



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DA ENZIMA LACASE DE FUNGOS DO
PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

JAQUELINE BAIL

Foz do Iguaçu
2020



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DA ENZIMA LACASE DE FUNGOS DO
PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

JAQUELINE BAIL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

Orientador: Prof.a. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz do Iguaçu
2020

JAQUELINE BAIL

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DA ENZIMA LACASE DE FUNGOS DO
PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof.a. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA



Prof. Dr. Wagner Antonio Chiba de Castro
UNILA



Prof.a. Dra. Maria Claudia Gross
UNILA

Foz do Iguaçu, 15 de junho de 2020.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

B153a

Bail, Jaqueline.

Avaliação genética e funcional da enzima lacase de fungos do Parque Nacional do Iguazu / Jaqueline Bail. - Foz do Iguazu, 2020.

72 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, JU, Biociências.

Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

1. Enzimas de fungos. 2. Serapilheira. 3. Parque Nacional do Iguazu (PR). I. Santos, Rafaella Costa Bonugli. II. Título.

CDU 582.28

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele eu não teria chegado até aqui. Obrigada pela inexplicável força e imenso amor e cuidado. Por ter me carregado no colo nos dias mais difíceis, me impedindo de desistir. Gratidão.

Aos meus pais, pois sem o seu apoio e amor este sonho não se realizaria. Obrigada, vocês são únicos e muito amados.

As minhas irmãs, pois sem os seus abraços e palavras aconchegantes tudo seria mais difícil. Obrigada, vocês são as melhores amigas que eu poderia ter.

A minha orientadora Prof.a. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos, pela paciência e dedicação infinita em ensinar-me a ser melhor a cada dia. Obrigada por acreditar em mim e por ter sido muito mais que uma orientadora, uma amiga. Serás para sempre um exemplo a ser seguido.

Aos profissionais Prof. Dr. Wagner Antonio Chiba de Castro, Giselle Cristina de Oliveira Vaz e Jose Alejandro Morales Gomez, o meu sincero agradecimento. Sem a sua contribuição este trabalho não seria o mesmo.

A Universidade Federal da Integração Latino-Americana, pela bolsa de estudos UNILA/DS que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e atividades afins.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pois sem o seu financiamento (processo 406563/2016-0) este trabalho não seria realizado.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

***“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que a fez tão importante.”***

(Antoine de Saint-Exupéry)

Bail, Jaqueline. Avaliação genética e funcional da enzima lacase de fungos do Parque Nacional do Iguaçu. 2020. 72 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

As lacases, enzimas multicobre oxidases, são produzidas na natureza principalmente por fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, e possuem grande importância ambiental, especialmente no processo de decomposição e mineralização da serapilheira florestal e do ciclo do carbono. Além disso, lacases são enzimas de grande importância biotecnológica em diversos setores industriais. Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética e funcional da enzima lacase de fungos da serapilheira do Parque Nacional do Iguaçu (PNI), o mais importante contínuo biológico do Centro-Sul da América do Sul. Foram estudadas duas condições decorrentes de ações antropogênicas, sendo um microhabitat de transição com a fronteira agrícola e uma região contendo serapilheira da espécie vegetal invasora *Tradescantia zebrina* em comparação com as espécies nativas. O potencial enzimático foi avaliado para 40 fungos isolados do microhabitat de transição com a fronteira agrícola do PNI em estudos anteriores e depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Biotecnológico e Ambiental (CCMIBA) da Unila, e 82% foram positivos, destacando as linhagens EL com 0.931 UL e FM com 0.676 UL. A atividade da lacase se mostrou estável, confirmando que esta pode participar ativamente dos processos ecossistêmicos do PNI, como o ciclo do carbono e ciclagem de nutrientes. Em adição, a análise revelou 33 fungos com potencial biotecnológico preservados na CCMIBA. O perfil genético e funcional dos fungos da serapilheira da invasora foi avaliado em comparação com a serapilheira nativa usando a metodologia de *metabarcoding*, através do sistema Illumina MiSeq. O *metabarcoding* da região ITS do DNAr resultou em 188 ASVs (variante de sequência única) na amostra nativa e 242 ASVs na amostra de serapilheira da invasora, com apenas 63 ASVs compartilhadas. Ascomycota foi o filo mais abundante com 57% na amostra nativa e 96% na amostra da invasora. Basidiomycota esteve presente com 41% na nativa e apenas 3% na invasora, filo que engloba os principais fungos produtores de lacases. Através da análise da diversidade α , verificamos que a serapilheira invadida por *T. zebrina* apresentou riqueza e uniformidade maior. Na análise funcional das bibliotecas, usando, usando uma ferramenta de anotação aberta (FUNGuild), a abundância de saprotróficos sobrepôs-se com 44% de ASVs classificadas em ambas as amostras. Logo, apesar da ausência dos basidiomicetos na serapilheira da invasora, a atividade da lacase não pode ser descartada uma vez que a enzima é relatada também em saprófitas do filo Ascomycota. Contudo, a maior ausência de basidiomicetos indica uma diminuição efetiva na biomassa lignocelulolítica. O presente resultado confirma os dados da literatura, que os impactos das invasões são muito complexos e possuem potencial de alterar permanentemente a diversidade e estrutura das comunidades microbianas. Por fim, nosso trabalho indicou possivelmente o efeito da redundância funcional na serapilheira invadida em relação a degradação da biomassa e que a falta de entrada de detritos ricos em lignina, resultado da ausência de degradadores, pode ter implicações na estabilidade em longo prazo do teor de carbono do solo do PNI.

Palavras-chave: Enzimas ligninolíticas. Guildas funcionais. Ascomycota. Basidiomycota. *Metabarcoding*. Serapilheira invasora.

Bail, Jaqueline. Genetic and functional evaluation of laccase enzymes in fungi from Iguaçu National Park. 2020. 72 pages. Master's Dissertation of the Post-Graduate Program in Biosciences - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Laccases, multi-oxidase enzymes, are produced in nature mainly by fungi from the phylum Ascomycota and Basidiomycota, and have significant environmental importance, especially in the decomposition and mineralization process of forest litter and the carbon cycle. Also, laccases are enzymes of great biotechnological importance in several industrial sectors. This work aimed to analyze the genetic and functional diversity of the enzyme laccase of fungi of the litter of the Iguaçu National Park (INP), an essential biological continuum in South-Central South America. Two conditions resulting from anthropogenic actions were studied: a transitional microhabitat with the agricultural frontier and a litter region of the invasive species *Tradescantia zebrina* compared to native species. The enzymatic potential was evaluated for 40 fungi isolated from the transition microhabitat with the agricultural frontier of the INP in previous studies and deposited in the Culture Collection of Microorganisms of Biotechnological and Environmental Interest (CCMIBA) from Unila, and 82% were positive, highlighting the strains EL with 0.931 UL and FM with 0.676 UL. Laccase activity proved to be stable, confirming that it can actively participate in the PNI ecosystem processes, such as the carbon cycle and nutrient cycling. Besides, the analysis revealed 33 fungi with biotechnological potential preserved at CCMIBA. The genetic and functional profile of the invasive litter fungi was evaluated compared to the native litter using the metabarcoding methodology, using the Illumina MiSeq system. The metabarcoding of the DNAr ITS region resulted in 188 ASVs (single sequence variant) in the native sample and 242 ASVs in the invader's litter sample, with only 63 shared ASVs. Ascomycota was the most abundant phylum, with 57% in the native sample and 96% in the invader sample. Basidiomycota was present with 41% in the native and only 3% in the invasive, phylum that includes the primary laccase-producing fungi. Through the analysis of α diversity, we verified that the litter invaded by *T. zebrina* showed greater richness and uniformity. In the libraries' functional analysis, using an open annotation tool (FUNGuild), the abundance of saprotrophs overlapped with 44% of ASVs classified in both samples. Therefore, despite the absence of basidiomycetes in the invader's litter, laccase activity cannot be ruled out, since the enzyme is also reported in saprophytes of the phylum Ascomycota. However, the higher absence of basidiomycetes indicates an effective decrease in lignocellulolytic biomass. The present result confirms the literature, that the impacts of invasions are very complex and can permanently alter the diversity and structure of microbial communities. Finally, our work possibly indicated the effect of functional redundancy on the invaded litter concerning biomass degradation. The lack of entry of lignin-rich debris, resulting from the absence of degraders, may have implications for the long-term stability of the carbon from the PNI soil.

Keywords: Ligninolytic enzymes. Functional guilds. Ascomycota. Basidiomycota. Metabarcoding. Litter invasive.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 Parque Nacional do Iguaçu..... | 11 |
| 1.2 Ciclagem de nutrientes nos solos naturais..... | 15 |
| 1.3 Atividade fúngica na decomposição do solo..... | 17 |
| 1.4 Fungos ligninolíticos..... | 21 |
| 1.5 Lacase..... | 23 |
| 1.6 Estratégias para o estudo da lacase na pesquisa ecológica e na biotecnologia ambiental..... | 28 |
| 1.7 Justificativa..... | 29 |
| 2 OBJETIVOS..... | 31 |
| 2.1 Geral | 31 |
| 2.2 Específicos..... | 31 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 Área de estudo..... | 32 |
| 3.1.1 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu..... | 32 |
| 3.1.2 <i>Metabarcoding</i> de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por <i>Tradescantia zebrina</i> | 33 |
| 3.2 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu..... | 34 |
| 3.2.1 Avaliação da atividade da lacase em meio de cultivo líquido..... | 34 |
| 3.3 <i>Metabarcoding</i> de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por <i>Tradescantia zebrina</i> | 35 |
| 3.3.1 Extração do DNA..... | 35 |
| 3.3.4 Sequenciamento das amostras..... | 37 |
| 3.3.4.1 Amplificação região ITS..... | 37 |
| 3.3.4.2 Reação de Indexação | 38 |
| 3.3.4.3 Purificação e Quantificação da Biblioteca | 38 |
| 3.3.5 Bioinformática | 39 |
| 3.4 Análises Estatísticas..... | 40 |
| 4 RESULTADOS | 42 |
| 4.1 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu..... | 42 |
| 4.2 <i>Metabarcoding</i> de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por <i>Tradescantia zebrina</i> | 43 |
| 5 DISCUSSÕES | 49 |
| 5.1 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu..... | 49 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2 <i>Metabarcoding</i> de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por <i>Tradescantia zebrina</i> | 50 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 57 |
| 7 REFERÊNCIAS | 59 |
| 8 APÊNDICES | 72 |
| 8.1 Gêneros totais identificados | 72 |

1 INTRODUÇÃO

As lacases, também conhecidas como enzimas multicobre oxidases, são produzidas na natureza em maior quantidade por fungos, especialmente dos filos Ascomycota e Basidiomycota, predominando neste último grupo, que também são chamados de fungos da podridão branca (Mishra et al., 2010; Baldrian, 2006). Lacases fúngicas possuem grande importância ambiental pois participam do ciclo do carbono, através da degradação de compostos de plantas recalcitrantes, especialmente a lignina, que é o segundo mais abundante biopolímero da terra (Baldrian, 2006). Ademais, estes fungos são os principais propulsores do processo de decomposição e mineralização da serapilheira florestal (Bardgett, 2005; de Graff et al., 2010). Além da importância ecológica, as lacases possuem amplo campo de aplicação biotecnológica como a eficiente degradação de fármacos (Touahar et al., 2014; Lloret et al., 2012), e uma ampla gama de atividades industriais, como a detoxificação de efluentes, remoção de fenóis de alimentos e bebidas, degradação de corantes, biodegradação de componentes xenobióticos, biosensores, dentre outras atividades (Arora & Sharma, 2010). Claramente, as indústrias possuem grande interesse em enzimas diferenciadas, como lacases, que consigam suportar diversas condições industriais como variação de temperatura, pH e compostos inorgânicos como metais (Binod *et al.*, 2011).

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é considerado a maior unidade de conservação no domínio da Mata Atlântica de interior do país, integrando o mais importante contínuo biológico do Centro-Sul da América do Sul (IBAMA, 2018). Como uma unidade de conservação o parque tem como princípio a presença de áreas naturais passíveis de proteção por suas características especiais, porém a unidade não está isenta dos impactos naturais e antropogênicos, como regiões de fronteiras agrícolas e alterações da flora nativa (Rodolfo *et al.*, 2007).

No PNI existem diversas áreas de transição ambiental, especialmente áreas de fronteiras com regiões agrícolas. Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito dessas alterações para os micro-organismos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos e nas atividades enzimáticas. Em adição, o PNI apresenta diversas regiões invadidas por espécies vegetais exóticas, como *Tradescantia zebrina*. Espécies que ocasionam danos ao ecossistema a que foram inseridas, assim como eventuais prejuízos econômicos, são denominadas invasoras, e representam uma das maiores ameaças à biodiversidade e ao fornecimento de serviços ecossistêmicos (Burgiel & Muir, 2010; Simberloff, 2005). Nos ecossistemas naturais, os impactos das invasões biológicas são complexos e mostraram, até o momento, potencial de alterar permanentemente a diversidade e estrutura das comunidades microbianas além de causar extinções de espécies (Sakai *et al*, 2000; Dogra *et al*, 2010). Uma vez que a matéria orgânica vegetal influencia tanto a atividade quanto a biomassa microbiana do solo, detritos de espécies invasoras vegetais são capazes de alterar significativamente as comunidades microbianas do solo e consequentemente o ecossistema como um todo (Herrera, 2011; Kourtev *et al*, 2002).

Neste sentido, nosso projeto visou avaliar a importância da lacase de fungos do PNI, diante de ações antropogênicas: um microhabitat de transição com a fronteira agrícola; e uma região contendo serapilheira da espécie vegetal invasora *Tradescantia zebrina* em comparação com a serrapilheira das espécies nativas. O potencial funcional da enzima lacase foi avaliado para fungos isolados do microhabitat de transição com a fronteira agrícola do PNI em estudos anteriores e depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Biotecnológico e Ambiental (CCMIBA) da Unila, e o perfil genético e funcional dos fungos da serapilheira da invasora foi avaliado em comparação com a serapilheira nativa usando a metodologia de metabarconding, através do sistema Illumina MiSeq.

1.1 PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI), localizado na bacia do rio Iguaçu, possui área total de 185.262,20 hectares, e constitui uma Unidade de Conservação Brasileira, administrado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Foi declarado Patrimônio Natural da Humanidade, reconhecido pela Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) em 1986 por conter fenômenos naturais superlativos, excepcional beleza natural, as Cataratas do Iguaçu, e por também conter importantes habitats naturais para conservação *in situ* da diversidade biológica, integrando um dos mais importantes contínuos biológicos do Centro-Sul da América do Sul (UNESCO, 2016; IBAMA, 2018).

De acordo com o plano de manejo do ICMBio (IBAMA, 2018), as formações florestais que integram essencialmente o PNI são, Floresta Estacional Semidecidual (FES), do tipo Submontana na região Central e Sul e Montana ao Norte, reconhecida como o maior remanescente de floresta Atlântica (estacional semidecidual) da região sul do Brasil; e Floresta Ombrófila Mista (FOM). Possui elevada importância na FES, as espécies *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) e *Euterpe edulis* (palmito-juçara). Espécies características da FOM predominam em altitudes acima de 700 m, sendo *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e *Araucaria angustifolia* (araucária), umas das mais importantes. Ocorrem também Formações Pioneiras de Influência Fluvial de pequena extensão em áreas ocasionais, como sinuosidades abandonadas de rios e lagoas formadas por nascentes (IBAMA, 2018).

A região possui áreas integrantes de derrames vulcânicos (IBAMA, 2018), compostas por basaltos e por rochas efusivas ácidas, que estão diretamente relacionados aos solos dominantes, latossolos roxos e terra roxa, argilosos e ferralíticos com alto teor de ferro (IBAMA, 2000; Salamuni *et al.*, 2002).

