018) em que composição e sucessão da comunidade fúngica foram associadas ao tipo de madeira. Porém, esses mesmos substratos em áreas diferentes mostraram outras formações de comunidade, ressaltando a importância do *pool* de espécies locais e o papel dos fungos endofíticos presentes nos galhos antes da sucessão iniciar (CLINE et al., 2018).

Dada essa diferença inicial entre OTUs já no Tempo 0 (fungos endofíticos), a hipótese que mais explica essa variação nos dados é a de um contundente papel do efeito de prioridade, onde a espécie que primeiro ocupa o substrato determina o desenvolvimento das próximas (FUKAMI, 2015; FUKAMI et al., 2010; HISCOX et al., 2015a).

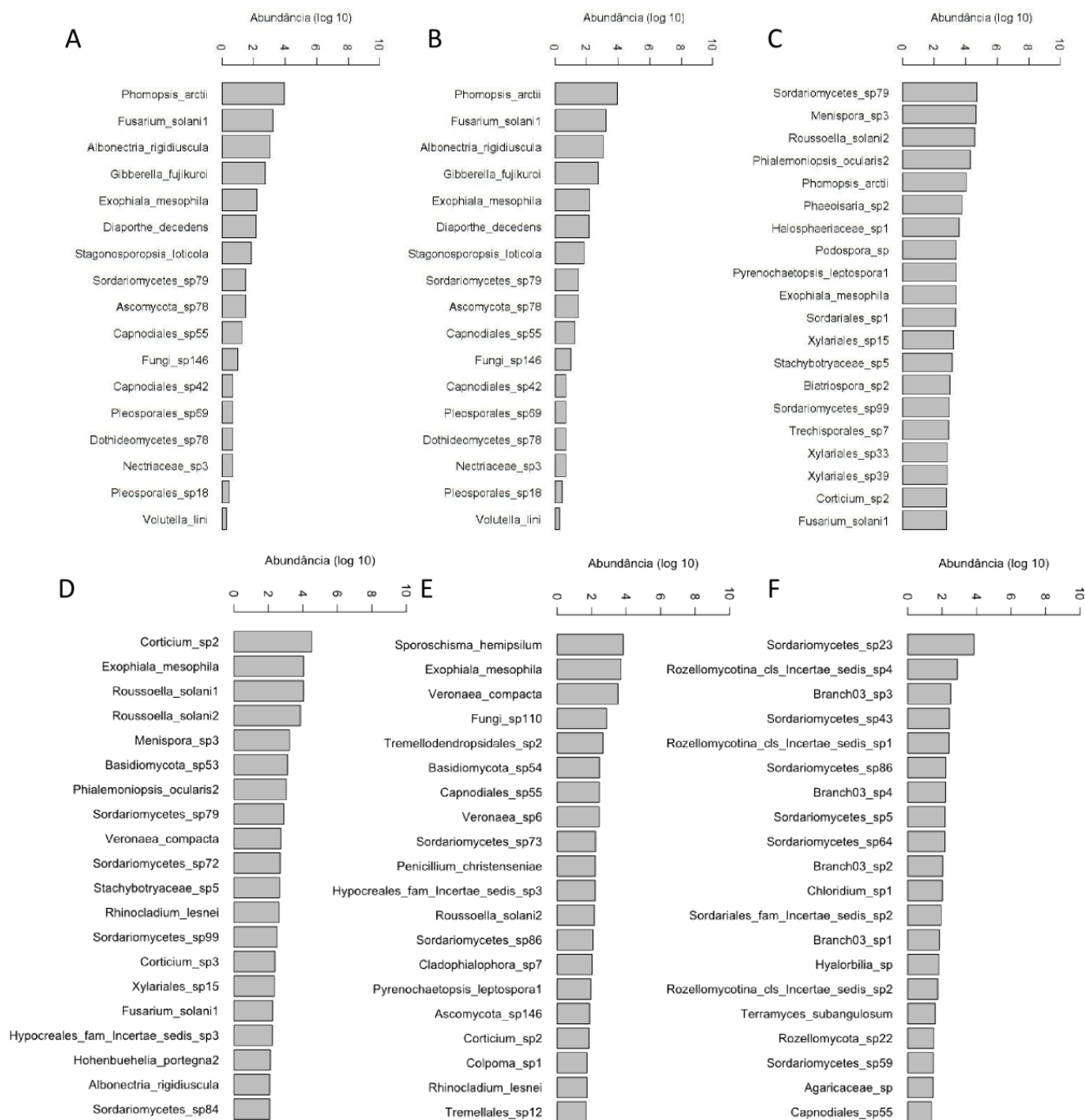


Figura 36 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC1, um dos três galhos de *Alchornea* do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4 e F. Tempo 5.

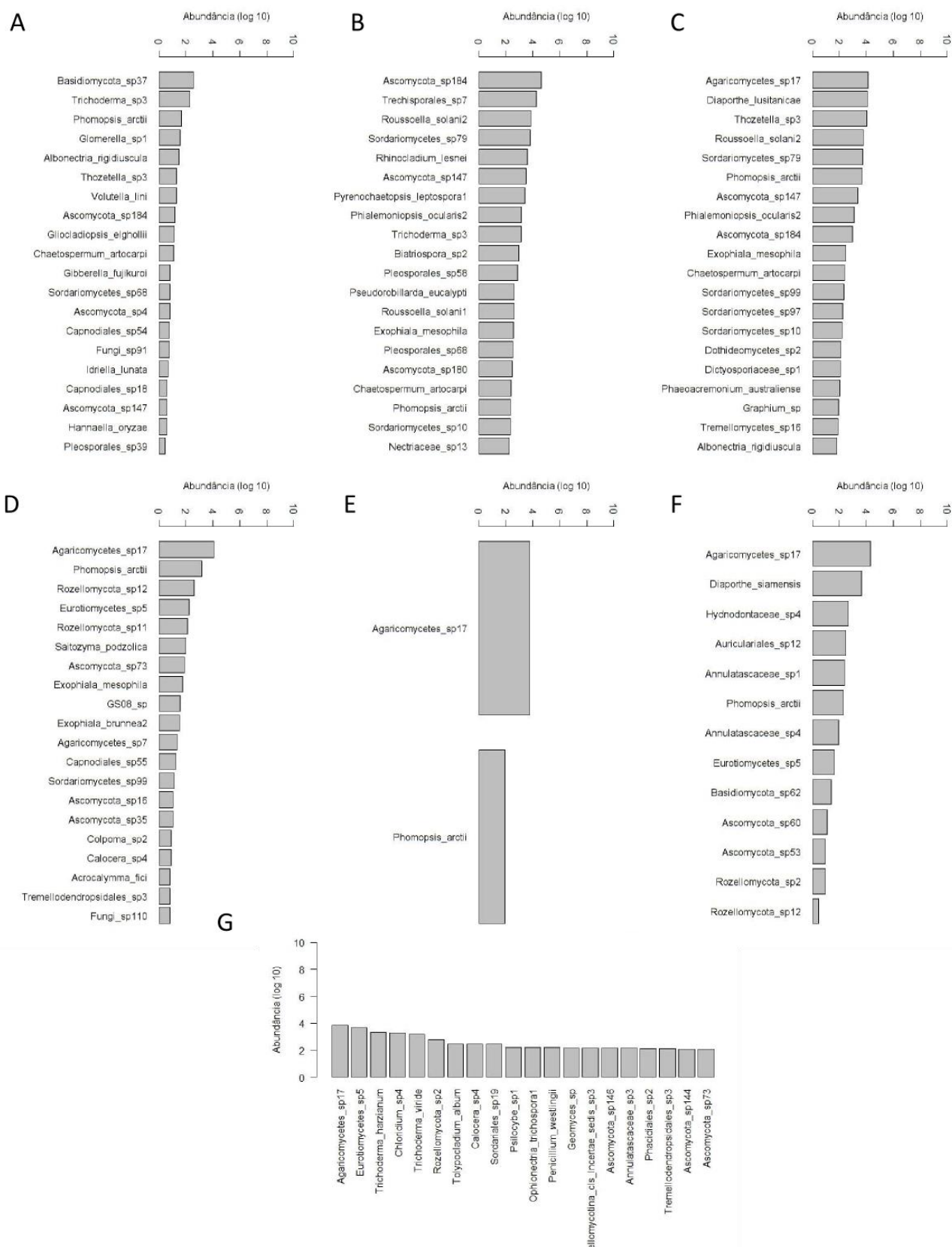


Figura 37 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC2, um dos três galhos de *Alchornea* do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.

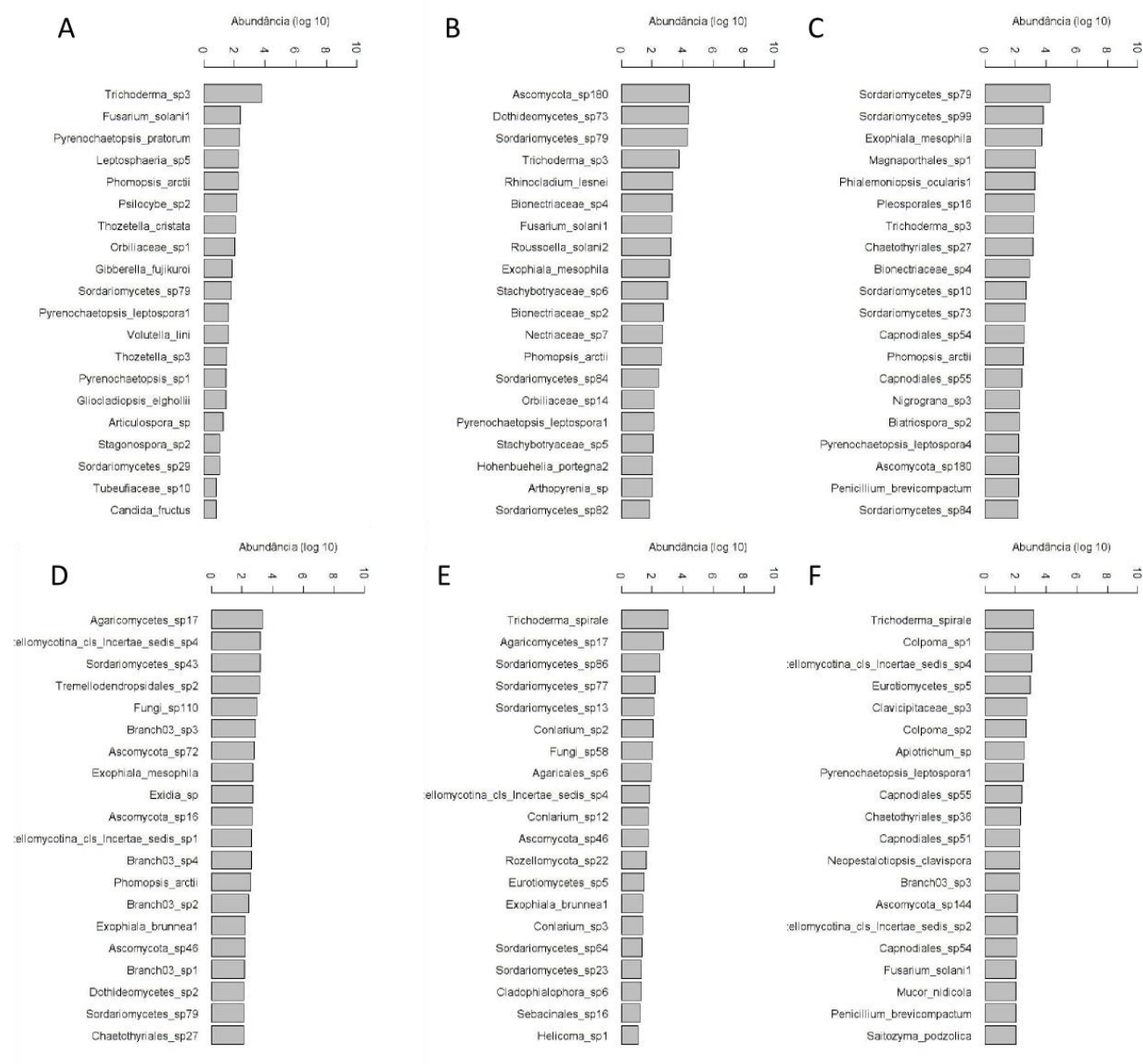


Figura 38 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC3, um dos três galhos de *Alchornea* do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4 e F. Tempo 5.