A região é alvo de pesquisadores há muitos anos, cuja abordagem engloba apenas plantas e animais, não havendo até o momento estudos sobre a caracterização molecular da diversidade microbiana que integra a área. Diante disso, a diversidade de fungos e bactérias existentes no parque é praticamente desconhecida. Em um estudo realizado por Wright y Wright (2005) no Parque Nacional de Iguazú, homólogo argentino do PNI, foi encontrado em torno de 330 espécies de fungos. Recentemente, em 2016, foi realizado por Castaño um estudo sobre o efeito de borda em fungos do PNI, onde 366 morfotipos distintos foram identificados, e em um estudo qualitativo dos isolados, 69 mostraram ser potenciais produtores de enzimas ligninolíticas, evidenciando a grande biodiversidade microbiana e a importância da atividade fúngica na região, pois se sabe que os fungos desempenham um papel central no ciclo do carbono nas florestas (Crockatt, 2012).

Apesar das unidades de conservação (UCs) serem determinantes na preservação da fauna e da flora nativa, bem como na manutenção dos processos ecológicos e na conservação da biodiversidade local (BRASIL, 2011). O impacto ambiental de espécies invasoras biológicas ocorre constantemente (Sampaio&Schmidt, 2013). Uma espécie exótica é denominada invasora, devido aos danos que ocasiona ao ecossistema invadido, natural ou não, bem como aos eventuais prejuízos econômicos (Simberloff, 2005). Estas possuem crescimento rápido, maturação precoce e constante produção de sementes fazendo com que tenham maior eficiência para utilizar os recursos disponíveis. Devido a estas características, influenciam diretamente na estrutura das comunidades microbianas que podem ser alteradas permanentemente, impedindo o desenvolvimento de espécies nativas que acarreta à diminuição da riqueza e da diversidade microbiana, bem como à extinção de espécies, homogeneizando o ambiente invadido (Sakai *et al*, 2000; Váleriy *et al.*, 2008; Dogra *et al*, 2010).

Destaca-se que a Mata Atlântica é o bioma com maior número de UCs invadidas e registros de ocorrência (Sampaio & Schimdt, 2013), onde parte dessas ocorrências encontra-se em áreas de proteção integral, especialmente dentre as formações vegetais de Floresta Ombrófila e Estacional (Ziller & Dechoum, 2013). A herbácea *Tradescantia zebrina* Heynh. ex Bosse (Commelinaceae) já foi identificada como espécie invasora em diversas unidades de conservação (Carpanezi, 2007; Sampaio & Schmidt, 2013; IAP, 2015) e afeta a diversidade de espécies de fragmentos florestais, pois é uma potente competidora (Mantoani *et al.*, 2013). Esta se multiplica com facilidade em todos os períodos sazonais, gerando grande biomassa nas áreas invadidas sendo considerada uma “planta daninha” também na agricultura (Souza & Lorenzi, 2012). Apresenta alta capacidade de adaptação a diferentes biomas brasileiros, com registros de invasão no PNI (Rodolfo *et al.*, 2007; Zenni & Ziller, 2011; Castro *et al.* 2016; Chiba de Castro *et al.*, 2019).

1.2 Ciclagem de nutrientes nos solos naturais

O papel das florestas no ciclo global do carbono (C) terrestre está sendo crescentemente estudado, já que dois terços do carbono orgânico são armazenados nos solos de tais ecossistemas (Scharlemann *et al.*, 2014). O carbono fixado pelas árvores penetra no solo através do acúmulo de serapilheira, que compreende o material vegetal depositado ao solo pelas árvores, como: folhas, ramos, e miscelânea (que compreende as estruturas reprodutivas, como flores, sementes e frutos), raízes, exsudatos e transferências dos simbiontes fúngicos associados (Clemmensen *et al.*, 2013). A serapilheira é uma fonte primária de elementos nutricionais para as plantas e afeta a taxa de mineralização nativa do carbono orgânico do solo (SOC) nos ecossistemas florestais (Hristovski *et al.*, 2014), pois faz parte de uma etapa fundamental na circulação de carbono e nitrogênio nos ecossistemas do solo (Li *et al.*, 2015; Spohn e Chodak, 2015).

O ciclo do carbono terrestre abrange a troca de C entre a biosfera terrestre, a pedosfera, a geosfera e a atmosfera da Terra. As plantas absorvem C da atmosfera através da fotossíntese e armazenam o C na sua biomassa (folhas, galhos, troncos e raízes). A quantidade de C fixada pelos ecossistemas terrestres através da fotossíntese constitui o maior fluxo de C entre a biosfera terrestre e a atmosfera. A produção primária bruta é a base para a produção de alimentos, madeira e fibra e, portanto, tem implicações importantes para o bem-estar humano. Uma parte do C absorvido é retornada à atmosfera através da respiração da planta, isto é, respiração autotrófica (Xiao *et al.*, 2019). A serapilheira contribui para o acúmulo de SOC. A entrada de C através da absorção pelas plantas e a liberação de C através da decomposição (isto é, respiração heterotrófica) determinam o tamanho do *pool* de SOC (Liu *et al.*, 2011).

A decomposição da matéria orgânica formada é essencial para o retorno de nutrientes ao solo e de extrema importância para o crescimento e recuperação da vegetação (Berg & McLaugherty, 2003; Prescott, 2005). Logo, a quantidade de SOC em qualquer ecossistema depende da interação entre a produção de serapilheira e os processos de decomposição (Liao *et al.*, 2015). Diante disso, a produção de serapilheira e a rotação de nutrientes em ecossistemas florestais integram a via mais valiosa do ciclo biogeoquímico, ou seja, do fluxo de nutrientes no sistema solo-planta-solo (Schumacher *et al.*, 2004).

Além disso, a serapilheira, que contém uma grande quantidade de carbono e nitrogênio, também é considerada uma fonte de nutrientes na atividade microbiana (Wang *et al.*, 2014). E, de fato, os micro-organismos presentes neste ambiente são os principais propulsores do processo de decomposição e mineralização da serapilheira (Bardgett, 2005; de Graff *et al.*, 2010) permitindo o seu próprio fornecimento de nutrientes e o seu desenvolvimento (Schimel & Weintraub, 2003). Efeitos positivos foram definidos como um aumento nas mudanças da comunidade microbiana do solo

causadas pela adição de um substrato externo de carbono e nitrogênio no solo durante a decomposição da serapilheira (Fanin & Bertrand, 2016).

1.3 Atividade fúngica na decomposição do solo

Os fungos são micro-organismos eucarióticos que desempenham papéis ecológicos fundamentais como decompositores, mutualistas ou patógenos de plantas e animais. Os fungos do solo são uma parte importante das comunidades microbianas do solo e participam da liberação de nutrientes, decomposição orgânica do C e estabilização da fertilidade do solo (Zheng *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Estes desempenham um papel importante na decomposição da serapilheira, pois contribuem com até 90% da respiração total dos organismos do solo (Kjøller & Struwe 1982). Eles são os principais responsáveis pela ciclagem de carbono dos solos florestais, por mediar a nutrição mineral de plantas e auxiliar nas limitações de C de outros organismos presentes no solo (Tedersoo *et al.*, 2014).

Essa decomposição fúngica da serapilheira deve-se à produção de enzimas degradadoras de resíduos compostos por carbono e nitrogênio, como a lignina, um polímero polifenólico amorfo que foi identificado como o segundo biopolímero mais abundante da terra, de natureza recalcitrante e constituinte da parede vegetal de plantas superiores (Ghosh *et al.*, 2003). A lignina permanece intimamente intercalada com hemicelulose, formando uma matriz que envolve as fibras de celulose e confere maior resistência e sustentabilidade contra ataques microbiológicos e mecânicos à parede vegetal (Figura 1) (Kögel-Knabner, 2002; Kirk & Farrell, 1987).

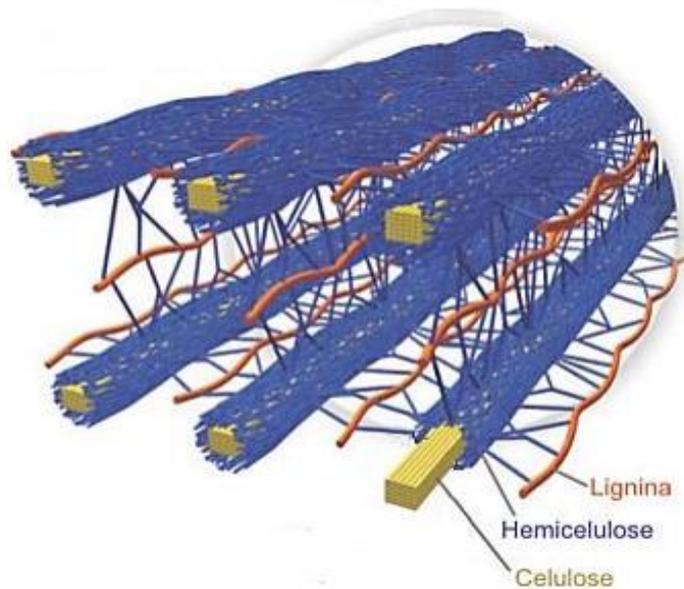


Figura 1. Associação entre os principais componentes da parede celular vegetal (Santos *et al.*, 2012).

A lignina forma um escudo resistente ao redor da celulose para formar lignocelulose nas paredes celulares das plantas. Isso torna a maior parte da celulose no material vegetal menos facilmente disponível para os fungos, porque a celulose lignificada deve ser deslignificada antes que a celulose possa ser consumida. A lignina é, portanto, considerada retardadora da decomposição fúngica da serapilheira (Berg & McClaugherty 2003). A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% do seu peso seco e está diretamente relacionado com a velocidade e a intensidade de sua degradação através da decomposição da serapilheira (Urbanová *et al.*, 2015).

Além disso, os biopolímeros de lignina e seus derivados possuem diversas propriedades, como ações antimicrobianas, propriedades antioxidantes e adesivas, alta estabilidade térmica, biodegradabilidade, dentre outras. Por isso, podem ser amplamente utilizados em várias áreas, como fabricação de plásticos e resinas, embalagens de borracha, revestimentos e tintas, produção de combustível, etc. Ademais, os derivados de lignina, como sulfonato, fenólico, organossol, Kraft e sulfonato de sódio, possuem boas propriedades mecânicas e físico-químicas (Naseem *et al.*, 2016).

Apesar da existência de atividade lignocelulolítica em comunidades bacterianas diversificadas nas serapilheiras e solos florestais, os representantes fúngicos são claramente mais abundantes (Urbanová *et al.*, 2015; Hesse *et al.*, 2015). Estes desempenham um papel crucial na degradação da lignina, onde múltiplos sistemas enzimáticos como: proteases, xilanases, celulasas e, especialmente enzimas ligninolíticas, degradam sinergicamente a matriz desses polímeros que constituem a parede celular das plantas (Sinsabaugh *et al.*, 2002). Esse complexo de enzimas é necessário devido à elevada recalcitrância da biomassa vegetal. Por isso, a decomposição da serapilheira só é possível através da síntese destas enzimas extracelulares, onde a demanda de células microbianas está ordenada com os nutrientes e fontes de energia disponíveis (Burns *et al.*, 2013).

As espécies arbóreas e, portanto, a qualidade da serapilheira que estas produzem, representam o fator primordial que influencia a composição da comunidade fúngica ali presente e controlam a taxa de decomposição da matéria orgânica (Snajdr *et al.*, 2013). Urbanová *et al.* (2015) demonstraram em seu estudo, que o efeito das espécies arbóreas na composição das comunidades fúngicas do solo e da serapilheira, era mais forte do que outras propriedades do solo, o que explica uma grande proporção de variação na composição da comunidade fúngica presente. Haja vista que, as comunidades microbianas são fortemente influenciadas pela qualidade e quantidade dos insumos disponíveis através da comunidade de plantas que compõem a serapilheira (Calderon *et al.*, 2001; Lalor *et al.*, 2007). Presume-se também, de que as mudanças na estrutura e na funcionalidade dos micro-organismos do solo possa influenciar o estado de saúde das árvores devido às alterações na riqueza e diversidade de organismos benéficos, como espécies micorrízicas, ou patógenos fúngicos de plantas como *Fusarium* spp. ou *Alternaria* spp. Logo, torna-se evidente a necessidade do

ecossistema como um todo se manter em constante equilíbrio para o seu pleno desenvolvimento (Gomez *et al.*, 2019).

Diante disso, deve-se levar em conta que as florestas tropicais sofreram uma série de distúrbios naturais e antropogênicos ao longo do tempo, levando à fragmentação e uma perda anual estimada em área de cerca de 1 milhão de km² globalmente (Herold *et al.*, 2011). Esses distúrbios criam lacunas ou espaços abertos que as espécies invasoras usam para entrar, ocupar e colonizar as florestas (Joshi *et al.*, 2015), pois são capazes de sobreviver, se reproduzir e se espalhar em altas taxas e sem contribuição (van Wilgen *et al.*, 2000; Kawawa *et al.*, 2016). Distúrbios são processos críticos do ecossistema que influenciam a dinâmica do ciclo do C. Em geral, os distúrbios florestais reduzem a quantidade de SOC (Liao *et al.*, 2015).

Em contrapartida, foram documentadas incidências em que plantas invasoras são mais produtivas do que espécies nativas ocorrentes e influenciam na fixação de SOC através da serapilheira e da sua decomposição, além do carbono armazenado em sua biomassa (Blumenthal *et al.*, 2009; Peltzer *et al.*, 2010). Isso ocorre devido a maior disponibilidade de massa degradada promovida pelas invasoras, o que ocasiona um aumento na atividade metabólica de determinados micro-organismos do solo e, conseqüentemente, o fluxo de carbono do solo para a atmosfera (Herrera *et al.*, 2011).

Além do impacto florestal das invasoras, o efeito de borda também deve ser considerado, pois resulta em mudanças estruturais nas populações e comunidades fúngicas que ocorrem neste entorno (Levin *et al.*, 2009). Devido à sua fisionomia, a deposição de materiais é maior nos microhabitats das bordas das florestas, o que resulta em muitas fronteiras florestais excedendo as cargas de nitrogênio e deposição acidificante, um perfil que não é propício à muitas enzimas, mas agrada a lacase (Schrijver *et al.*, 2007). Além disso, o aumento das flutuações microclimáticas

nestes ambientes também pode significar que a fronteira é mais adequada para espécies que se adaptam rapidamente aos ambientes em mudança (Landesman & Dighton, 2011).

Diante do exposto, verifica-se a importância do microbioma da serapilheira para o ecossistema florestal, o que torna imprescindível conhecer o perfil da lacase, nas regiões de micro-habitat, serapilheira nativa e serapilheira da invasora, como a diversidade fúngica produtora e não produtora da enzima no PNI, pois ainda é um fato não elucidado. Além do mais, embora existam estudos de outros locais, como citados, baseados em levantamentos fúngicos através de isolados ou de sequenciamento de DNA, que tenham mostrado a influência de espécies de árvores na estrutura e diversidade taxonômica de comunidades fúngicas, eles não englobam informações sobre microhabitats e o impacto das espécies invasoras na comunidade produtora de lacase, bem como na diversidade de grupos funcionais.

1.4 Fungos ligninolíticos

Os fungos ligninolíticos são capazes de decompor completamente a lignina em CO₂ através da secreção deste grupo de enzimas eficientes, as quais lignina peroxidase, manganês peroxidase e a lacase são as mais relevantes (Kögel-Knabner, 2002). Dentre as classes de fungos que degradam a lignina, se destacam os Basidiomicetos, conhecidos como fungos de podridão branca (*White-rot*), os quais utilizam os componentes da madeira para o seu crescimento (Baldrian, 2006). Representantes típicos dos principais gêneros incluem *Clitocybe*, *Collybia*, *Marasmius* e *Mycena*, que são estudados com maior frequência por sua atividade na natureza, produção de enzimas, capacidade de decompor lignina nas folhas e mineralização de lignina e compostos relacionados em laboratório (Osono, 2007).