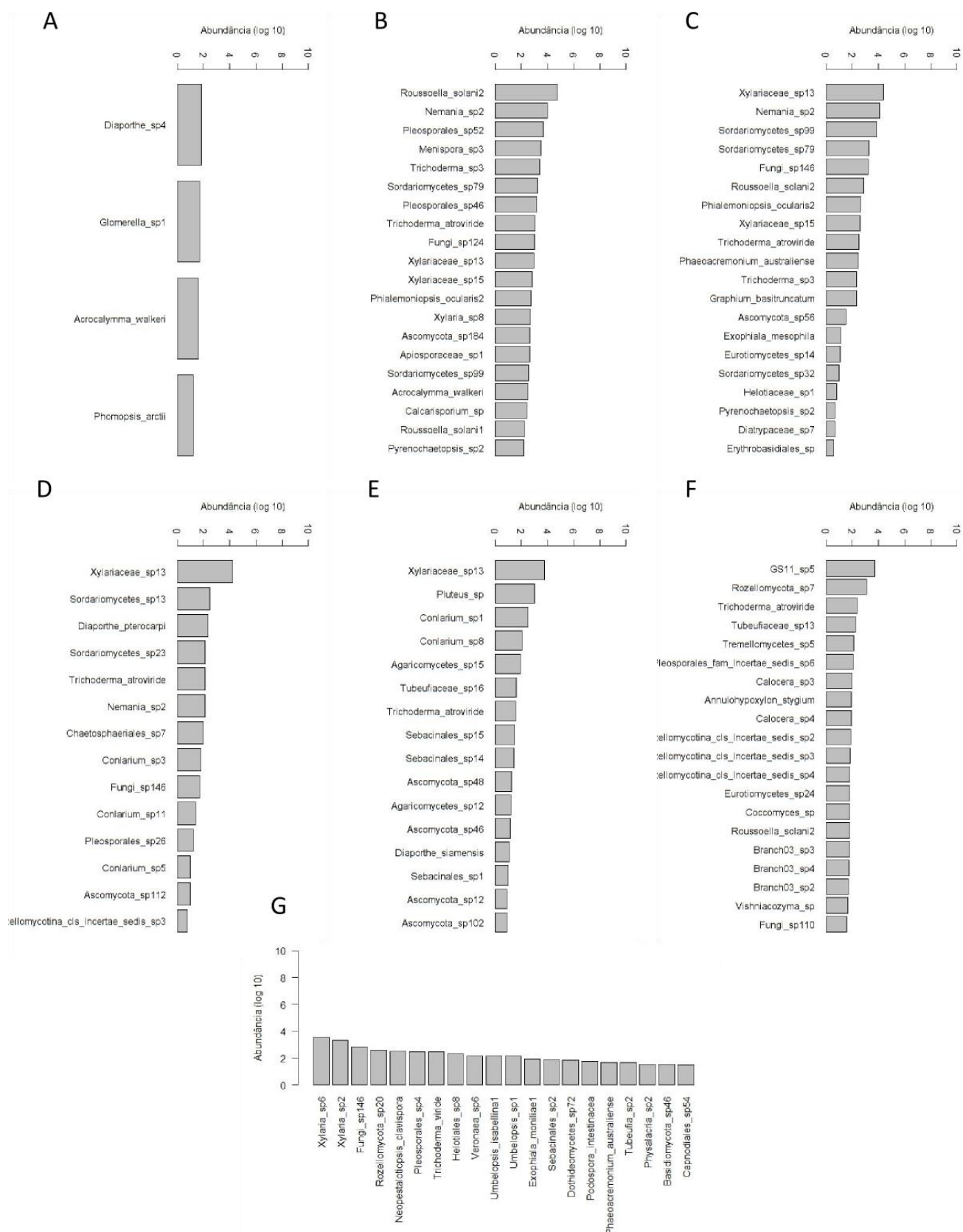


Figura 39 – Gráficos de rank-abundância da amostra ALC1, um dos três galhos de *Alchornea* do Ponto 2. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.

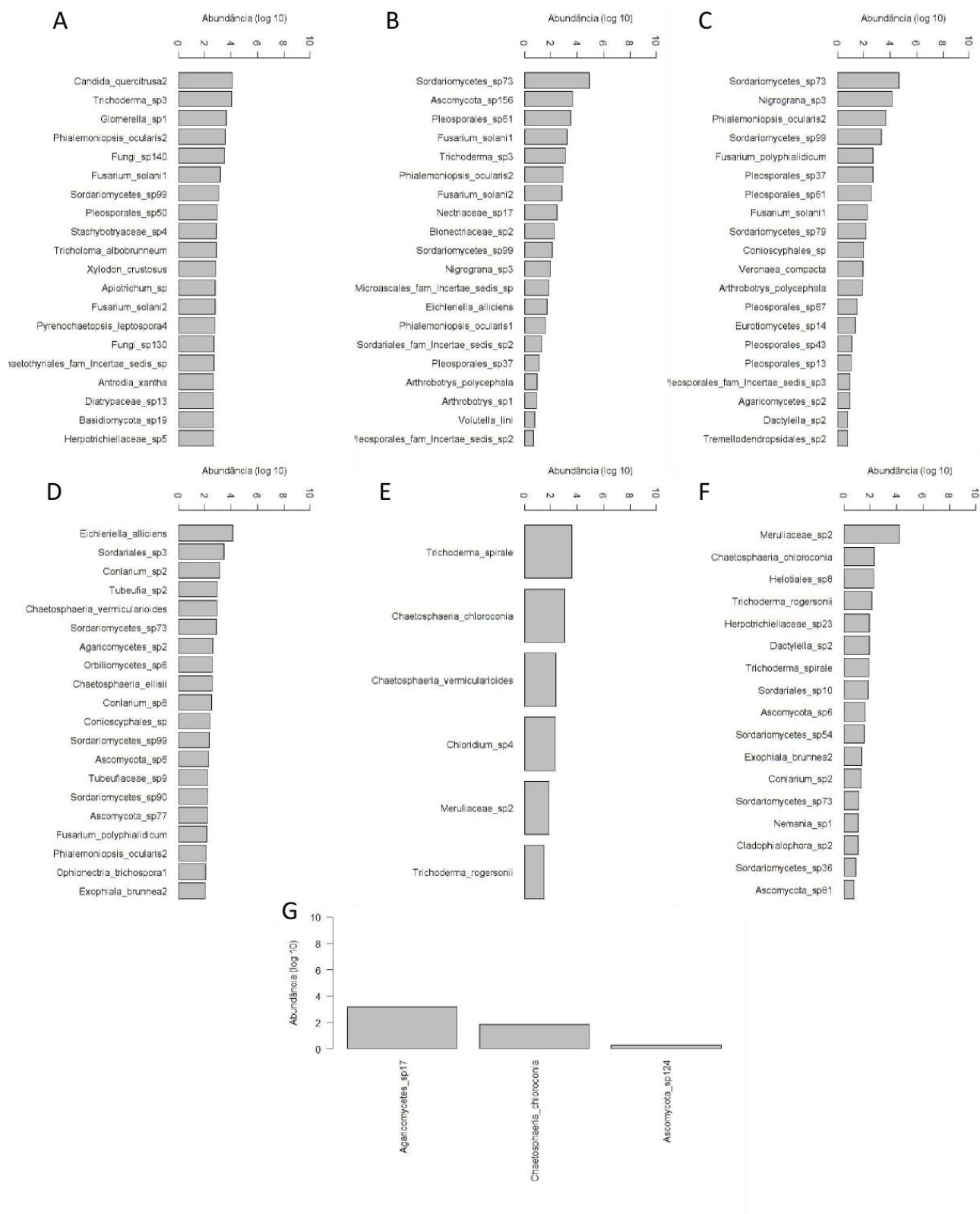


Figura 40 – Gráficos de rank-abundância da amostra PJC1, um dos três galhos de *Piptadenia* do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.