Os fungos da podridão branca investem parte de sua energia metabólica na produção de várias enzimas ligninolíticas extracelulares, especialmente a lacase, para

degradar a lignina, plantas mortas e também, para decompor os componentes das plantas (Rescigno *et al.*, 2007). Tais enzimas extracelulares criam restos de madeira celulósica e hemicelulósica branca após a degradação da lignina (Arora & Sharma, 2010). A remoção da lignina pode causar a permeabilidade da parede celular da madeira, o que permite a difusão da enzima nas células da madeira e, por conseguinte a utilização de seus componentes pelos fungos (Machuca & Ferraz, 2001).

Osono (2007) demonstrou em seu trabalho que os basidiomicetos decompõem a lignina e outros componentes, como a hemicelulose, em várias proporções; por exemplo, alguns *Clitocybe* e *Collybia spp.* decompõem preferencialmente a lignina, enquanto *Mycena spp.* muitas vezes causam a decomposição simultânea de lignina e outros componentes. Incluiu também, que os fungos ascomicetos, por outro lado, geralmente decompõem a celulose seletivamente sobre a lignina, enquanto *Coccomyces spp.* são capazes de decompor a lignina seletivamente. Ou seja, os fungos que delignificam seletivamente a lignina são capazes de decompô-la de forma mais eficiente do que aqueles que removem a lignina e a hemicelulose na mesma proporção e os que decompõem a hemicelulose em preferência à lignina.

Os fungos da classe dos Ascomicetos degradam principalmente a biomassa não lenhosa (superfícies da madeira, constituída principalmente de celulose e hemicelulose) e são conhecidos por uma capacidade geral de degradar a lignina. Eles participam da deterioração da madeira através de um estilo de vida chamado de deterioração por podridão suave que não é tão bem entendida como podridão branca e podridão marrom (Blanchett *et al.*, 2002). Ascomicetes xilariáceos e seus anamórficos, como *Xylaria* e *Geniculosporium*, são comumente considerados como decompositores de lignina (Whalley, 1996).

Ademais, novos estudos estão surgindo para um maior conhecimento e entendimento do papel dos Ascomicetos na degradação da lignina, como foi relatado

recentemente por Osono (2019) que membros do gênero *Coccomyces* da família *Rhytismataceae* possuem habilidades ligninolíticas vigorosas. No entanto, valores máximos de perda de massa (serapilheira e lignina) atingiram 37,4% no filo Ascomycota e 74,3% no filo Basidiomycota, o que confirma o fato de que os Basidiomicetos possuem cepas de fungos com maior capacidade de causar perda de massa que os Ascomicetos, como pode ser visualizado na figura 2.

| Fungos | Métodos |
|--------------------------------|----------------|
| Basidiomycetes | |
| <i>Agaricus</i> | E |
| <i>Agrocybe</i> | E, M |
| <i>Clavaria</i> | B, L |
| <i>Clitocybe</i> | B, E, L |
| <i>Collybia</i> | B, E, L |
| <i>Coprinus</i> | E |
| <i>Cortinellus</i> | L |
| <i>Cudonia</i> | B |
| <i>Cystoderma</i> | B |
| <i>Galerina</i> | E |
| <i>Hypholoma</i> | E |
| <i>Lepiota</i> | B, E, L |
| <i>Lepista</i> | E |
| <i>Lyophyllum</i> | E |
| <i>Macrolepiota</i> | E |
| <i>Marasmius</i> | B, E, L |
| <i>Micromphale</i> | L |
| <i>Mycena</i> | B, E, L |
| <i>Phaeolepiota</i> | E |
| <i>Psalliota</i> | B |
| <i>Rhodocybe</i> | B |
| <i>Spathularia</i> | B |
| <i>Stropharia</i> | E, M |
| Ascomycetes^c | |
| <i>Alternaria</i> | E |
| <i>Aspergillus</i> | E, M |
| <i>Coccomyces</i> | B, L |
| <i>Fusarium</i> | E, M |
| <i>Geniculosporium</i> | B, L |
| <i>Penicillium</i> | E, L, M |
| <i>Pestalotiopsis</i> | E, M |
| <i>Xylaria</i> | B, L |

Figura 2. Adaptado de Osono (2007). Gêneros de fungos associados à decomposição da lignina em serapilheira e materiais do solo de floresta. B, atividade de branqueamento na natureza; E, produção de enzimas (manganês peroxidases e lacase) em laboratório; L, perda de lignina nas folhas em laboratório; M, mineralização de lignina e compostos relacionados em laboratório.

O recente trabalho de Kameshwar & Qin (2019) permitiu uma compreensão maior do complexo ligninolítico na diversidade fúngica. O estudo analisou o genoma de 56 fungos publicados pertencentes aos filos Glomeromycota, Mucoromycota, Zoopagomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia e Cryptomycota. Os resultados obtidos mostram que os fungos pertencentes a Microsporidia e Cryptomycota sofreram sérias perdas de vários genes codificadores de enzimas degradadoras de componentes da parede celular da planta. Em contraste, os fungos analisados pertencentes a Neocallimastigomycota exibiram extraordinários potenciais genômicos para degradar os carboidratos da parede celular das plantas.

1.5 Lacase

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem a um grupo de enzimas conhecidas como multicobre oxidases, pois possuem quatro átomos de cobre distribuídos entre três sítios de ligações (Figura 2). São produzidas na natureza por plantas superiores, alguns insetos, algumas bactérias e, em maior quantidade por fungos, especialmente pelos basidiomicetos, também chamados de fungos da podridão branca, que também são os mais bem explorados (Mishra *et al.*, 2010). Diante disso, a maioria das lacases descritas na literatura foi isolada de fungos, principalmente dos filos Ascomycota e Basidiomycota (Baldrian, 2006). Entretanto, predomina neste último grupo, em abundância, onde vários genes envolvidos com a atividade enzimática já foram descritos (Mikolasch & Schauer, 2009; Brijwani *et al.*, 2010).

O potencial redox dos três sítios de cobre das lacases (T1, T2 e T3), são uma das principais características das cobre-oxidases. O sítio T1 de cobre é oceptor primário dos elétrons do substrato e também é o responsável pela coloração azul da enzima associada a uma grande faixa de absorção em torno de 600 nm; o sítio T2 de

cobre atua no local de atividade catalítica e redox coordenado por três histidinas; e os dois sítios T3 de cobre são responsáveis pela ativação e transporte de O₂ e oxigenação do substrato, apresentando discreta banda de absorção, próxima a 330 nm, também coordenada por três histidinas. Os substratos são oxidados por cobre T1, que atua transferindo elétrons para os sítios T2 e T3 (receptores de elétrons), onde o oxigênio molecular é reduzido à água. O alto potencial do cobre localizado no sítio T1 é de grande interesse para os biotecnólogos devido à sua geometria (Gil *et al.*, 2009; Rodgers *et al.*, 2010; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

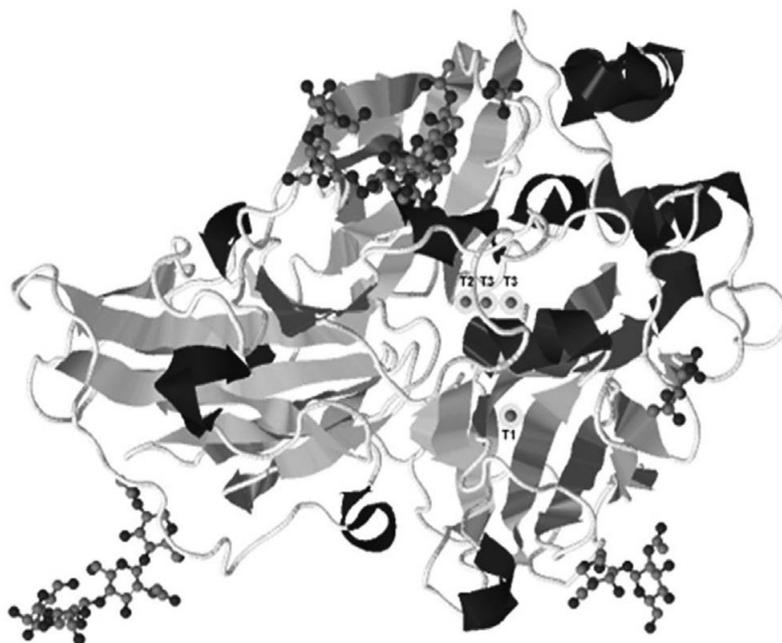


Figura 3. Estrutura da lacase com a identificação dos três domínios: T1, T2 e T3 (Guimarães *et al.*, 2017).

Devido à estrutura compacta da parede celular vegetal e a necessidade de contato direto entre as enzimas ligninolíticas e seus substratos, a existência de mediadores redox é essencial no processo de degradação para que a atividade oxidativa da enzima seja expandida (Baldrian, 2006). Em consequência do baixo potencial redox das lacases (0,5-0,8 V), a lacase, sozinha, é capaz de oxidar apenas estruturas fenólicas da lignina, excluindo as estruturas aromáticas não-fenólicas, que compreendem mais de 80% da composição da lignina (Wong, 2009). Somente algumas

enzimas ligninolíticas secretadas por fungos, como a lignina peroxidase, com potencial redox de 1,15 a 1,25 V podem oxidar diretamente os grupos não-fenólicos da lignina (Ward *et al.*, 2003). No entanto, com a presença de mediadores, que normalmente têm um potencial redox superior a 0,9 V, a gama de substrato de lacase é expandida possibilitando a oxidação de estruturas não-fenólicas da lignina. Portanto, o sistema de mediadores de lacase (SML) desempenha um papel fundamental na despolimerização da lignina como um todo (Schmidt, 2007).

Compostos sintéticos têm sido descritos como mediadores eficientes de lacase, assim como compostos de origem natural, que já estão presentes na biomassa, como por exemplo, o ácido-3-hidroxi-antranílico – um metabólito produzido pelo fungo da podridão branca, *Pycnoporus cinnabarinus*, do filo Basidiomycota (Li *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstraram o envolvimento dos produtos de degradação da lignina como mediadores naturais de lacase durante a biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca, principalmente nos estágios iniciais de biodegradação (Camarero *et al.*, 2007).

Em contrapartida, recentemente, Munk e colaboradores (2018) realizaram um estudo que envolveu o tratamentos de três diferentes ligninas com sistemas mediadores de lacase (LMS), com quatro mediadores químicos individuais, 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxiftalimida (HPI), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO) e 2,2'-azino-bis(3-ácido-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS). Sugerem, assim, que os tratamentos SML com doses mediais executáveis dos mediadores químicos testados não aumentam a ativação catalisada pela lacase. E, além do mais, destacam que os dados obtidos com sistemas mediadores de lacase em substratos fenólicos simples nem sempre são modelos válidos para a catálise de lacases em fluxos de processamento de lignina genuína. Diante disso, muito ainda se espera na descoberta do

verdadeiro papel da atividade da lacase na degradação da lignina e no detalhamento desse processo.

As lacases possuem como característica a baixa especificidade aos seus substratos redutores, ou seja, podem apresentar atividade em diferentes substratos (Baldrian, 2006; Majeau *et al.*, 2010). Estas enzimas catalisam a oxidação de uma variedade de compostos fenólicos e aromáticos, como a lignina, aminas, ésteres, éteres e alguns íons inorgânicos com a concomitante redução do oxigênio à água. Além disso, as lacases são predominantemente enzimas extracelulares, o que facilita a sua ação e atividade (Shleev *et al.*, 2006).

In vitro, a produção e atividade da lacase são influenciadas diretamente por alguns parâmetros, como o substrato a ser utilizado, a agitação, a temperatura e o tempo de cultivo, entre outros. A produção de lacase está ligada diretamente a uma regulação complexa de nutrientes que afeta diretamente a expressão de lacases, compreendendo as fontes de carbono e nitrogênio, sua respectiva concentração e a relação entre elas (relação C/N), e também as concentrações e tipo de indutores utilizados (Valle, 2012).

As lacases fúngicas, geralmente, têm um pH ótimo na faixa ácida, e os perfis de temperatura para a atividade dessas enzimas normalmente não diferem daqueles de outras enzimas ligninolíticas extracelulares, a maioria com temperaturas ótimas variando de 50 a 70 °C. No entanto, cada espécie de micro-organismo possui suas condições fisiológicas ótimas para o crescimento e produção dessa enzima (Baldrian, 2006), como mostra a Tabela 1.

| Características da Produção de Lacase Purificada por Fungos | | | | | |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Espécie | pH ótimo | | Temperatura ótima (°C) | Atividade Enzimática | Referência |
| | ABTS ¹ | GUA ² | | | |
| <i>Coriopsis gallica</i> | 3 | – | 70 | 32 U/L | <i>Calvo et al., 1998</i> |
| <i>Daedalia quercina</i> | 2 | 4.5 | 70.5 | 120 U/L | <i>Baldrian, 2004</i> |
| <i>Lentinula edodes</i> | 4 | 4 | 40 | 1.4 U/mL | <i>Nagai et al., 2002</i> |
| <i>Melanocarpus albomyces</i> | 3.5 | 5 | 65 | 50 U/L | <i>Kiiskinen et al., 2002</i> |
| <i>Pleurotus eryngii</i> | 5.5 | – | 25 | 206 U/L | <i>Yildirim et al., 2015</i> |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | 3-3.5 | 5.5-6 | 50 | 1320 U/L | <i>Patel et al., 2013</i> |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 4 | 6 | 50 | 87 U/mL | <i>Souza et al., 2003</i> |
| <i>Trametes sp.</i> | – | 4.5 | 50 | 9 U/mL | <i>Xiao et al., 2003</i> |

¹ABTS: 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).
²GUA: 2-methoxyphenol (guaiacol).

Tabela 1. Características da produção de lacase purificada em diferentes temperaturas, com a utilização dos substratos guaiacol e ABTS, de diferentes espécies fúngicas.

Lacases fúngicas atraem a atenção dos ecologistas que estudam o ciclo do carbono, especialmente a degradação dos compostos de plantas recalcitrantes (Baldrian, 2006). Um estudo ecológico e molecular realizado por Luis *et al.* (2004) em um solo de floresta demonstrou que a abundância e a distribuição de basidiomicetos contendo genes de lacase é refletida pela estratificação vertical de acordo com o perfil do solo que resulta em um declínio nas fontes orgânicas de energia disponíveis. Logo, foi verificada maior abundância destes genes na primeira camada do solo, pois possui maior rotatividade de matéria orgânica, ou seja, maiores níveis energéticos disponíveis, indicando possivelmente o envolvimento da enzima no processo inicial de degradação da lignina, importante para a reserva (acúmulo) de carbono no solo e formação de húmus.

Ecologicamente é importante destacar que recentemente Chen e colaboradores (2018) mostraram que a estabilidade e a baixa degradabilidade da lignina nos solos podem ter sido superestimadas. As evidências, no entanto, limitam-se a mostrar que os resultados inconsistentes da estabilidade da lignina entre os vários ecossistemas estão relacionados às propriedades do solo, especialmente ao nível do solo e à biomassa microbiana que o compõe. Os solos que continham maior concentração de carbono

orgânico e aumentaram a assimilação microbiana de carbono derivado de lignina foram mais benéficos para o acúmulo de derivados de lignina.

1.6 Estratégias para o estudo da lacase na pesquisa ecológica e na biotecnologia ambiental

Estudos que procuram entender o papel das lacases fúngicas são raros, contudo, necessários especialmente visando entender a dinâmica do ambiente para biorremediação, preservação ou restauração de florestas nativas de regiões agrícolas e ou com impacto antropogênico (Osono *et al.* 2017; 2019).