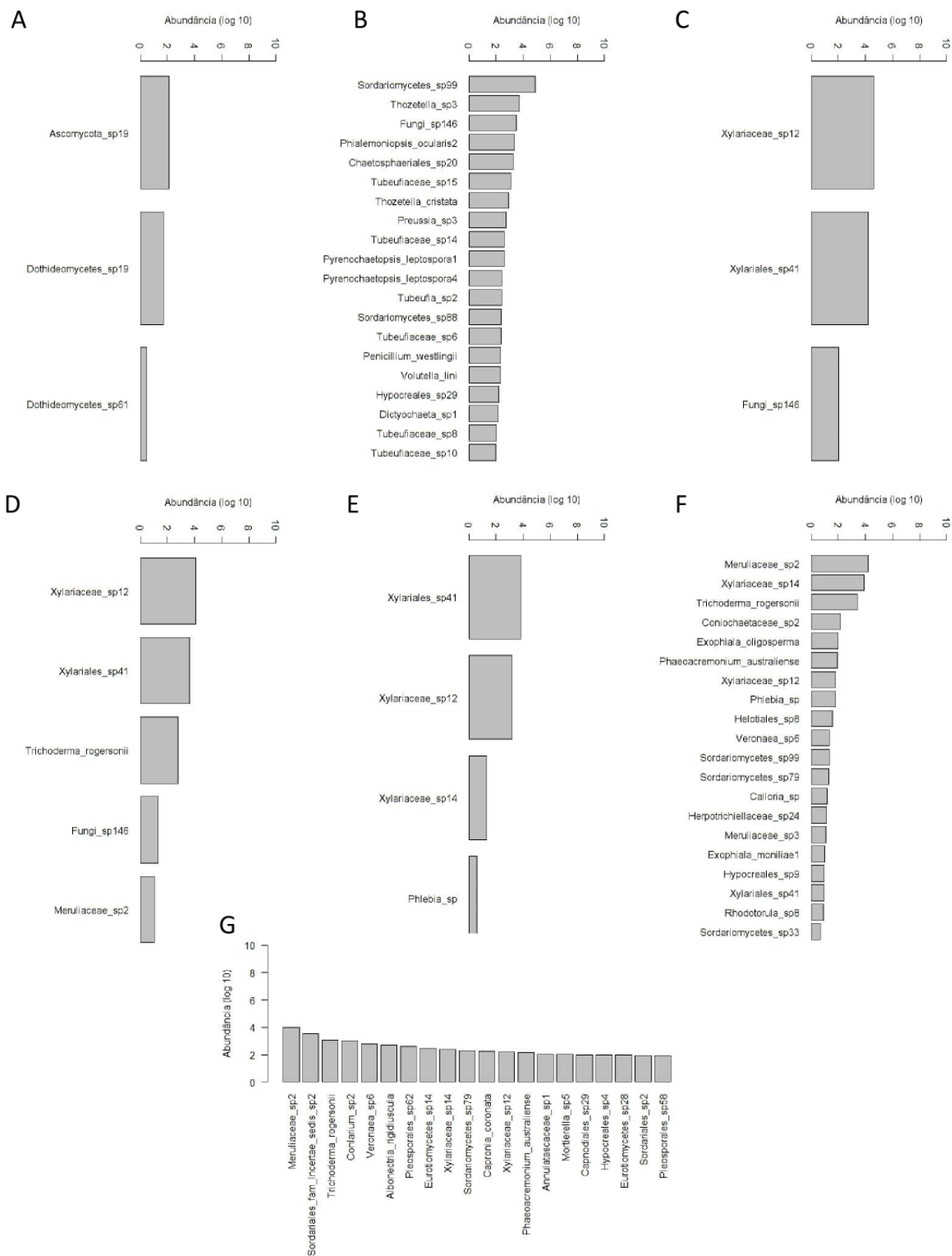


Figura 41 – Gráficos de rank-abundância da amostra CAL1, um dos três galhos de *Calypttranthes* do Ponto 1. A. Tempo 0, B. Tempo 1, C. Tempo 2, D. Tempo 3, E. Tempo 4, F. Tempo 5 e G. Tempo 6.

Considerações finais

Esse trabalho buscou identificar molecularmente as espécies de fungos que ocorrem ao longo do tempo nos galhos de três espécies arbóreas em decomposição para caracterizar a comunidade. Foram quantificados os teores de lignina, celulose, hemicelulose e nitrogênio nos galhos em decomposição ao longo do tempo, além de ser caracterizado o microclima dos diferentes pontos de amostragem. Foi possível perceber a gradual redução da densidade da madeira, bem como de seus componentes principais, demonstrando que há um processo intenso de ciclagem de nutrientes, em algumas amostras a perda de massa ao longo dos dois anos chegou a 70%. Nas amostras de madeira mais densas, esse teor ficou entre 15-20%.

Na associação da estrutura e sucessão da comunidade com a variação bioquímica da madeira percebeu-se uma baixa correlação. De forma geral- todos os galhos foram decompostos e tiveram uma significativa perda de massa. Entretanto, essa perda foi constante entre todas as amostras, o que variou foi a porcentagem de perda ao longo do tempo, demonstrando que a decomposição responde à comunidade fúngica presente e que não é constante durante o processo.

A mesma baixa correlação ocorreu com os fatores microclimáticos, que pouco responderam às variações da comunidade. Pelo experimento ter sido executado numa mesma área – todos os 4 Pontos dentro do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga –, não se detectou uma variação muito brusca de temperatura, umidade ou precipitação, ou seja, não significa que esses fatores não são importantes para a comunidade biótica em si, mas que por não ter diferenças dos fatores abióticos entre os pontos, ele não foi a variável que determinou as diferenças na comunidade.

Quando correlacionados os padrões da comunidade fúngica e a bioquímica da madeira em função da borda e interior do fragmento florestal, isso não afetou o processo de decomposição, o que contrapõe uma das hipóteses propostas em que a borda do fragmento afetaria o processo de decomposição. Talvez pelo fato do fragmento ser pequeno e com uma matriz (urbana) muito expressiva e sem conectividade com outra mata, talvez esse fragmento se comporte como “borda”, ou seja, não retenha as características de uma mata saudável.

Em termos de riqueza de OTUs foi muito interessante perceber o grande aumento no início da decomposição, onde ainda estão presentes no substrato açúcares mais simples e os nichos ainda não definidos. Ao longo do tempo essa riqueza de espécies cai acintosamente, ou seja, as espécies mais especializadas (enzimática e competitivamente) passam a ser mais dominantes, porém com uma riqueza menor.

Houve uma variação na comunidade fúngica ao longo do tempo, o que corrobora nossa hipótese de sucessão fúngica e alternância de espécies. Também não foi possível notar uma especificidade por substrato tão evidente, como encontrada pelos trabalhos em floresta temperada e boreal (PREWITT et al., 2014; PURAHONG et al., 2018), em florestas tropicais é possível que haja maior competição entre as espécies, por notadamente possuir uma maior biodiversidade de espécies de fungos. A influência geográfica teve alguma relevância, demonstrando que, quando muito próximas geograficamente, as espécies tendem a “escolher” um ou outro substrato, e que o *pool* de espécies e os efeitos de prioridade foram os maiores responsáveis por essas variações.

Com base na exploração de dados aqui apresentada, conclui-se que o padrão na decomposição da madeira depende das (ou é influenciado pelas) espécies que participam da sucessão e da abundância das mesmas durante o processo e que há uma

tendência de sucessão de espécies durante a decomposição da madeira, além de que a abundância de espécies pode ser um indicativo do padrão de decomposição da madeira.

Referências

- ABRIL, G. et al. Wood decomposition in Amazonian hydropower reservoirs: An additional source of greenhouse gases. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 44, p. 104–107, 2013.
- AJTAY, L.; KETNER, P.; DURIGNEUD, P. No Title Terrestrial Primary Production of Phytomass. In: BERLIN, B. et al. (Eds.). **The Global Carbon Cycle**. Chichester: John Wiley & Sons, 1979. p. 129–181.
- ALMANY, G. R. Priority effects in coral reef fish communities. **Ecology**, v. 84, n. 7, p. 1920–1935, 2003.
- ANGERS, V. A.; DRAPEAU, P.; BERGERON, Y. Mineralization rates and factors influencing snag decay in four North American boreal tree species. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 42, n. 1, p. 157–166, 2011.
- ARMANI, G.; GALVANI, E. Avaliação do desempenho de um abrigo meteorológico de baixo custo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 14, p. 116–122, 2006.
- BAKYS, R. et al. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. **European Journal of Forest Research**, v. 128, n. 1, p. 51–60, 2009.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecology: from individuals to ecosystems**. 4^a ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- BENEDETTI-CECCHI, L. Priority effects, taxonomic resolution, and the prediction of variable patterns of colonisation of algae in littoral rock pools. **Oecologia**, v. 123, n. 2, p. 265–274, 2000.
- BENGTTSSON-PALME, J. et al. Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 10, p. 914–919, 2013.
- BETTUCCI, L.; SILVA, S. Interspecific interactions between wood-rotting fungi from old standing trees. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 13, p. 11–19, 1992.
- BIJU, C. N.; PEERAN, M. F.; GOWRI, R. Identification and characterization of *Neopestalotiopsis clavispora* associated with leaf blight of small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7–8, p. 532–546, 2018.
- BLANC, L. et al. Dynamics of aboveground carbon stocks in a selectively logged tropical forest. **Ecological Applications**, v. 19, n. 6, p. 1397–1404, 2009.
- BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, n. 3, p. 189–204, 2000.
- BOLIN, B. et al. 1. Global Perspective. In: WATSON, R. T. et al. (Eds.). **Land Use, Land-Use Change, and Forestry**. [s.l.] Cambridge University Press, 2000. p. 23–52.
- BRISCHKE, C.; RAPP, A. O. Dose-response relationships between wood moisture content, wood temperature and fungal decay determined for 23 European field test sites. **Wood Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 507–518, 2008.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

- CARPENTER, S. R. et al. Millennium ecosystem assessment: research needs. **Science**, v. 314, p. 257–258, 2006.
- CHAMBERS, J. Q. et al. Decomposition and carbon cycling of dead trees in tropical forests of the central Amazon. **Oecologia**, v. 122, p. 380–388, 2000.
- CHAMBERS, J. Q. et al. Response of tree biomass and wood litter to disturbance in a Central Amazon forest. **Oecologia**, v. 141, n. 4, p. 596–611, 2004.
- CLINE, L. C. et al. Ecological and functional effects of fungal endophytes on wood decomposition. **Functional Ecology**, v. 32, p. 181–191, 2018.
- CORNELISSEN, J. H. C. et al. Controls on coarse wood decay in temperate tree species: Birth of the LOGLIFE experiment. **Ambio**, v. 41, n. SUPPL.3, p. 231–245, 2012.
- CURTIS, J. T.; MCINTOSH, R. P. An Upland Forest Continuum in the Prairie-Forest Border Region of Wisconsin. **Ecology**, v. 32, n. 3, p. 476–496, 1951.
- DAMM, U. et al. Novel Phaeoacremonium species associated with necrotic wood of Prunus trees. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 20, n. May 2014, p. 87–102, 2008.
- DARWIN, C. **On the origin of Species**. London, UK: Murray, 1859.
- DENCE, C. W. The Determination of lignin. In: LIN, Y. L.; W., D. C. (Eds.). **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin: Springer-Verlage, 1992. p. 33–58.
- FEARNSIDE, P. M. Emissions from tropical hydropower and the IPCC. **Environmental Science & Policy**, v. 50, p. 225–239, 2015.
- FERRAZ, A. et al. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 201–212, 2000.
- FINEGAN, B. et al. Does functional trait diversity predict aboveground biomass and productivity of tropical forests? Testing three alternative hypotheses. **Journal of Ecology**, v. 103, p. 191–201, 2015.
- FISCHER, J.; LINDENMAYER, D. B. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, p. 265–280, 2007.
- FRAVOLINI, G. et al. Quantifying decay progression of deadwood in Mediterranean mountain forests. **Forest Ecology and Management**, v. 408, n. June, p. 228–237, 2018.
- FRØSLEV, T. G. et al. Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. **Nature Communications**, v. 8, p. 1188, 2017.
- FRYAR, S. C. Fungal succession or sequence of fruit bodies? **Fungal Diversity**, v. 10, p. 5–10, 2002.
- FRYAR, S. C. et al. Succession of fungi on dead and live wood in brackish water in Brunei. **Mycologia**, v. 96, n. 2, p. 219–225, 2004.
- FUKAMI, T. et al. Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. **Ecology Letters**, v. 13, p. 675–684, 2010.
- FUKAMI, T. Historical contingency in community assembly : integrating niches, species pools, and priority effects. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 46, n. April, p. 1–23, 2015.

- FUKASAWA, Y. et al. Accumulation and decay dynamics of coarse woody debris in a Japanese old-growth subalpine coniferous forest. **Ecological Research**, v. 29, p. 257–269, 2014.
- FUKASAWA, Y.; MATSUOKA, S. Communities of wood-inhabiting fungi in dead pine logs along a geographical gradient in Japan. **Fungal Ecology**, v. 18, p. 75–82, 2015.
- HARDIN, G. The competitive exclusion principle. **Science**, v. 131, n. 3409, p. 1292–1297, 1960.
- HARMON, M. E. et al. Ecology of Coarse Woody Debris in Temperate Ecosystems. **Advances in Ecological Research**, v. 15, p. 133–302, 1986.
- HARMON, M. E. et al. Differences between standing and downed dead tree wood density reduction factors: A comparison across decay classes and tree species. 2011.
- HARPER, K. A. et al. Edge Influence on Forest Structure and Composition in Fragmented Landscapes. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 768–782, 2005.
- HÉRAULT, B. et al. Modeling decay rates of dead wood in a neotropical forest. **Oecologia**, v. 164, n. 1, p. 243–251, 2010.
- HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v. 52, p. 2–8, 2006.
- HISCOX, J. et al. Priority effects during fungal community establishment in beech wood. **The ISME Journal**, v. 9, p. 2246–2260, 2015a.
- HISCOX, J. et al. Antagonistic fungal interactions influence carbon dioxide evolution from decomposing wood. **Fungal Ecology**, v. 14, p. 24–32, 2015b.
- HISCOX, J. et al. Location, location, location: priority effects in wood decay communities may vary between sites. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 1954–1969, 2016.
- HOPPE, B. et al. Network analysis reveals ecological links between N-fixing bacteria and wood-decaying fungi. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88141, 2014.
- HOPPE, B. et al. A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. **Scientific reports**, v. 5, p. 1–8, 2015.
- HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 53–138, 2011.
- HOUGHTON, R. A. Aboveground forest biomass and the global carbon balance. **Global Change Biology**, v. 11, n. 6, p. 945–958, 2005.
- HU, Z. et al. Linking microbial community composition to C loss rates during wood decomposition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 104, p. 108–116, 2017.
- HURLEY, C. **gclus: Clustering Graphics. R package version 1.3.1**, 2012. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=gclus>>
- HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Introduction to fungal succession. **Fungal Diversity**, v. 10, p. 1–4, 2002.
- IHRMARK, K. et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 666–677, 2012.
- JONES, E. B. G.; HYDE, K. D. Succession: where do we go from here ? **Fungal Diversity**, v. 10, p. 241–253, 2002.