As metodologias geralmente utilizadas na análise da atividade da lacase englobam testes com isolados fúngicos em laboratório, como produção da enzima, perda de lignina na biomassa, mineralização de lignina e compostos relacionados, como também a atividade de branqueamento na natureza (Osono 2019; Munk *et al.*, 2018; Osono 2007; Baldrian *et al.*, 2006).

Ao nível molecular e metabólico algumas metodologias utilizadas são: transcriptoma (conjunto completo de transcritos, RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular); metatranscriptoma (expressão gênica diretamente de ambientes naturais); e metabolômica (identificação e quantificação de um conjunto de metabólitos – o metaboloma; produzidos e/ou modificados por um organismo). Apesar de altamente informativos e importantes essas técnicas apresentam diversas dificuldades operacionais geralmente por envolver a molécula de RNA ou pela necessidade de equipamentos específicos, como no caso da metabolômica (Alessi *et al.*, 2017; Cocolin *et al.*, 2018).

Uma estratégia pouco utilizada pode ser relacionar a diversidade genética de uma amostra com a atividade da lacase relatada na literatura pelos organismos encontrados na amostra, obtendo assim um perfil enzimático que pode delinear as

técnicas de biotecnologia ambiental da amostra e ou o isolamento futuro dos fungos potenciais produtores da enzima de interesse.

Os avanços em biologia molecular tornaram possível a utilização do DNA *barcode* na taxonômica, sendo a região “ITS” oficialmente designada como o *barcode* universal na identificação de espécies de fungos pois permite uma precisa discriminação taxonômica, devido ao uso de pequenos segmentos de DNA suficientemente variáveis a nível interespecífico e pouco variáveis (conservados evolutivamente) a nível intraespecífico (Schoch *et al*, 2012; Casiraghi *et al.*, 2010). Esta técnica também dispõe de facilidade de amplificação, uso muito difundido, e identificações em nível de espécie (Ahmed, 2016; Schoch *et al*, 2012). O *metabarcoding* é uma evolução da técnica de *barcode* para amostras ambientais. A capacidade das técnicas de *metabarcoding*, para caracterizar solos complexos e sistemas de microbiomas, representa uma melhoria extraordinária no estudo das plantas e da sua influência na microbiota. Essas técnicas também oferecem novas oportunidades para a avaliação profunda da ecologia do microbioma, pois permitem identificar múltiplas espécies usando o DNA total extraído de uma dada amostra ambiental (Gómez *et al.*, 2019; BIK *et al.*, 2012).

1.7 Justificativa

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é considerado a maior unidade de conservação no domínio da Mata Atlântica do país, integrando o mais importante contínuo biológico do Centro-Sul da América do Sul (IBAMA, 2018). Como uma unidade de conservação o parque tem como princípio a presença de áreas naturais passíveis de proteção por suas características especiais, porém a unidade não está isenta dos impactos naturais e antropogênicos.

O PNI apresenta diversas regiões invadidas por espécies vegetais exóticas, como *Tradescantia zebrina*. Estas espécies exóticas ocasionam danos ao

ecossistema a que foram inseridas, assim como eventuais prejuízos econômicos, sendo denominadas invasoras e representam uma das maiores ameaças à biodiversidade e ao fornecimento de serviços ecossistêmicos (Burgiel & Muir, 2010; Simberloff, 2005). Nos ecossistemas naturais, os impactos das invasões biológicas são complexos e mostraram, até o momento, potencial de alterar permanentemente a diversidade e estrutura das comunidades microbianas além de causar extinções de espécies (Sakai *et al.*, 2000; Dogra *et al.*, 2010). Uma vez que a matéria orgânica vegetal influencia tanto a atividade quanto a biomassa microbiana do solo, detritos de espécies invasoras vegetais são capazes de alterar significativamente as comunidades microbianas do solo e conseqüentemente o ecossistema como um todo (Herrera, 2011; Kourtev *et al.*, 2002).

Considerando que as lacases são produzidas na natureza em maior quantidade por fungos, especialmente dos filos Ascomycota e Basidiomycota e que as lacases fúngicas possuem grande importância ambiental por participarem do ciclo do carbono através da degradação de compostos de plantas recalcitrantes, a análise da lacase de fungos do Parque Nacional do Iguaçu é imprescindível, especialmente considerando microhabitats e alterações da flora nativa encontradas no parque.

Ainda, além da importância ecológica devido estes fungos serem os principais propulsores do processo de decomposição e mineralização da serapilheira florestal (Bardgett, 2005; de Graff *et al.*, 2010), as lacases possuem amplo campo de aplicação biotecnológica como a eficiente degradação de fármacos (Touahar *et al.*, 2014; Lloret *et al.*, 2012), e uma ampla gama de atividades industriais, como a detoxificação de efluentes, remoção de fenóis de alimentos e bebidas, degradação de corantes, biodegradação de componentes xenobióticos, biosensores, dentre outras atividades (Arora & Sharma, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliação genética e funcional da enzima lacase de fungos do Parque Nacional do Iguaçu.

2.2 Específicos

1. Avaliar a atividade quantitativa da lacase em fungos que foram isolados de um microhabitat de uma região de fronteira agrícola do Parque Nacional do Iguaçu e preservados na Coleção de Cultura de Micro-organismos de Interesse Biotecnológico e Ambiental (CCMIBA) da UNILA;
2. Avaliar a diversidade genética e funcional da serapilheira da espécie vegetal invasora *Tradescantia zebrina* comparada à serapilheira nativa do Parque Nacional do Iguaçu;
3. Avaliar o impacto da invasão por *Tradescantia zebrina* na diversidade fúngica produtora de lacase do PNI;
4. Identificar o potencial da lacase de fungos do PNI em condições decorrentes de ações antropogênicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas e materiais de estudo

3.1.1 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu

Os fungos avaliados foram isolados, em um estudo realizado por Castaño (2016), do microhabitat de uma região agrícola fronteira com o PNI. Esses fungos foram isolados de serapilheiras coletadas de três trilhas de 200 metros, também separadas por 200 metros. Estas, estão localizadas perpendicularmente na borda oeste do Parque Nacional do Iguaçu, ao longo da antiga estrada para Guarapuava (Figura 4) (trilha 1 de $25^{\circ} 32'42,5'' S$ e $54^{\circ} 24'58,1'' W$ a $25^{\circ} 32'49,5'' S$ e $54^{\circ} 24'56,1'' W$; trilha 2 de $25^{\circ} 32'41,5'' S$ e $54^{\circ} 24'50,6'' W$ a $25^{\circ} 32'47,9'' S$ e $54^{\circ} 24'49,2'' W$; trilha 3 de $25^{\circ} 32'40,6'' S$ e $54^{\circ} 24'43,3'' W$ a $25^{\circ} 32'47,0'' S$ e $54^{\circ} 24'41,9'' W$), em região com floresta estacional semidecídua, formação submontana (altitude entre 251 m e 284 m) e solo do tipo latossolo vermelho (IBAMA, 2000). O local, uma fronteira artificial, é separado da matriz agrícola por uma estrada entre 6 e 7 m de largura.

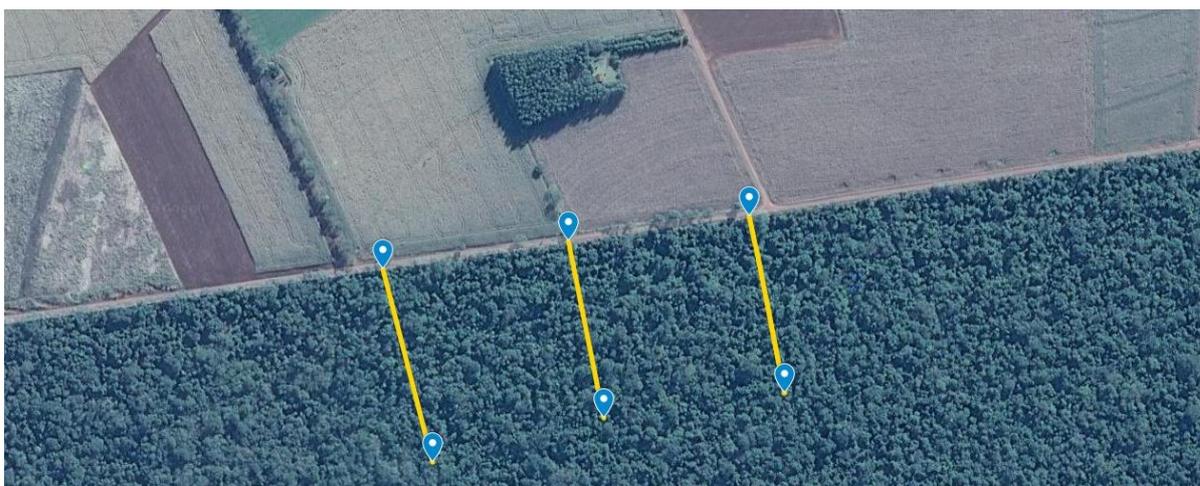


Figura 4: Localização das trilhas (1, 2 e 3), no Parque Nacional do Iguaçu (PNI), com borda de mata artificial (Castaño, 2016).

3.1.2 *Metabarcoding* de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por *Tradescantia zebrina*

Para a análise de *metabarcoding*, foi utilizado o material preservado em -80 °C resultante do trabalho intitulado “A invasora *Tradescantia zebrina* altera a decomposição vegetal em mata atlântica?”, em desenvolvimento pela mestrandia do programa de Biodiversidade Neotropical da Unila, Giselle Cristina de Oliveira Vaz (em fase de conclusão). Este estudo selecionou dez áreas do PNI (25°05' e 25°41'S; 53°40' e 54°38' W), sendo cinco invadidas por *T. zebrina* e cinco não invadidas. Atualmente, as áreas são altamente invadidas por *T. zebrina* (mais de 80% de dominância) e pertencem a invasões distintas (ou seja, locais invadidos descontínuos que representam diferentes populações). Todas as áreas estavam a 500 m de distância uma da outra. Entre 2018 e 2019, foram coletados fragmentos vivos de (1) *T. zebrina* nas cinco áreas invadidas e (2) árvores/arbustos herbáceos e nativos nas cinco áreas não invadidas. Os nativos foram coletados no devido tempo, com remoção manual de fragmentos de ervas e folhas de árvores e arbustos, além de alguns galhos senescentes secos com sinais claros de abscisão. Os fragmentos invasivos e nativos foram secos separadamente em estufa a 55 ± 5 °C até peso constante. Em cada uma das 10 áreas, foram deslocados seis *litter bag* (225 cm² e 5 g de serapilheira), sendo três fragmentos secos do *T. zebrina* (serapilheira invasora) e três fragmentos secos da nativa (serapilheira nativa). Os *litter bag* foram colocados a 30 m em direção ao interior da floresta e monitorados por quatro meses. No 100º dia de acompanhamento, as sacolas foram coletadas e levadas ao laboratório. O material foi organizado em duas amostras compostas: 1) fragmentos da serapilheira da invasora *T. zebrina* (onde os *litterbags* com os fragmentos da invasora foram misturados para obter a amostra composta); e 2) fragmentos da serapilheira nativa (onde os *litterbags* com os fragmentos da serapilheira nativa foram misturados para obter a amostra

composta). Estas duas amostras compostas foram, no presente projeto, avaliadas na metodologia de *metabarcoding*.

3.2 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu

3.2.1 Avaliação da atividade da lacase em meio de cultivo líquido

Para a avaliação quantitativa da lacase foram selecionados 60 fungos que obtiveram resultados positivos para a produção de enzimas ligninolíticas (substrato guaiacol) em ensaio qualitativo realizado por Castaño (2016).

Estes fungos preservados foram reativados em meio de cultura a base de extrato de malte 2% suplementado com guaiacol 1 mM e incubados em estufa a 28 °C de 7 à 10 dias para o seu devido crescimento. Em seguida, foram submetidos ao crescimento em meio líquido (25 mL) composto por extrato de malte 2%, onde um fragmento de 0,5 cm da borda do micélio em meio sólido de cada cultura ativa foi embebido no meio líquido e incubado com agitação de 150 rpm e temperatura de 28 °C por 7 dias.

Para a avaliação da atividade enzimática, após 7 dias o cultivo foi filtrado e transportado, em temperatura de 4 °C, devido à sensibilidade da enzima, até o Laboratório Enedina Alves Maques, localizado na Fundação do Parque Tecnológico de Itaipu (PTI) onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro usando ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] como substrato e leitura a 420 nm de absorbância.

Para a realização da leitura foi utilizado 600 µl de tampão acetato de sódio 0,1 M, 1200 µl da solução enzimática filtrada de cada isolado e 200 µl de ABTS, conforme Buswell *et al.* (1995).

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e como controle negativo da reação foi utilizado o meio de cultivo sem crescimento fúngico. Após leitura no

espectrofotômetro a atividade enzimática da lacase foi determinada através da equação abaixo, conforme Baltierra-Trejo *et al.* (2015).

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)(10^6)}{(t)(\epsilon)(d)(V_s)}$$

Onde:

U Atividade enzimática

ΔA Absorbância final - absorbância inicial.

V_t Volume total da reação (mL).

t Tempo de reação (min).

ϵ Coeficiente de extinção molar (M – 1 cm – 1 ou L mol – 1 cm – 1).

d Percurso óptico (1 cm).

V_s Volume de amostra (mL).

D_f Fator de diluição.

10^6 Fator de correção ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em $U L^{-1}$ do caldo enzimático.

3.3 *Metabarcoding* de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por *Tradescantia zebrina*

3.3.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado 2 g de cada amostra composta (serapilheira nativa e serapilheira da invasora), as quais foram maceradas em Nitrogênio líquido para posterior extração. Estas alíquotas foram submetidas ao protocolo de extração de DNA do kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen. Inc., Valencia, CA, USA) seguindo as seguintes instruções do fabricante. As amostras foram primeiramente maceradas e

Logo após foram adicionados 400 µl de tampão AP1 e 4 µl de RNase A. Misturadas ao vortex e incubadas por 10 min a 65 ° C. Os tubos foram invertidos 2 a 3 vezes durante a incubação. Logo após, foram adicionados 130 µl de tampão P3. Misturados e incubados por 5 min em gelo. O lisado foi centrifugado por 5 minutos a 20.000 x g (14.000 rpm). Por conseguinte, o lisado foi pipetado para uma coluna de rotação QIAshredder colocada em um tubo de coleta de 2 ml e centrifugado por 2 minutos a 20.000 x g. O fluxo foi transferido para um novo tubo sem perturbar o sedimento onde foi adicionado 1,5 volumes de tampão AW1 e misturado com pipeta. Após foi transferido 650 µl da mistura para uma coluna de centrifugação DNeasy Mini colocada em um tubo de coleta de 2 ml, a qual foi centrifugada por 1 min a ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). O fluxo foi descartado e esta etapa foi repetida com a amostra restante. A coluna de centrifugação foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 ml onde foi adicionado 500 µl de tampão AW2 e centrifugado por 1 min a ≥ 6000 x g. O fluxo foi descartado e foi adicionado mais 500 µl de tampão AW2 e centrifugado por 2 minutos a 20.000 x g. A coluna de rotação foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml ou 2 ml onde foram adicionados 100 µl de tampão AE para eluição e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente (15–25 ° C). Logo, foi centrifugado por 1 min a ≥ 6000 x g. Foram adicionados, novamente, 100 µl de tampão AE para eluição e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente (15–25 ° C) e após foi centrifugado por 1 min a ≥ 6000 x g.

Com a intenção de eliminar possíveis contaminações de RNA, as amostras foram tratadas com 2 µg de RNase (PureLink™) por µL de amostra de DNA. As preparações de DNA foram avaliadas e quantificadas pela medida das absorvâncias a 260nm, 280nm, 320nm e 230nm no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Em seguida, o DNA extraído e purificado foi aliquoteado e armazenado a -80°C.