- JØRGENSEN, H. et al. Liquefaction of Lignocellulose at High-Solids Concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 862–870, 2007.
- KENNEDY, P. G.; PEAY, K. G.; BRUNS, T. D. Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: Are priority effects a rule or an exception? **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2098–2107, 2009.
- KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi**. 10. ed. Wallingford: CABI, 2008.
- KÕLJALG, U. et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 5271–5277, 2013.
- KOWALCZYK, J. E.; BENOIT, I.; VRIES, R. P. DE. Regulation of plant biomass utilization in *Aspergillus*. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 88p. 31–56.
- KUBART, A. et al. Fungal communities in Norway spruce stumps along a latitudinal gradient in Sweden. **Forest Ecology and Management**, v. 371, p. 50–58, 2015.
- KUBART, A. et al. Fungal communities in Norway spruce stumps along a latitudinal gradient in Sweden. **Forest Ecology and Management**, v. 371, p. 50–58, 2016.
- KUBARTOVÁ, A. et al. Patterns of fungal communities among and within decaying logs, revealed by 454 sequencing. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 4514–4532, 2012.
- KUBARTOVÁ, A.; OTTOSSON, E.; STENLID, J. Linking fungal communities to wood density loss after 12 years of log decay. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 5, p. 0–11, 2015.
- KUTHUBUTHEEN, A. J.; WEBSTER, J. Water availability and the coprophilous fungus succession. **Transactions - British Mycological Society**, v. 86, n. 1, p. 63–76, 1986.
- LANGE, M. Sequence of macromycetes on decaying beech logs. **Persoonia**, v. 14, n. 4, p. 449–456, 1992.
- LAWLER, S. P.; MORIN, P. J. Temporal overlap, competition, and priority effects in larval anurans. **Ecology**, v. 74, n. 1, p. 174–182, 1993.
- LIEW, E. C. Y. et al. Molecular approaches to assessing fungal diversity in the natural environment. **Fungal Diversity**, v. 1, p. 1–17, 1998.
- LOREAU, M. et al. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. **Science**, v. 294, p. 804–808, 2001.
- LOUETTE, G.; DE MEESTER, L. Predation and priority effects in experimental zooplankton communities. **Oikos**, v. 116, n. 3, p. 419–426, 2007.
- MÄKELÄ, M. R.; DONOFRIO, N.; DE VRIES, R. P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 2–9, 2014.
- MÄKINEN, H. et al. Predicting the decomposition of Scots pine, Norway spruce, and birch stems in Finland. **Ecological Applications**, v. 16, n. 5, p. 1865–1879, 2006.
- MÄKIPÄÄ, R. et al. Interactions between soil- and dead wood-inhabiting fungal communities during the decay of Norway spruce logs. **The ISME Journal**, v. 11, n. 9, p. 1964–1974, 2017.
- MARANO, A. V. et al. Diversity, role in decomposition, and succession of zoospore fungi and straminipiles on submerged decaying leaves in a woodland stream. **Hydrobiologia**, v. 659, n. 1, p. 93–109, 2011.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads kenkyuhoi hojokin gan rinsho kenkyu jigyo. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2013.

- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.
- MEANS, J. E.; CROMACK JR., K.; MACKMILLAN, P. C. Comparison of decomposition models using wood density of Douglas-fir logs. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 15, p. 1092–1098, 1985.
- MELHEM, T. S. et al. Planejamento para elaboração da "Flora Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). **Hoehnea**, v. 9, p. 63–74, 1981.
- MISCHNICK, P.; MOMCILOVIC, D. Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives. In: **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 64p. 118–210.
- MOSTERT, L. et al. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1752–1767, 2005.
- NIMZ, H. H. et al. Wood. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. 39, p. 453–505, 2012.
- OBREGÓN, V. G. et al. First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina. **Plant Disease**, v. 102, n. 9, p. 1856–1856, 2018.
- OKSANEN, J. et al. **vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-1**, 2018. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=vegan>>
- OLIVEIRA, A. M. F. et al. Agentes destruidores de madeira. Vol. 1. In: LEPAGE, E. S. (Ed.). **Manual de Preservação de madeiras**. São Paulo: IPT, 1986. p. 99–278.
- OTTOSSON, E. et al. Diverse ecological roles within fungal communities in decomposing logs of *Picea abies*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 3, p. 1–13, 2015.
- PALMER, T. M.; YOUNG, T. P.; STANTON, M. L. Burning bridges: Priority effects and the persistence of a competitively subordinate acacia-ant in Laikipia, Kenya. **Oecologia**, v. 133, n. 3, p. 372–379, 2002.
- PANEBIANCO, C.; TAM, W. Y.; JONES, E. B. G. The effect of pre-inoculation of balsa wood by selected marine fungi and their effect on subsequent colonisation in the sea. **Fungal Diversity**, v. 10, p. 77–88, 2002.
- PEAY, K. G.; BELISLE, M.; FUKAMI, T. Phylogenetic relatedness predicts priority effects in nectar yeast communities. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 279, p. 749–758, 2011.
- PERDOMO, H. et al. *Phialemoniopsis*, a new genus of Sordariomycetes, and new species of *Phialemonium* and *Lecythophora*. **Mycologia**, v. 105, n. 2, p. 398–421, 2013.
- PLANO DE MANEJO DO PEFI. **Plano de manejo do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <http://botanica.sp.gov.br/institutodebotanica/files/2014/07/pefi-_plano-de-manejo.pdf>.
- PONGE, J. F. Succession of fungi and fauna during decomposition of needles in a small area of Scots pine litter. **Plant and Soil**, v. 138, p. 99–113, 1991.
- PREWITT, L. et al. Fungal and bacterial community succession differs for three wood types during decay in a forest soil. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 2, p. 212–221, 2014.
- PURAHONG, W. et al. Molecular evidence strongly supports deadwood-inhabiting fungi exhibiting unexpected tree species preferences in temperate forests. **ISME Journal**, v. 12, n. 1, p. 289–295, 2018.

- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2017. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>
- RAYNER, A. D. M.; TODD, N. K. Population and Community Structure and Dynamics of Fungi in Decaying Wood. **Advances in Botanical Research**, v. 7, p. 333–420, 1979.
- REBLOVÁ, M.; BARR, M. E.; SAMUELS, G. J. Chaetosphaeriaceae , a new family for Chaetosphaeria and its relatives. **Sydowia**, v. 51, n. 1, p. 49–70, 1999.
- RÉJOU-MÉCHAIN, M. et al. Local spatial structure of forest biomass and its consequences for remote sensing of carbon stocks. **Biogeosciences**, v. 11, n. 23, p. 6827–6840, 2014.
- RICHARDSON, M. J. The coprophilous succession. **Fungal Diversity**, v. 10, p. 101–111, 2002.
- RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47, 2015.
- ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.
- ROMERO, L. M.; SMITH, T. J.; FOURQUREAN, J. W. Changes in mass and nutrient content of wood during decomposition in a south Florida mangrove forest. **Journal of Ecology**, v. 93, n. 3, p. 618–631, 2005.
- RUNNEL, K.; TAMM, H.; LÖHMUS, A. Surveying wood-inhabiting fungi: Most molecularly detected polypore species form fruit-bodies within short distances. **Fungal Ecology**, v. 18, p. 93–99, 2015.
- SALOMÃO, R. P.; SANTANA, A. C.; NETO, S. V. C. Construção de índices de valor de importância de espécies para análise fitossociológica de floresta ombrófila através de análise multivariada. **Floresta**, v. 42, n. 1, p. 115–128, 2012.
- SANTHANAM, N. et al. Lignocellulose Decomposition by Microbial Secretions. In: BALUŠKA, F.; VIVANCO, J. (Eds.). **Secretions and Exudates in Biological Systems**. Berlin Heidelberg: Springer, 2012. v. 12p. 125–153.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Sucessão fúngica em folhas de Ficus microcarpa L.f. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 95–101, 1989.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ, A. I. Fungal succession on leaves of Alchornea triplinervia (Spreng.) M. Arg. submerged in a stream of an Atlantic Rainforest in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 3, p. 253–259, 1998.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; MILANEZ, A. I. Sucessão fúngica em folhas de Quercus robur L. (carvalho) submersas em um lago situado no município de Itapeverica da Serra, SP. **Revista de Microbiologia**, v. 21, n. 1, p. 61–67, 1990.
- SOLOMON, S. et al. **Climate Change 2007: The Physical Science Basis - contribution to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- STOKLAND, J. N.; SIITONEN, J.; JONSSON, B. G. **Biodiversity in Dead Wood**. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- SUTHERLAND, J. B. et al. Breakdown of Douglas-fir phloem by a lignocellulose-degrading Streptomyces. **Current Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–126, 1979.
- SWIFT, M. J. et al. The Decomposition of Branch-Wood in the Canopy and Floor of a Mixed Deciduous Woodland. **Oecologia**, v. 26, p. 139–149, 1976.

- TAN, J. et al. Species phylogenetic relatedness, priority effects, and ecosystem functioning. **Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1164–1172, 2012.
- TANG, A. M. C.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. Phylogenetic utility of protein (RPB2, β -tubulin) and ribosomal (LSU, SSU) gene sequences in the systematics of Sordariomycetes (Ascomycota, Fungi). **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 327–349, 2007.
- TANUS, M. R. **Florística e estrutura da comunidade arbóreo-arbustiva e o efeito de borda em trecho de Mata Atlântica no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP**. [s.l.] Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011.
- TANUS, M. R. et al. Estrutura e composição de um trecho de Mata Atlântica no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 39, n. 1, p. 157–168, 2012.
- TRUGILHO, P. F. et al. Comparação de métodos de determinação da densidade básica em madeira. **Acta Amazonica**, v. 20, p. 307–319, 1990.
- TSUNEDA, A. **Fungal morphology and ecology – Mostly scanning electron microscopy**. Tokyo: Tottori Mycological Institute, 1983.
- VAN DER WAL, A.; OTTOSSON, E.; DE BOER, W. Neglected role of fungal community composition in explaining variation in wood decay rates. **Ecology**, v. 96, n. 1, p. 124–133, 2015.
- VAZ, A. B. M. et al. Using Next-Generation Sequencing (NGS) to uncover diversity of wood-decaying fungi in neotropical atlantic forests. **Phytotaxa**, v. 295, n. 1, p. 1–21, 2017.
- VRIES, R. P. DE; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.
- WESLIEN, J. et al. Long-term priority effects among insects and fungi colonizing decaying wood. **Journal of Animal Ecology**, v. 80, n. 6, p. 1155–1162, 2011.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, Inc., 1990. p. 482.
- WILBUR, H. M.; ALFORD, R. A. Priority Effects in Experimental Pond Communities: Responses of Hyla to Bufo and Rana. **Ecology**, v. 66, n. 4, p. 1106–1114, 1985.
- YATSKOV, M.; HARMON, M. E.; KRANKINA, O. N. A chronosequence of wood decomposition in the boreal forests of Russia. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 33, p. 1211–1226, 2003.
- ZHOU, D.; HYDE, K. D. Fungal succession on bamboo in Hong Kong. **Fungal Diversity**, v. 10, p. 213–227, 2002.

Anexos

Anexo 1 – Comprovante SisGen



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A8EB7CB

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A8EB7CB**
Usuário: **Ricardo Matheus Pires**
CPF/CNPJ: **358.365.188-07**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **Análise da decomposição da madeira em fragmento de mata atlântica: caracterização do substrato, estrutura da comunidade fúngica e o processo sucessional**

Equipe

Ricardo Matheus Pires Instituto de Botânica
Adriana de Mello Gugliotta Instituto de Botânica

Parceiras Nacionais

63.025.530/0100-96 / Universidade de São Paulo

Parceiras no Exterior

Københavns Universitet

Data do Cadastro: **08/11/2017 14:25:24**
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:57** de **08/11/2017**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 2 – Códigos usados para nomear as amostras

Códigos utilizados para nomear as amostras das três espécies de plantas lenhosas (ALC = *Alchornea sidifolia*, PJC = *Piptadenia gonoacantha*, CAL = *Calypttranthes grandifolia*), em duas áreas diferentes de borda de fragmento e duas áreas no interior (P1 a P4), monitorado por dois anos, com amostragens a cada 4 meses (Tempo 0 ao Tempo 6; T0 = Março/2016; T1 = Julho/2016; T2 = Novembro/2016; T3 = Março/2017; T4 = Julho/2017; T5 = Novembro/2017; T6 = Março/2018).