3.3.4 Sequenciamento das amostras

Foram enviadas as duas amostras compostas (serapilheira nativa e serapilheira da invasora) para a realização do sequenciamento do DNA total. O qual foi realizado por terceirização de serviço seguindo as especificações abaixo na empresa BPI Biotecnologia. O DNA passou por análise de qualidade através da quantificação por fluorescência utilizando o equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer e kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific)

3.3.4.1 Amplificação região ITS

As reações de PCR foram feitas tendo como volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3 µM de oligonucleotideo forward e 0,3 µM de oligonucleotideo reverse, 1 uL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20 uL. Para a amplificação foram utilizados os primers descritos na tabela 2.

| Iniciador | Sequencia |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| ITS_86-F | 5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGAATCATCGAATCTTTGAA -3' |
| ITS_4R | 5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC -3' |

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA.

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg., anelamento a 56 °C por 40 seg., extensão a 72 °C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 5 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de amplificação de cada amostra, esta foi comprovada através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v), 400bp

(tamanho do amplicon). Os amplicons foram purificados utilizando bead magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.3.4.2 Reação de Indexação

Nesta etapa foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do *kit Nextera XT Index* (Illumina). O programa de amplificação consiste de: incubação a 72°C por 3 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). A relação de index utilizados encontra-se descrita na Tabela 4.

| Nome da Amostra | Nº Interno /2019 | Amplicon | Primers INDEX | |
|-----------------|------------------|----------|-----------------|-----------------|
| | | | N7 | S5 |
| 1-DNA-PAR1 | PQ_1001 | ITS | N711 (AAGAGGCA) | S501 (GCGATCTA) |
| 1-DNA-PAR2 | PQ_1002 | ITS | N712 (GTAGAGGA) | S501 (GCGATCTA) |

Tabela 4. Descrição dos primers index utilizados da reação de indexação.

3.3.4.3 Purificação e Quantificação da Biblioteca

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando bead magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), para remoção fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers. Após realizou a quantificação pela metodologia de PCR em Tempo Real utilizando Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), de acordo com o protocolo do fabricante.

Gerou-se um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras a 3 nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent Kit V2 Nano 500 ciclos – leitura de 2 x 250 pb.

3.3.5 Bioinformática

Todo o processamento das amostras na etapa de bioinformática foi realizado no desenvolvimento do mestrado no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Unila. A inspeção de qualidade e processamento das sequencias foi feita pelo *pipeline* DADA2 - *Divisive Amplicon Denoising Algorithm* versão 1.8, que é um método baseado em *machine learning* que constrói e treina um modelo de erro paramétrico com base nos próprios dados, para depois corrigir erros introduzidos nas leituras durante o sequenciamento e obter informações biológicas mais acuradas (Callahan et al., 2016). Programamos este *pipeline* no software estatístico R (R CORE TEAM, 2010), específico para leituras do amplicon ITS, seguindo as recomendações e parâmetros sugeridos por Pauvert et al., 2019, para a correção de erros, obtenção da tabela de frequencias AVS e sequencias processadas, estagio 5-6 no workflow (Figura 5).

| | Entrada | Filtradas | Processadas | Quimeras |
|---------------------------------------------------|----------------|------------------|--------------------|-----------------|
| Serapilheira Nativa | 48430 | 30749 | 30099 | 40 |
| Serapilheira da Invasora <i>T. zebrina</i> | 64960 | 37757 | 37004 | 766 |

Tabela 5. Dados das sequencias de entrada, depois de filtradas, processadas e quimeras.

Após a obtenção da tabela de frequência das variantes de sequência única (AVSs) e as sequencias processadas, estas foram classificadas e anotadas em base a referência taxonômica UNITE, a qual é exclusiva para fungos (Nilsson et al.,

2019). A anotação e classificação taxonômica das sequências processadas foi feita unicamente com a fita Forward, dado que foi a fita com maior resolução taxonômica e de abundância, quando comparada à fita Forward e Reverse, estágios 7-9 do Workflow (Figura 5). A atual versão da base de dados UNITE inclui perto de um milhão de sequências ITS, as quais são curadas, anotadas e disponíveis para consulta. Através do uso do classificador Naives (Bokulich et al., 2018) implementado no programa QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Abaixo, na figura 4, pode ser verificado em maiores detalhes o processo de análise dos dados.

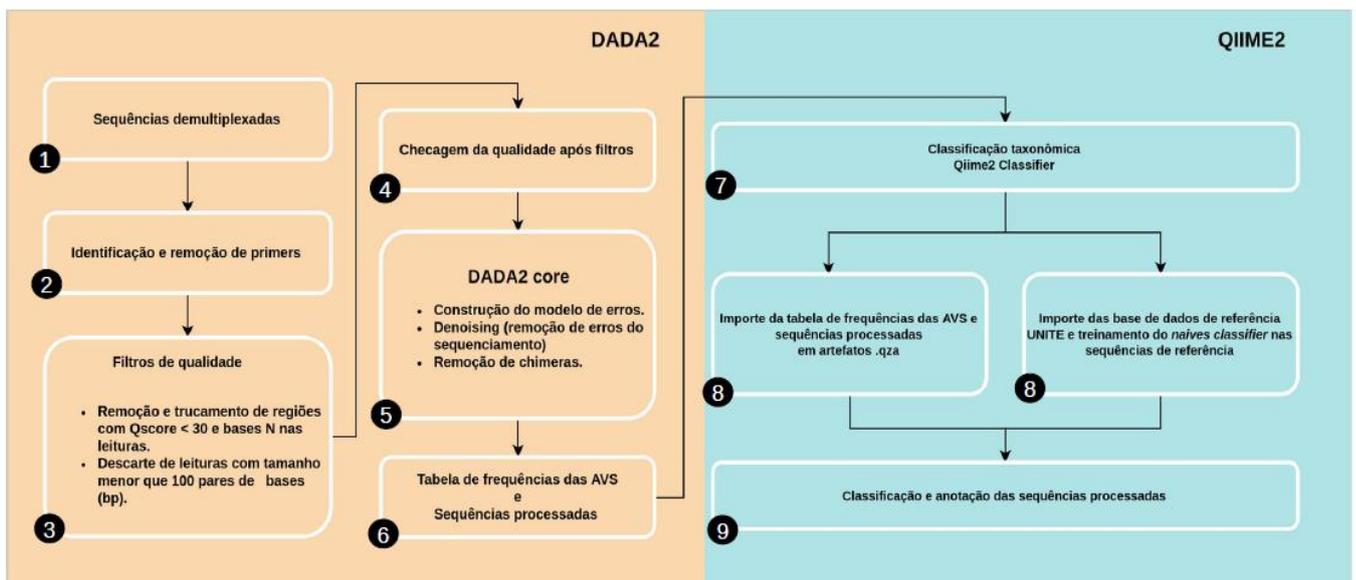


Figura 5. Workflow utilizado para o processamento das sequências ITS.

3.4 Análises Estatísticas

Para análise da diversidade fúngica foi utilizado o teste da diversidade α que se refere ao número e abundância relativa das espécies dentro de uma comunidade (Whittaker *et al.*, 2001). A diversidade α das áreas foi avaliada pelos índices de diversidade de Shannon (H') e o índice de dominância de Simpson (C) (Brower & Zar, 1984).

Para a análise do perfil funcional das guildas, a comunidade fúngica de cada amostra foi avaliada em relação à formação de guildas (conjunto de todas as espécies que exploram o mesmo tipo de recurso de forma similar, sem a necessidade de co-ocorrência). Para isso, foi utilizado os dados totais das ASVs fúngicas através do aplicativo online FUNGuild, de acordo com Nguyen e colaboradores (2016).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu

Inicialmente neste teste seriam avaliados 60 fungos positivos previamente (Castaño, 2016) para a atividade ligninolítica qualitativa em placa de cultura a base de extrato de malte suplementado com guaiacol. Após reativação dos isolados preservados, destes 60 fungos, o teste quantitativo em meio líquido foi realizado com 40 isolados devido ao baixo ou ausente crescimento dos outros representantes.

Dentre os 40 isolados avaliados, 33 obtiveram resultados positivos para a produção da atividade da lacase, com destaque para dois fungos, os quais apresentaram os melhores resultados: Isolado EL (código na CCMIGA 1IG2.2) com 0,931 UL e Isolado_FM (código na CCMIGA 3IG3.1) com 0,676 UL de atividade, conforme apresenta a figura 6, considerando os menores desvios. Os fungos estão em fase de caracterização taxonômica em outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Rafaella C. Bonugli-Santos.

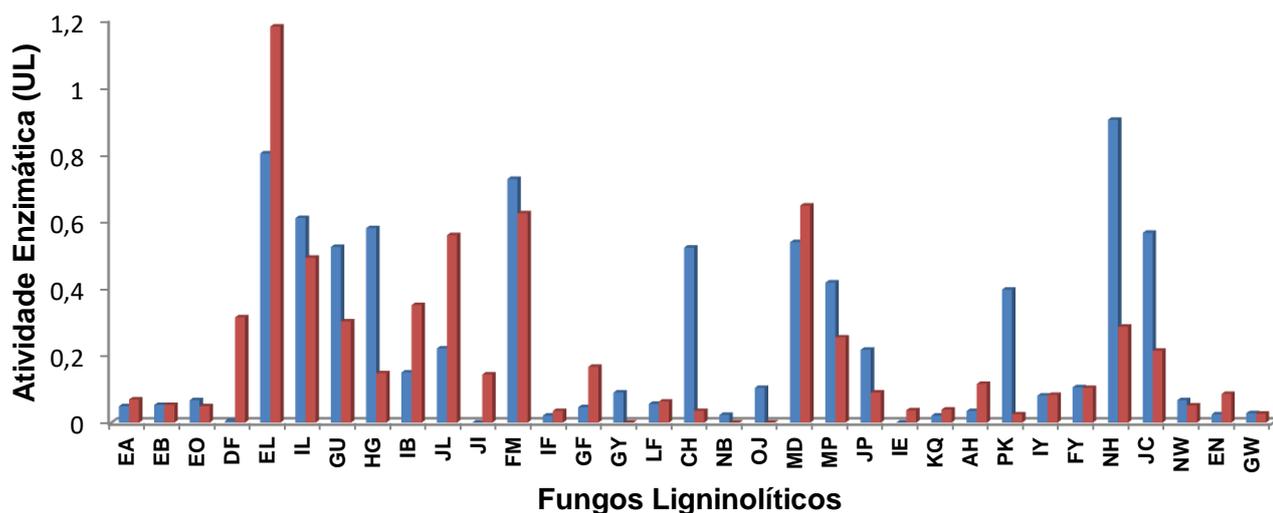


Figura 6. Avaliação quantitativa da atividade enzimática da lacase (UL) dos isolados fúngicos de um microhabitat do PNI após sete (7) dias de cultivo em meio líquido composto por malte (2%). Leitura realizada em espectrofotômetro juntamente com o substrato ABTS em duplicata (barras vermelhas e azul).

4.2 *Metabarcoding* de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por *Tradescantia zebrina*

No total (somando as duas amostras), após o tratamento dos dados brutos, 367 ASVs (variante de sequência única, semelhantes a unidades taxonômicas operacionais) fúngicas foram confiantemente detectadas e identificadas. Os ASVs são fragmentos verdadeiros de sequência de amplicons observados nas amostras, enquanto as unidades taxonômicas operacionais, OTUs, mais utilizadas em análises de bioinformática, surgem de um cluster de sequências não biologicamente motivadas que podem pertencer por distância ou raio de inclusão (Porter & Hajibabae, 2018). A figura 7 nos permite visualizar a abundância total de sequências das amostras, bem como a presença de sequências iguais entre elas.

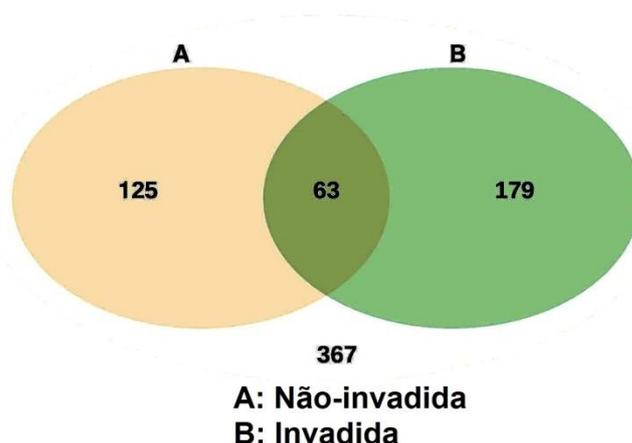


Figura 7. Abundância de sequências obtidas na análise de *metabarcoding* das amostras de serapilheira do PNI após 100 dias de incubação em sistema de *litter bag*.: A) nativa; e B) invadida por *Tradescantia zebrina*

A análise estatística da diversidade α mostrou que a serapilheira invadida por *T. zebrina* apresentou riqueza maior em comparação com a serapilheira nativa (Tabela 6). Tanto o índice de Shannon, que reflete a diversidade do local expressando riqueza e uniformidade, quanto o índice de Simpson, que reflete a dominância de espécies, apresentaram-se maiores na serapilheira invadida por *T. zebrina*.

| | Assigned reads | Observed species | Chao1 | ACE | Shannon | Simpson | Simpson reciprocal |
|------------------------|----------------|------------------|-------|-----|----------|-----------|--------------------|
| Native Litter | 6.608747 | 188 | 188 | 188 | 2.995661 | 0.8580760 | 7.046026 |
| Invasive Litter | 7.648529 | 242 | 242 | 242 | 3.764290 | 0.9437469 | 17.776806 |

Tabela 6. Índices de riqueza e diversidade (índice de Shannon e índice de Simpson) fúngica da serapilheira, nativa e invadida por *Tradescantia zebrina*, do PNI após 100 dias de incubação em sistema de *litter bag*.

Entre os táxons fúngicos (Figura 8), Ascomycota foi o filo mais abundante encontrado em ambas as amostras, com 57% na amostra nativa e 96% na amostra invasora. O filo Basidiomycota esteve presente em 41% na amostra nativa e 3% na amostra invadida. Em adição, outros filios foram detectados, porém em menor porcentagem, como mostra o gráfico abaixo.

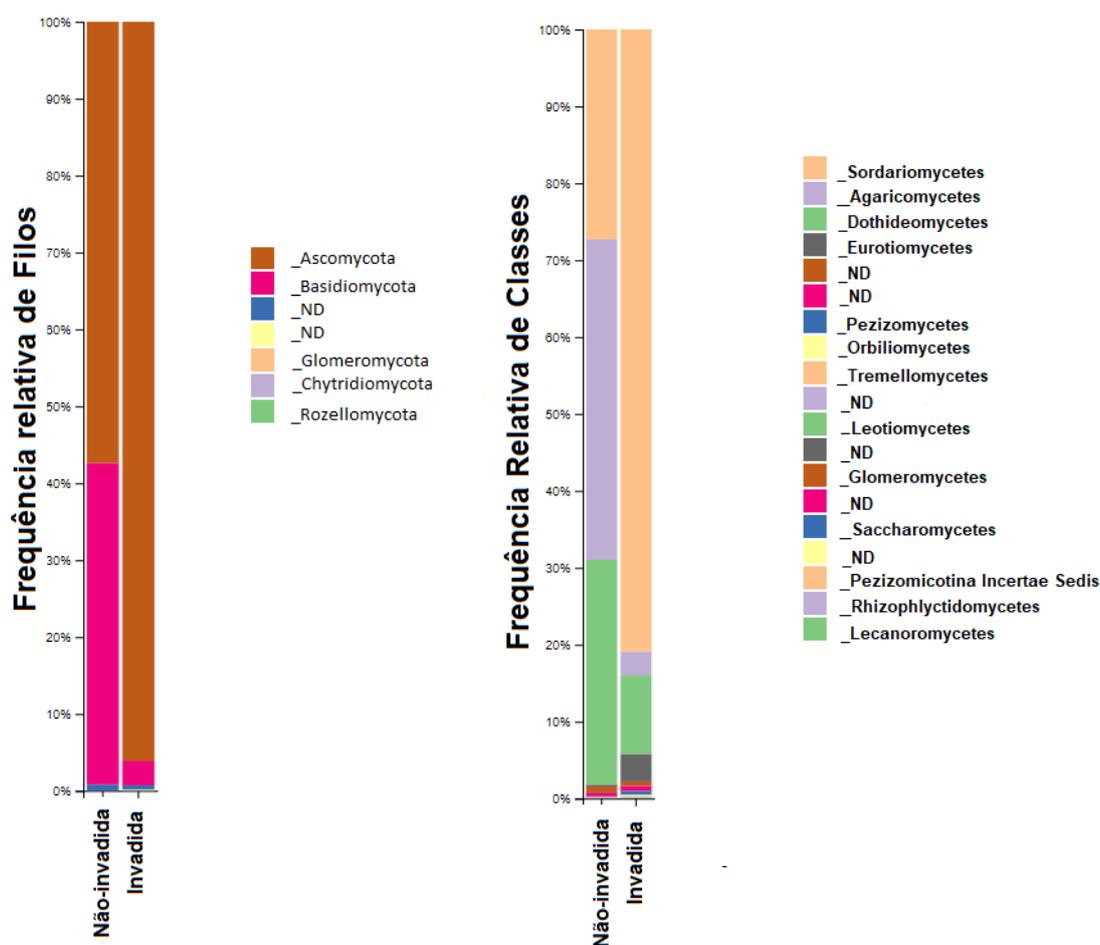


Figura 8. Frequência relativa de filios e classes das amostras de serapilheira, nativa e invadida por *Tradescantia zebrina*, do PNI após 100 dias de incubação em sistema de *litter bag*.

A classe Sordariomycetes prevaleceu na amostra invadida com 80% de abundância sob a nativa, onde se mostrou com apenas 27% (Figura 8). Ao nível de gênero, 112 gêneros distintos foram identificados. No entanto, não foi possível identificar 138 ASVs ao nível de gênero, de acordo com a figura 9.

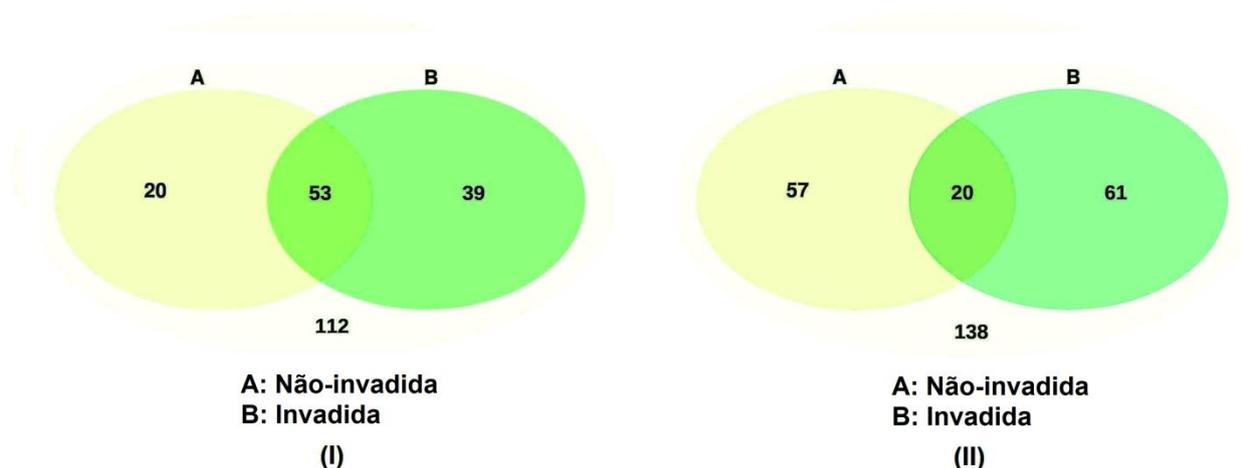


Figura 9. Diagramas de Venn dos gêneros identificados (I) e não identificados (II) das amostras de fragmentos da serapilheira nativa e fragmentos da serapilheira da invasora por *T. zebrina*, do PNI. A) Serapilheira nativa; B) Serapilheira invasora.

No geral, houve dois gêneros de maior abundância que não foram identificados. Dos gêneros identificados no total das duas amostras, *Lepiota* (Basidiomycota) foi o mais abundante com 33,4%, seguido por *Acremonium* e *Fusidium* (Ascomycota), ambos com 12,5%, *Plectosphaerella* (Ascomycota) com 7,2%, *Panaeolus* e *Psathyrella* (Basidiomycota) ambos com 4,5%, todos os gêneros identificados podem ser observados no apêndice 1.

Houve uma importante diferença na abundância desses gêneros quando comparadas entre as amostras nativa e invasora. Na amostra de serapilheira nativa, os gêneros mencionados acima obtiveram as seguintes frequências: *Lepiota* 33,4%, *Acremonium* 0,7%, *Fusidium* 5,2%, *Plectosphaerella* 1,4%, *Panaeolus* 3,5% e *Psathyrella*

2,8%. Enquanto na amostra invasora, o gênero *Lepiota* não foi encontrado, o gênero *Acremonium* obteve 11,8% de frequência, *Fusidium* 7,3%, *Plectosphaerella* 5,8%, *Panaeolus* 2% e *Psathyrella* 1,7%, como mostra a figura 10.

De acordo com a figura 9 e 10, alguns gêneros foram encontrados exclusivamente na serapilheira nativa (18%) como *Lepiota* 33,4%, *Porobeltraniella* 9,9%, *Lepista* 4,2%, *Montagnula* 1%, *Angustimassarina* 0,7% e *Paramicrothyrium* 0,4. Além disso, alguns gêneros (35%) também foram encontrados apenas na serapilheira invasora como *Juhya* 7%, *Colletotrichum* 3%, *Campylospora* 2,6%, *Didymella* e *Phoma* com 1%, *Paramicrothyrium* 0,7, *Curvularia* e *Terfezia* com 0,5%, *Bionectria* e *Cladosporium* com 0,4%.

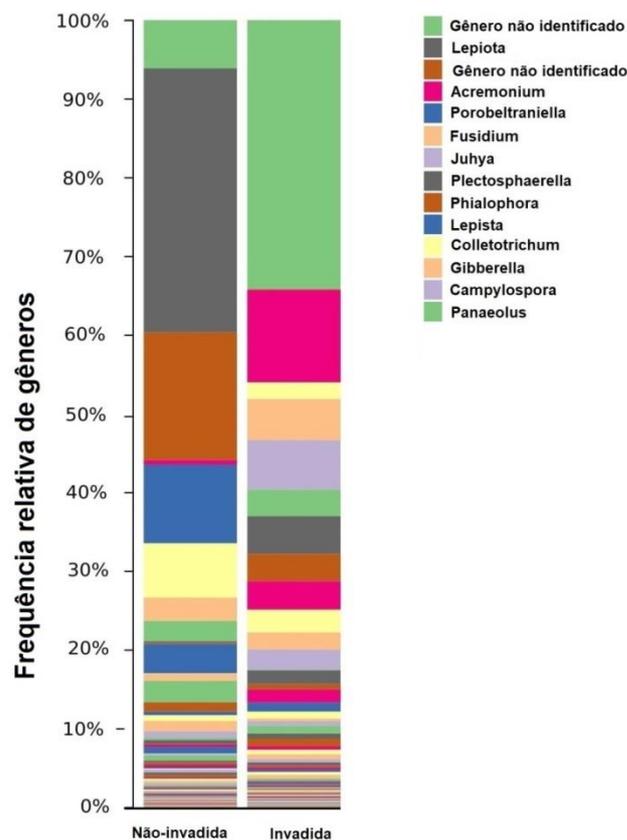


Figura 10. Frequência relativa taxonômica de gêneros realizada através do *metabarcoding* das amostras de serapilheira, nativa e invasada por *Tradescantia zebrina*, do PNI após 100 dias de incubação em sistema de *litter bag*.

Das ASVs classificadas com confiança em uma guilda funcional (Tabela 7 e Figura 11), destacaram-se com maior riqueza na serapilheira nativa as guildas Patógeno-Planta (acima de 8%), Saprotrófico de Madeira (acima de 6%) e Endófito (acima de 5%). Já na serapilheira invadida por *T. zebrina* destacaram-se as guildas Patógeno-Planta (acima de 13%) seguida por Endófito e Saprotrófico de Madeira (ambos acima de 8%). Ademais, verifica-se que a abundância fúngica de saprotróficos sobrepôs-se sobre as outras classes com 44% de abundância total de ASVs classificadas.

| Guildas | Serapilheira Nativa | Serapilheira Invadida |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Ectomicorrízico | 3 | 6 |
| Endófito | 27 | 45 |
| Micorrízico Arbuscular/Ericoide | 2 | 4 |
| Parasita-Fungo | 10 | 20 |
| Parasita-Líquén | 10 | 15 |
| Patógeno-Animal | 18 | 31 |
| Patógeno-Planta | 44 | 73 |
| Saprotrófico de Estrume | 5 | 3 |
| Saprotrófico indefinido | 55 | 74 |
| Saprotrófico de Madeira | 33 | 44 |
| Saprotrófico de Planta | 5 | 4 |
| Saprotrófico de Solo | 5 | 12 |

Tabela 7. Riqueza de guildas funcionais baseada em ASVs das amostras, nativa e invadida por *T. zebrina*, do PNI.

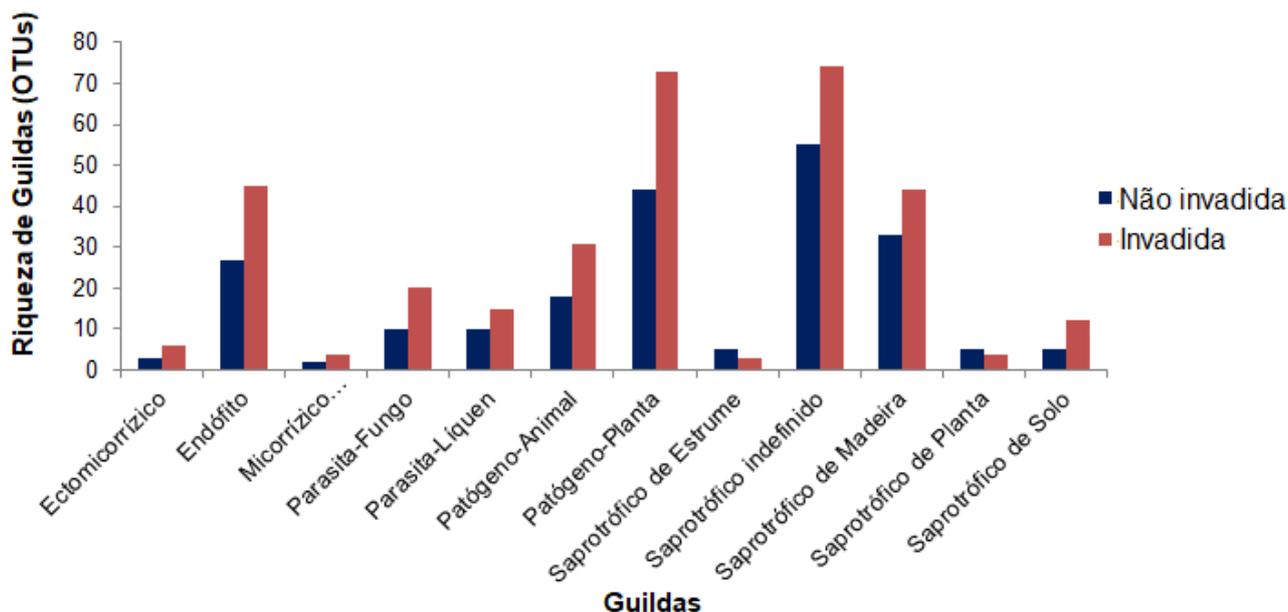


Figura 11. Riqueza de guildas funcionais baseada em ASVs das amostras, nativa e invadida por *T. zebrina*, do PNI.

De acordo com a identificação dos gêneros com maior abundância total entre as amostras, o gênero *Lepiota* foi classificado funcionalmente na guilda Saprotrófico de Solo; *Acremonium* em Patógeno-Animal, Endófito, Parasita-Fungo, Patógeno-Planta e Saprotrófico de Madeira; e *Plectosphaerella* foi classificado na guilda Patógeno-Planta.

Alguns gêneros exclusivos de cada amostra apresentaram-se também com guildas ecológicas diferentes entre si. Os gêneros exclusivos da amostra nativa identificados com confiança em guildas classificaram-se em: Saprotrófico do Solo (*Lepiota*), Endófito e Saprotrófico indefinido (*Porobeltraniella*); e Parasita-Fungo e Saprotrófico de Madeira (*Angustimassarina*). Já os gêneros exclusivos da amostra invasora classificaram-se nas seguintes guildas: saprotrófico indefinido (*Juhya*); Endófito e Patógeno-Planta (*Colletotrichum*); Parasita-Fungo, Patógeno-Planta e Saprotrófico de Planta (*Phoma*); Patógeno Planta (*Curvularia*) e Ectomicorrízico (*Terfezia*).

5 DISCUSSÕES

5.1 Atividade quantitativa da lacase em fungos isolados de um microhabitat do Parque Nacional do Iguaçu

O resultado obtido foi satisfatório, haja vista que 82.5% das amostras utilizadas foram positivas para a atividade da lacase. Foi possível confirmar o perfil de atividade da enzima no PNI e verificar que esta enzima pode participar ativamente dos processos do ecossistema florestal do parque, como o ciclo do carbono e ciclagem de nutrientes. Considerando-se que o acúmulo de carbono (C) e nitrogênio (N) mediado pela lignina nos solos tem implicações no desenvolvimento em longo prazo do ecossistema e no seu pleno funcionamento dos serviços, pois a lignina possui um papel importante como fator regulador nos processos de decomposição e ecossistêmicos no geral (Berg & McClaugherty, 2003; Urbanová *et al.*, 2015), podemos indicar possível envolvimento da microbiota fungica nesse processo no PNI.

Ainda assim, obtivemos alguns fungos com ausência de atividade ou com baixa atividade enzimática. No entanto, isto é justificável de acordo com a literatura, pois a instabilidade das enzimas ligninolíticas pode ser atribuída a diversos fatores, tais como degradação por proteases (Staszczak *et al.*, 2000), desnaturação por valores muito baixos de pH (Bonomo *et al.*, 2001; Keum & Li, 2004), desnaturação irreversível devido à exposição prolongada aos radicais produzidos pelas enzimas presentes e inativação por substâncias húmicas que são formadas durante a degradação de substratos ligninocelulósicos (Keum & Li, 2004).

Além do mais, o tempo de incubação na escala laboratorial desempenha um papel importante no crescimento e na secreção enzimática de diferentes espécies fúngicas (El Monssef *et al.*, 2016). Sadhasivam e colaboradores (2008) relataram que o início da atividade de lacase em *T. harzianum* ocorreu no 2º dia de incubação e atingiu seu máximo no 4º dia com declínio gradual na taxa de produção da enzima, onde

nenhuma produção da mesma foi observada após o 8º dia. Bem como, verificaram que a atividade máxima da enzima lacase foi obtida na temperatura de 35 °C. Em adição, foi relatado por Valle e colaboradores (2015) em sua pesquisa, o aumento da atividade máxima da lacase através da indução com guaiacol entre 60 e 120%, respectivamente. Evidenciando a presença da atividade enzimática da lacase em meio com o guaiacol no trabalho de Castaño (2016), com possível ausência de atividade no presente projeto quando colocado em meio de cultivo líquido MA 2% sem a adição de guaiacol.