Cód.	Amostra	Cód.	Amostra	Cód.	Amostra	Cód.	Amostra
1	T0, P1, ALC 1	64	T1, P4, ALC 1	127	T3, P3, ALC 1	190	T5, P2, ALC 1
2	T0, P1, ALC 2	65	T1, P4, ALC 2	128	T3, P3, ALC 2	191	T5, P2, ALC 2
3	T0, P1, ALC 3	66	T1, P4, ALC 3	129	T3, P3, ALC 3	192	T5, P2, ALC 3
4	T0, P1, PJC 1	67	T1, P4, PJC 1	130	T3, P3, PJC 1	193	T5, P2, PJC 1
5	T0, P1, PJC 2	68	T1, P4, PJC 2	131	T3, P3, PJC 2	194	T5, P2, PJC 2
6	T0, P1, PJC 3	69	T1, P4, PJC 3	132	T3, P3, PJC 3	195	T5, P2, PJC 3
7	T0, P1, CAL 1	70	T1, P4, CAL 1	133	T3, P3, CAL 1	196	T5, P2, CAL 1
8	T0, P1, CAL 2	71	T1, P4, CAL 2	134	T3, P3, CAL 2	197	T5, P2, CAL 2
9	T0, P1, CAL 3	72	T1, P4, CAL 3	135	T3, P3, CAL 3	198	T5, P2, CAL 3
10	T0, P2, ALC 1	73	T2, P1, ALC 1	136	T3, P4, ALC 1	199	T5, P3, ALC 1
11	T0, P2, ALC 2	74	T2, P1, ALC 2	137	T3, P4, ALC 2	200	T5, P3, ALC 2
12	T0, P2, ALC 3	75	T2, P1, ALC 3	138	T3, P4, ALC 3	201	T5, P3, ALC 3
13	T0, P2, PJC 1	76	T2, P1, PJC 1	139	T3, P4, PJC 1	202	T5, P3, PJC 1
14	T0, P2, PJC 2	77	T2, P1, PJC 2	140	T3, P4, PJC 2	203	T5, P3, PJC 2
15	T0, P2, PJC 3	78	T2, P1, PJC 3	141	T3, P4, PJC 3	204	T5, P3, PJC 3
16	T0, P2, CAL 1	79	T2, P1, CAL 1	142	T3, P4, CAL 1	205	T5, P3, CAL 1
17	T0, P2, CAL 2	80	T2, P1, CAL 2	143	T3, P4, CAL 2	206	T5, P3, CAL 2
18	T0, P2, CAL 3	81	T2, P1, CAL 3	144	T3, P4, CAL 3	207	T5, P3, CAL 3
19	T0, P3, ALC 1	82	T2, P2, ALC 1	145	T4, P1, ALC 1	208	T5, P4, ALC 1
20	T0, P3, ALC 2	83	T2, P2, ALC 2	146	T4, P1, ALC 2	209	T5, P4, ALC 2
21	T0, P3, ALC 3	84	T2, P2, ALC 3	147	T4, P1, ALC 3	210	T5, P4, ALC 3
22	T0, P3, PJC 1	85	T2, P2, PJC 1	148	T4, P1, PJC 1	211	T5, P4, PJC 1
23	T0, P3, PJC 2	86	T2, P2, PJC 2	149	T4, P1, PJC 2	212	T5, P4, PJC 2
24	T0, P3, PJC 3	87	T2, P2, PJC 3	150	T4, P1, PJC 3	213	T5, P4, PJC 3
25	T0, P3, CAL 1	88	T2, P2, CAL 1	151	T4, P1, CAL 1	214	T5, P4, CAL 1
26	T0, P3, CAL 2	89	T2, P2, CAL 2	152	T4, P1, CAL 2	215	T5, P4, CAL 2
27	T0, P3, CAL 3	90	T2, P2, CAL 3	153	T4, P1, CAL 3	216	T5, P4, CAL 3
28	T0, P4, ALC 1	91	T2, P3, ALC 1	154	T4, P2, ALC 1	217	T6, P1, ALC 1
29	T0, P4, ALC 2	92	T2, P3, ALC 2	155	T4, P2, ALC 2	218	T6, P1, ALC 2
30	T0, P4, ALC 3	93	T2, P3, ALC 3	156	T4, P2, ALC 3	219	T6, P1, ALC 3
31	T0, P4, PJC 1	94	T2, P3, PJC 1	157	T4, P2, PJC 1	220	T6, P1, PJC 1

32	T0, P4, PJC 2	95	T2, P3, PJC 2	158	T4, P2, PJC 2	221	T6, P1, PJC 2
33	T0, P4, PJC 3	96	T2, P3, PJC 3	159	T4, P2, PJC 3	222	T6, P1, PJC 3
34	T0, P4, CAL 1	97	T2, P3, CAL 1	160	T4, P2, CAL 1	223	T6, P1, CAL 1
35	T0, P4, CAL 2	98	T2, P3, CAL 2	161	T4, P2, CAL 2	224	T6, P1, CAL 2
36	T0, P4, CAL 3	99	T2, P3, CAL 3	162	T4, P2, CAL 3	225	T6, P1, CAL 3
37	T1, P1, ALC 1	100	T2, P4, ALC 1	163	T4, P3, ALC 1	226	T6, P2, ALC 1
38	T1, P1, ALC 2	101	T2, P4, ALC 2	164	T4, P3, ALC 2	227	T6, P2, ALC 2
39	T1, P1, ALC 3	102	T2, P4, ALC 3	165	T4, P3, ALC 3	228	T6, P2, ALC 3
40	T1, P1, PJC 1	103	T2, P4, PJC 1	166	T4, P3, PJC 1	229	T6, P2, PJC 1
41	T1, P1, PJC 2	104	T2, P4, PJC 2	167	T4, P3, PJC 2	230	T6, P2, PJC 2
42	T1, P1, PJC 3	105	T2, P4, PJC 3	168	T4, P3, PJC 3	231	T6, P2, PJC 3
43	T1, P1, CAL 1	106	T2, P4, CAL 1	169	T4, P3, CAL 1	232	T6, P2, CAL 1
44	T1, P1, CAL 2	107	T2, P4, CAL 2	170	T4, P3, CAL 2	233	T6, P2, CAL 2
45	T1, P1, CAL 3	108	T2, P4, CAL 3	171	T4, P3, CAL 3	234	T6, P2, CAL 3
46	T1, P2, ALC 1	109	T3, P1, ALC 1	172	T4, P4, ALC 1	235	T6, P3, ALC 1
47	T1, P2, ALC 2	110	T3, P1, ALC 2	173	T4, P4, ALC 2	236	T6, P3, ALC 2
48	T1, P2, ALC 3	111	T3, P1, ALC 3	174	T4, P4, ALC 3	237	T6, P3, ALC 3
49	T1, P2, PJC 1	112	T3, P1, PJC 1	175	T4, P4, PJC 1	238	T6, P3, PJC 1
50	T1, P2, PJC 2	113	T3, P1, PJC 2	176	T4, P4, PJC 2	239	T6, P3, PJC 2
51	T1, P2, PJC 3	114	T3, P1, PJC 3	177	T4, P4, PJC 3	240	T6, P3, PJC 3
52	T1, P2, CAL 1	115	T3, P1, CAL 1	178	T4, P4, CAL 1	241	T6, P3, CAL 1
53	T1, P2, CAL 2	116	T3, P1, CAL 2	179	T4, P4, CAL 2	242	T6, P3, CAL 2
54	T1, P2, CAL 3	117	T3, P1, CAL 3	180	T4, P4, CAL 3	243	T6, P3, CAL 3
55	T1, P3, ALC 1	118	T3, P2, ALC 1	181	T5, P1, ALC 1	244	T6, P4, ALC 1
56	T1, P3, ALC 2	119	T3, P2, ALC 2	182	T5, P1, ALC 2	245	T6, P4, ALC 2
57	T1, P3, ALC 3	120	T3, P2, ALC 3	183	T5, P1, ALC 3	246	T6, P4, ALC 3
58	T1, P3, PJC 1	121	T3, P2, PJC 1	184	T5, P1, PJC 1	247	T6, P4, PJC 1
59	T1, P3, PJC 2	122	T3, P2, PJC 2	185	T5, P1, PJC 2	248	T6, P4, PJC 2
60	T1, P3, PJC 3	123	T3, P2, PJC 3	186	T5, P1, PJC 3	249	T6, P4, PJC 3
61	T1, P3, CAL 1	124	T3, P2, CAL 1	187	T5, P1, CAL 1	250	T6, P4, CAL 1
62	T1, P3, CAL 2	125	T3, P2, CAL 2	188	T5, P1, CAL 2	251	T6, P4, CAL 2
63	T1, P3, CAL 3	126	T3, P2, CAL 3	189	T5, P1, CAL 3	252	T6, P4, CAL 3