Portanto, observa-se a possibilidade de haver resultados baixos para a análise da atividade enzimática da lacase em razão de tais atribuições, tempo de armazenamento das amostras e características de diferentes espécies fúngicas (El Monssef *et al.*, 2016). Também por esses motivos, torna-se difícil realizar a comparação da atividade enzimática entre autores, devido às particularidades dos testes, como diferentes espécies de fungos, nutrientes utilizados, tempo de incubação, agitação, indutores, dentre outros (Osono *et al.*, 2007; Baldrian, 2006). Logo, cada espécie possui suas particulares condições fisiológicas ideais para o cultivo e produção dessa enzima, onde a sua atividade em testes pode variar em torno de 1 UL à 5000 UL (Guimarães, 2017). Dessa forma, também pode-se utilizar indutores com o objetivo de aumentar a produção de lacase por micro-organismos, como aminoácidos (Dhawan & Kuhad, 2002), compostos aromáticos (Terrón *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004), extratos vegetais (Bagewadi *et al.*, 2017) e cobre (Niladevi *et al.*, 2009; Saparrat *et al.*, 2002).

5.2 Metabarcoding de fungos do Parque Nacional do Iguaçu de áreas nativas e áreas invadidas por *Tradescantia zebrina*

A distribuição das ASVs mostrou que a maioria das sequencias são únicas de cada serapilheira indicando uma especificidade fúngica importante para entendimento da comunidade microbiana. Porém, a ausência de identificação de 37% das

ASVs retrata a alta diversidade fúngica não conhecida que pode indicar grupos novos com funções importantes na comunidade microbiana.

A maior diversidade fúngica na serapilheira da amostra da invasora possivelmente ocorre devido à característica da biomassa da *T. zebrina* (baixo conteúdo de lignina) (Standish *et al.* 2004), que favorece a presença de fungos saprofitos não ligninolíticos, sugerindo um perfil de redundância funcional que resulta na maior disponibilidade de necromassa promovida pelas invasoras, ocasionando um aumento na atividade metabólica em regiões invadidas (Herrera *et al.*, 2011). Em adição, uma vez que as amostras foram obtidas após 100 dias de incubação, a redundância funcional da invasora pode ser explicada devido ao estágio de decomposição vegetal. O estudo de Valentín e colaboradores (2014) indicou o acúmulo de redundância funcional durante a sucessão da comunidade de fungos na decomposição da madeira devido ao funcionamento de comunidades altamente diversas e mais resistentes à perda de diversidade no estágio de decaimento tardio do substrato. Já no início da decomposição as comunidades menos diversas apresentavam funções únicas no processo de decomposição. Isso ocorre devido ao fato de que a taxa de decomposição diminui e a diversidade de fungos aumenta à medida que a decomposição avança.

Os dados da tabela 7, que avalia a riqueza de guildas entre as amostras, por agrupar organismos sem coocorrência, ou seja, sem a possibilidade de unidades ocorrerem uma(s) em combinação com outra(s), reafirma o perfil de redundância funcional, e ausência de sinergismos, especialmente para a serapilheira invasora, uma vez que a riqueza de todas as guildas encontradas é maior na invasora.

Na serapilheira nativa 98% dos táxons foram explicados entre os filos Ascomycota e Basidiomycota. Já na serapilheira invadida por *T. zebrina* houve uma redução abrupta da presença de fungos do filo Basidiomycota. Dados consistentes com o estudo de Kerfahi e colaboradores (2014), que relataram que a menor abundância de

Basidiomycota nos solos de dendezeiros pode ser devido à relativa falta de detritos lenhosos grossos na serapilheira nessas plantações. Onde ocorre maior presença de resíduos pobre em lignina, devido à redução da sua entrada direta no solo, e rico em nutrientes de matéria orgânica das raízes e folhas do dendezeiro e também da camada de ervas daninhas herbáceas (invasoras) que crescem no local.

As características da parede celular de *T. zebrina*, especialmente o baixo conteúdo de lignina do gênero (Standish *et al.* 2004), corroboram com a predominância do filo Ascomycota e funcionalmente a supressão de fungos basidiomicetos sustenta a hipótese que a serapilheira da invasora possa alterar a atividade da lacase na comunidade estudada ou o destino da decomposição. No trabalho de Eichlerová *et al.* (2015), houve atividades baixas das enzimas envolvidas com a decomposição vegetal, incluindo a lacase em fungos saprofíticos do filo Ascomycota quando comparado ao filo Basidiomycota.

Apesar da ausência significativa dos basidiomicetos produtores de lacase na serapilheira invadida, a atividade da enzima não pode ser descartada. Haja vista que, a classe Sordariomycetes, também conhecida como fungos de oídio, foi encontrada predominantemente na serapilheira da invasora (Figura 9). Esta está presente em quase todos os ecossistemas como patógenos e endófitos de plantas, artrópodes e mamíferos, e saprófitos envolvidos na decomposição e ciclagem de nutrientes da serapilheira, incluindo madeira, caules herbáceos e estrume. Estes fungos endófitos são capazes de colonizar as sementes e crescer dentro das plantas que se apresentam aparentemente saudáveis, conferindo proteção sistêmica à planta, as quais se beneficiam com maior resistência à seca, alimentação reduzida por insetos e infecções por patógenos (Zhang *et al.*, 2006). De acordo com o estudo de Yuan (2011) pode-se comprovar a ocorrência e prevalência de enzimas ligninolíticas, como a lacase, nos endófitos e saprófitos desta classe, os quais são vitais para a decomposição da lignocelulose. A pesquisa mostrou também a

capacidade dos isolados de alternar entre os estilos de vida endófito e saprófito, importantes para a manutenção celular da folha saudável para a serapilheira, reforçando-os como potenciais decompositores através de seus papéis ecológicos na ciclagem de nutrientes e na estabilidade do ecossistema. Além disso, Shao e colaboradores (2008) determinaram o alto conteúdo de lignina em *Abies beshanzuensis*, uma espécie de conífera da família *Pinaceae*, que pode estar relacionado à abundância de enzimas ligninolíticas (lacase) em endófitos que garantem sua infecção e colonização bem-sucedidas nos tecidos hospedeiros.

Já existem estudos mostrando o mesmo nível de atividade da lacase ou até superior em ascomicetos. Como, por exemplo, a comparação das atividades enzimáticas em ascomicetos da serapilheira de *Quercus petraea*, mostra que os basidiomicetos produziram significativamente menos esterase, lipase, fosfatase ácida, b-glucosidase, n-acetilglucosaminidase, a-manosidase e especialmente lacase (Snajdr *et al.* 2011), o que indica que os colonizadores internos (endófitos) podem ser superiores na produção destas enzimas. O que é de suma importância para a degradação da lignina, pois de acordo com Kameshwar & Qin (2016) as enzimas degradadoras de lignina dependem de enzimas de suporte como diversas oxidases, redutases e esterases para desencadear as enzimas ligninolíticas através do fornecimento de peróxido de hidrogênio. Além disso, a lignina também é parcialmente e completamente esterificada pelos grupos O-acetil e metil e estes componentes da lignina acetilada da parede celular da planta inibem a atividade das enzimas ligninolíticas. Assim, as esterases (como ferulol e glucuronol) desempenham um papel significativo na desacetilação dos complexos esterificados de lignina-carboidrato (Kameshwar & Qin, 2019). Esses dados, são extremamente importantes para entender o funcionamento da lacase nas amostras estudadas no presente trabalho e nunca antes avaliados.

Com nossos resultados, uma vez que a fenologia avalia a relação também com o substrato, podemos inferir que o gênero *Lepiota* (ordem Agaricales, classe Agaricaceae) foi altamente sensível à mudança da serapilheira alterando a função ecossistêmica. Este gênero apresentou maior abundância total entre as amostras, além de ter sido encontrado exclusivamente na serapilheira nativa. Ele cresce em solos de casca, caracterizados por um pH relativamente alto e uma rápida decomposição da serapilheira o que o caracteriza como grupo chave para a decomposição, além de ser encontrado em solos contaminados com metais pesados (Hemmes & Desjardin 2002; Kalac & Svoboda, 2000), características comuns do solo nativo do PNI. O trabalho de Sato e colaboradores (2012) revela que a função ecossistêmica dos fungos prediz a fenologia da frutificação de cogumelos e o gênero *Lepiota* mostrou-se altamente sensível a variação da temperatura, em relação aos outros fatores avaliados, como precipitação de chuva acumulada mensal e semanal e número de anos decorridos.

Ademais, os gêneros *Acremonium* e *Fusidium*, que demonstraram alta abundância na serapilheira invasora, mas também estiveram presentes na nativa. Pertencem à mesma ordem fúngica Hypocreales (classe Sordariomycetes) a qual possui fungos biotróficos, principalmente patógenos de plantas e de insetos, micoparasitas, endófitos e diversas espécies saprotróficas (Sung *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2006). Algumas espécies específicas são capazes de interagir com as raízes das plantas como micro-organismos competentes para a rizosfera, sugerindo que poderiam sobreviver no solo sem hospedeiros de artrópodes (Hu & St. Leger, 2002; Klingen *et al.*, 2015). Interações planta-fungo foram relatadas para Hypocreales entomopatogênicos, onde os fungos agem como endófitos ou epífitos nos filoplanos de várias espécies de plantas e plantas invasoras (Meyling & Eilenberg, 2006; Posada & Vega, 2005). Ocorrências naturais de Hypocreales entomopatogênicos foram encontradas em várias partes das plantas, incluindo folhas, caule e raízes de *Coffea arabica*, *Zea mays* e *Oryza sativa*. Além

disso, são conhecidos por sua atividade enzimática celulolítica, lignocelulolítica e hidrolítica (Vega *et al.*, 2008; Arnold & Lewis, 2005; Suto & Tomita, 2001). O que explica a sua contribuição para a decomposição, ciclagem de nutrientes e fixação do carbono, bem como para a alta taxa de multiplicação da invasora e redução da biomassa nativa.

De maneira geral não houve diferença em relação à riqueza de guildas entre as amostras, com predominância de organizações de saprotróficos. Os saprotróficos são encontrados em todas as principais linhagens de fungos. Porém, alguns saprotróficos de plantas podem ser atribuídos a grupos taxonômicos específicos, principalmente fungos em decomposição de madeira. Eles possuem representantes de Basidiomycota, como também de Ascomycota, onde os fungos de podridão branca (Basidiomycota) são representados principalmente pelos Agaricomycetes, que são comuns, enquanto fungos de podridão marrom e suave são encontrados apenas em alguns grupos. Os saprotróficos lignocelulolíticos são classificados em diferentes estratégias de podridão, onde já é conhecido que a podridão suave pode desempenhar papéis importantes e subestimados; enquanto a podridão branca e marrom são mais comuns (Gessner *et al.*, 2007; Kodsueb *et al.*, 2016). Os saprotróficos lignocelulolíticos conhecidos também podem apresentar atividade em diversas guildas, pois enzimas semelhantes são compartilhadas entre os saprotróficos da serapilheira e da madeira morta (Kohout *et al.*, 2018; Eichlerová *et al.*, 2015; Vöříšková & Baldrian, 2013; Osono, 2007).

Os saprotrófos de madeira são a mais abundante fonte orgânica de biomassa na Terra, além de serem responsáveis por funções como a degradação natural de celulose, hemicelulose e substâncias recalcitrantes, como a lignina, devido à utilização de uma grande diversidade de enzimas (Lombard *et al.*, 2013). Estes, por vezes também englobam os saprotrófos de plantas, provavelmente pela similaridade da fonte de nutrientes, e a menor dificuldade de adquiri-los, pois são compostos por material menos

recalcitrante que a madeira. Esta habilidade os faz desempenhar papéis centrais na decomposição e ciclagem de nutrientes, logo são imprescindíveis na manutenção do ecossistema do PNI (Hobbie & Horton, 2007).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise quantitativa da lacase, foi possível comprovar a presença de atividade da enzima, mesmo no microhabitat com possíveis impactos antropogênicos do PNI e identificar dois isolados com potencial biotecnológico para futuros estudos.

Comparando as comunidades das amostras da serapilheira nativa e da serapilheira da invasora através da análise molecular, há claramente uma ampla diversidade taxonômica e uma ampla gama de guildas funcionais nos dois ambientes estudados. De acordo com a análise de diversidade α , houve maior abundância relativa da diversidade fúngica na serapilheira da invasora *T. zebrina*. O que confirma os dados da literatura, que os impactos das invasões são complexos e possuem potencial de alterar permanentemente a diversidade e estrutura das comunidades microbianas resultando diretamente na redundância funcional. Um dos principais impactos da redundância funcional é o favorecimento de processos de extinção de muitos grupos de importância microbiológica.

Verificou-se também, maior representatividade do filo Ascomycota sob o filo Basidiomycota em ambas as amostras. Porém com redução massiva do filo Basidiomycota na serapilheira invadida. Repercutindo possivelmente na diminuição da diversidade fúngica de basidiomicetos produtores de enzimas ligninolíticas da serapilheira da invasora. Contudo, demonstrou-se a possibilidade de atividade da lacase nas classes existentes do filo Ascomycota, com diversos representantes, incluindo endófitos e saprófitos, os quais são vitais para a decomposição da lignocelulose e potenciais decompositores através de seus papéis ecológicos na ciclagem de nutrientes e na estabilidade do ecossistema.

Conclui-se que não houve diferença em relação à riqueza de guildas entre as amostras através da análise no FUNguild. Mas, por agrupar organismos sem co-

ocorrência, ou seja, sem sinergismo, reafirma-se o perfil de redundância funcional, especialmente para a serapilheira invasora.

O *metabarcoding* nos permitiu confirmar as incidências já documentadas, em outros estudos com outras metodologias, de que as plantas invasoras são mais produtivas do que as espécies nativas ocorrentes e influenciam na diversidade microbiana da serapilheira local, onde a diversidade encontrada foi duas vezes maior em comparação à biomassa nativa. Como novidade nosso estudo mostrou que essa alteração pode resultar em redundância funcional fúngica na serapilheira da invasora, podendo alterar o destino do carbono no solo e impactar diretamente nos ciclos biogeoquímicos. Além do mais, não está claro se eles teriam implicações para a estabilidade do ecossistema. A falta de entrada de detritos ricos em lignina pode ter implicações na estabilidade em longo prazo do teor de carbono do solo.

7 REFERÊNCIAS

- Alessi, A. M. et al. Revealing the insoluble metasecretome of lignocellulose-degrading microbial communities. *Scientific Reports*, 7:2356, 2017.
- Alvares, C. A. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, 22(6):711-728, 2014.
- Arnold, A. E.; Lewis, L. C. *Ecology and Evolution of fungal endophytes and their roles against insects*. Oxford University Press, 2005.
- Arora, D. S.; Sharma, R. K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:1760-1788, 2010.
- Asgher, M.; Bilal, M.; Bhatti, H. N. Improved catalytic and dye decolorization properties of chitosan beads immobilized manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05. *J. Biochem. Biotechnol. Biomaterials* 1:76-89, 2016.
- Bagewadi, Z. K. et al. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1)139-150, 2017.
- Baldrian P. Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30(2):215-242, 2006.
- Baldrian, P. et al. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil*, 338:111-125, 2011.
- Ballaminut, N. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação, Departamento de Botânica do Instituto do Meio Ambiente, 2007.
- Baltierra-Trejo, E. et al. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *Journal of Microbiological Methods*, 119:126-131, 2015.
- Bardgett, R. D. *The Biology of Soil: a Community and Ecosystem Approach*. Oxford University Press, Oxford, 2005.
- Bellote, A. F. J.; Dedecek, R. A.; Silva, H. D. Nutrientes minerais, biomassa e deposição de serapilheira em plantio de *Eucalyptus* com diferentes sistemas de manejo de resíduos florestais. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 56:31-41, 2008.
- Berg B.; McClaugherty C. Decomposer organisms. In: *Plant Litter*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2003.
- Berg, B.; McClaugherty, C. *Plant litter. Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*, third ed. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, 317, 2014.
- Bilal, M. et al. Characteristic features and dye degrading capability of agar-agar gel immobilized manganese peroxidase. *Int. J. Biol. Macromol.* 86:728-740, 2016.

- Binod P., et al. Chapter 10 - Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Biofuels. Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 229-250, 2011.
- Blanchette, R. A. Defibrillation of wood in the expedition huts of Antarctica: and unusual deterioration process occurring in the polar environment. *Polar Record* 38:313–322, 2002.
- Blumenthal, D. et al. Synergy between pathogen release and resource availability in plant invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:7899–7904, 2009.
- Bokulich, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 6:90, 2018.
- Bolyen, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37:852-857, 2019.
- Bonomo, R. P. et al. Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83(1):67-75, 2001.
- Brower, J. E.; Zar, J. H. *Field & laboratory methods for general ecology*. 2 ed., Dubuque: Wm. Brown Co., 1984.
- Burgiel, S. W. & Muir, A. A. *Invasive species, climate change and ecosystem-based adaptation: Addressing multiple drivers of global change. Global invasive species programme (GIPS)*, 2010.
- Burns R. G. et al. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58:216-234, 2013.
- Buswell, J. A. et al. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128(1):81-87, 1995.
- Calderon, F. J. et al. Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acids after tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65:118–126, 2001.
- Callahan, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13:581-583, 2016.
- Camarero S. et al. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1264–1271, 2007.
- Carpanezi, O. T. B. Espécies exóticas no Parque Estadual de Vila Velha: Subsídios para controle e erradicação. In: *Coletânea de pesquisa: Parques Estaduais de Vila Velha, Cerrado e Guartelá*. Instituto Ambiental do Paraná, 2011.
- Casiraghi, M. et al. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, 11(4):440-453, 2010.

- Castaño, D. C. D. Efecto de borde em hongos de un bosque atlântico semidecuido. Repositório institucional Universidade Federal de Integração Latino-americana, 2016.
- Castro, J. H. R. et al. Apparent competition of the invasive inchplant in Atlantic forest. In: Simpósio Internacional de ecologia, 2. São Paulo. *Anais...* São Paulo: UFSCar, 2016.
- Chandra, R.; Chowdhary, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 17:326–342, 2015.
- Chen, X. et al. Removal of nine pesticide residues from water and soil by biosorption coupled with degradation on biosorbent immobilized laccase. *Chemosphere*, 233:49-56, 2019.
- Chowdhary, P.; Saxena, G.; Bharagava, R. N. Role of laccase enzyme in bioremediation of industrial wastes and its biotechnological application. In: Bharagava, R.N., Saxena, G. (Eds.), *Bioremediation of Industrial Pollutants*. Write and Print Publication, Delhi, pp. 307–331, 2016.
- Christopher, L. P. et al. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front. Energy Res.*, 2014.
- Clemmensen K. E. et al. Roots and Associated Fungi Drive Long-Term Carbon Sequestration in Boreal Forest. *Science*, 339:165-1618, 2013.
- Cocolin, L. et al. Next generation microbiological risk assessment meta-omics: The next need for integration. *International Journal of Food Microbiology*, 287:10-17, 2018.
- Coelho, J. H. et al. Exploring the exocellular fungal biopolymer botryosphaeran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone. *Talanta*, 204:475-483, 2019.
- Crockatt, M. E. Are there edge effects on forest fungi and if so do they matter? *Fungal Biology Reviews*, 26(2):94-101, 2012.
- Dhawan, S.; Kuhad, R. C. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Bioresource Technology*, 84(1):35-38, 2002.
- de Graff, M. A. et al. Labile soil carbon inputs mediate the soil microbial community composition and plant residue decomposition rates. *New Phytol.* 188:1055–1064, 2010.
- Dogra, K. S. et al. Alien plant invasion and their impact on indigenous species diversity at global scale: A review. *Journal of Ecology and the Natural Environment*. 2(9):175-186, 2010.
- Eichlerová, I. et al. Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology*, 13:10-22, 2015.
- El Monssef, R. A. A. et al. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1):145-154, 2016.

Fanin, N.; Betrand, I. Aboveground litter quality is a better predictor than belowground microbial communities when estimating carbon mineralization along a land-use gradient. *Soil Biol. Biochem.* 94:48-60, 2016.

Figueiredo Filho, A. et al. Avaliação estacional da deposição de serapilheira em uma Floresta Ombrófila Mista localizada no sul do Estado do Paraná. *Ciência Florestal*, 13(1):11-18, 2003.

Geng X.; Li K. Degradation of non-phenolic lignin by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:342–346, 2002.

Gessner, M. O. et al. Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. *Environmental and Microbial Relationships*, 17:301-324, 2007.

Gil E. S. et al. Biosensor based on Brut Extract from laccase analysis of phenolic compounds. *Portugaliae Electrochimica Acta.* 27(3):215-225, 2009..

Ghosh, A. et al. Enzyme production by *Mycena galopus* mycelium in artificial media and in *Picea sitchensis* F-1 horizon needle litter. *Mycol. Res.* 107:996–1008, 2003.

Ghosh, B. et al. Laccase and its source of sustainability in an enzymatic biofuel cell. *Bioresource Technology Reports*, 6:268-278, 2019.

Gomez F. J. R. et al. Assessment of functional and structural changes of soil fungal and oomycete communities in holm oak declined *dehesas* through metabarcoding analysis. *Scientific Reports*, 9:5315, 2019.

Graf, M. M. et al. Pyranose dehydrogenase ligand promiscuity: a generalized approach to simulate monosaccharide solvation, binding, and product formation. *PLoS Comput Biol* 10:e1003995, 2014.

Graf, M. M. et al. Reaction of pyranose dehydrogenase from *Agaricus meleagris* with its carbohydrate substrates. *FEBS J* 282:4218-4241, 2015.

Hemmes, D. E.; Desjardin, D. E. A preliminary listing of *Lepiota* from the Hawaiian Islands. *Inoculum* 53(3): 32, 2002.

Herold, H. et al. Options for monitoring and estimating historical carbon emissions from forest degradation in the context of REDD+. *Carbon Balance Manage.* 6:13, 2011.

Herrera, I. et al. La planta exótica *Kalanchoe daigremontiana* incrementa el reservorio y flujo de carbono en el suelo. *Interciencia*, 36(12):937-942, 2011.

Hobbie, E. A.; Horton, T. R. Evidence that saprotrophic fungi mobilise carbon and mycorrhizal fungi mobilise nitrogen during litter decomposition. *New Phytologist*, 173(3):447-449, 2007.

Hobbie, S. E. Plant species effects on nutrient cycling: revisiting litter feedbacks. *Trends in Ecology and Evolution* 30:(35)7-363, 2015.

HÓRUS (Base de dados nacional de espécies exóticas invasoras I3N Brasil. Florianópolis: Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. Disponível em: <<http://i3n.institutohorus.org.br/www/>>. Acesso em: 10, maio 2020.

Hristovski S. et al. Limitless decomposition in leaf litter of Common beech: Patterns, nutrients' and heavy metal's dynamics. *Pedobiologia*, 57(3):131-138, 2014.

Hu, G.; St. Leger, R. J. Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12):6383-6387, 2002.

Ibama (inédito), Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu, 2018.

Iracheta-Cárdenas, M. M. et al. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. *Journal of Environmental Management*, 177:93-100, 2016.

Joshi, A. et al. Invasive alien species in relation to edges and forest structure in tropical rainforest fragments of the Western Ghats. *Trop. Ecol.* 56:233–244, 2015.

Kameshwar, A. K. S.; Qin, W. Lignin Degrading Fungal Enzymes. *Production of Biofuels and Chemicals from Lignin*, 81-130, 2016.

Kameshwar, A. K. S.; Ramos, L. P.; Qin, W. CAZymes-based ranking of fungi (CBRF): an interactive web database for identifying fungi with extrinsic plant biomass degrading abilities. *Bioresources and Bioprocessing*, 6:51, 2019.

Kavetsky, T. et al. Dependence of operational parameters of laccase-based biosensors on structure of photocross-linked polymers as holding matrixes. *European Polymer Journal*, 115:391-398, 2019.

Kawawa, R. C. et al. The role of *Psidium guajava* L. seed bank as a strategy for its successful invasions of Kakamega Rainforest, Western Kenya. *Asian J. Basic Appl. Sci.* 3:1-6, 2016.

Kerfahi, D. et al. The Impact of Selective-Logging and Forest Clearance for Oil Palm on Fungal Communities in Borneo. *Plos One*, 9(11):111525, 2014.

Keum, Y. S.; Li, Q. X. Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64:588-592, 2004.

Kirk, T. K.; Farrell R. L. Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41:465-501, 1987.

Kittl, R. et al. Molecular cloning of three pyranose dehydrogenase-encoding genes from *Agaricus meleagris* and analysis of their expression by real-time RT-PCR. *Curr Genet* 53:117–127, 2008.

Klingen, I. et al. Effect of Norwegian entomopathogenic fungal isolates against *Otiorynchus sulcatus* larvae at low temperatures and persistence in strawberry rhizospheres. *Biological Control*, 81:1-7, 2015.

- Kodsueb, R. et al. Relationships between terrestrial and freshwater lignicolous fungi. *Fungal Ecology*, 19:155-168, 2016.
- Kögel-Knabner I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(2):139-162, 2002.
- Kohout, P. et al. Clearcutting alters decomposition processes and initiates complex restructuring of fungal communities in soil and tree roots. *The ISME Journal*, 12:692-703, 2018.
- Kourtev, P. S. et al. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecological Society of America. Ecology*, 83(11):3152-3166, 2002.
- Lalor, B. M.; Cookson, W. R.; Murphy, D. V. Comparison of two methods that assess soil community level physiological profiles in a forest ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 39:454–462, 2007.
- Landesman, W. J.; Dighton, J. Shifts in microbial biomass and the bacteria: fungi ratio occur under field conditions within 3 h after rainfall. *Microbial ecology*, 62(1):228-236, 2011.
- Levin, S. A. et al. *The Princeton guide to ecology*. Princeton University Press, 2009. Li, A.H. et al. Lidar aboveground vegetation biomass estimates in shrublands: prediction, uncertainties and application to coarser scales. *Remote Sens.* 9:903, 2017.
- Li, X. et al. Higher absorbed solar radiation partly offset the negative effects of water stress on the photosynthesis of Amazon forests during the 2015 drought. *Environ. Res. Lett.* 13, 044005, 2018.
- Liao, Y. et al. Increase in soil organic carbon by agricultural intensification. *Biogeosciences* 12:1403-1413, 2015.
- Lindenmayer, D. B.; Fischer, J. *Habitat fragmentation and landscape change: an ecological and conservation synthesis*. Island Press, 2013.
- Liu, S. G. et al. Simulating the impacts of disturbances on forest carbon cycling in North America: processes, data, models, and challenges. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* 116, G00K08, 2011.
- Lloret, L. et al., Continuous operation of a fluidized bed reactor for the removal of estrogens by immobilized laccase on Eupergit supports. *Journal of Biotechnology* 162(4):404-406, 2012.
- Lombard, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1):D490-D495, 2013.
- López-Mondéjar, R. et al. Decomposer food web in a deciduous forest shows high share of generalist microorganisms and importance of microbial biomass recycling. *The ISME Journal*, 12:1768-1778, 2018.
- Luis, P. et al. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 36:1025-1036, 2004.

- Machuca, A.; Ferraz, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme Microb Tech* 29:386-391, 2001.
- Majeau, J-A. et al. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101:2331-2350, 2010.
- Mantoani, M. C. et al. Efeitos da invasão por *Tradescantia zebrina* Heynh. sobre regenerantes de plantas arbóreas em um fragmento de floresta estacional semidecidual secundária em Londrina (Pr). *Biotemas*, 26(3):63-70, 2013.
- Martinkova, L. et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere* 149:373-382, 2016.
- Mayer, A. M.; Staples, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6):551-65, 2002.
- Meyling, N. V.; Eilenberg, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1-4):336-341, 2006.
- Mikolasch, A.; Schauer, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:605-624, 2009.
- Minussi, R. C.; Pastore, G. M.; Duran, N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 13:205-216, 2002.
- Mishra, U. et al. Predicting the spatial variation of the soil organic carbon pool at a regional scale. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 74:906–914, 2010.
- Munk, L. et al. Influence of mediators on laccase catalyzed radical formation in lignina. *Enzyme and Microbial Technology*, 116:48-56, 2018.
- Naseem A. et al. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(A):296-313, 2016.
- Niladevi, K. N. et al. Optimization of laccase production from a novel strain—*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research*, 164(1):105-113, 2009.
- Nilsson, R. H. et al. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D259–D264, 2018.
- Nguyen, N. H. et al. Funguild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, Elsevier, 20:241-248, 2016.
- Osono, T. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*, 22, 955–974, 2007.

- Osono, T. Functional diversity of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*.1-14, 2019.
- Patel H. et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech*, 4(1):77-84, 2013.
- Pauvert, C. et al. Bioinformatics matters: The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecology*, 41:23-33, 2019.
- Peltzer, D. A. et al. Effects of biological invasions on forest carbon. *Global Change Biol*. 16:732-746, 2010.
- Peterbauer, C. K.; Volc, J. Pyranose dehydrogenases: biochemical features and perspectives of technological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:837–848, 2010.
- Pointing, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotech.* 57:20-33, 2001.
- Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E. Lignin-degrading enzymes. *Febs J*. 282:1190-1213, 2015.
- Posada, F.; Vega, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Journal Mycologia*, 97(6):1195-1200, 2005.
- Porter, Teresita M.; Hajibabaei, Mehrdad. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*. 27(2):313–338, 2018.
- Pype, R. et al. On the importance of mechanisms analysis in the degradation of micropollutants by laccases: The case of Remazol Brilliant Blue R. *Environmental Technology & Innovation*, 14:100-324, 2019.
- Rescigno, A. et al. Identification and discrimination between some contaminant enzyme activities in commercial preparations of mushroom tyrosinase. *Enzyme Microb Tech*, 41:620-627, 2007.
- Rivera-Hoyos, C. M. et al. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*. 27:67-82, 2013.
- Rodgers, C. J. et al. Laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes. *Trends in Biotechnology*, 28:63-72, 2010.
- Rodolfo, A. M.; Gregorini, M. Z.; Candido-Jr, J. F.; Temponi, L. G. 2007. Levantamento e padrão de distribuição das plantas exóticas na trilha do Poço Preto do Parque Nacional do Iguaçu – PR. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, Caxambu: SBE.
- Romero-Arcos, M. et al. Characterization of Amperometric Laccase Biosensor Based on Carbon Nanotube. *Procedia Technology*, 27:279-281, 2017.
- Sadhasivam, S. et al. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43(7):736-742, 2008.

- Sakai, A. K. et al. The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32:305-32, 2001.
- Salamuni, R. et al. Parque Nacional do Iguaçu, PR - Cataratas de fama mundial. In: Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil. DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), 1:313-321, 2002.
- Sampaio, A. B.; Schimidt, I. B. Espécies Exóticas Invasoras em Unidades de Conservação Federais do Brasil. *Bio Brasil, biodiversidade brasileira revista científica*. 3:2, 2013.
- Santos, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, 35(5):1004-1010, 2012.
- Santos, R. M. Avaliação da adição do pó da casca do coco verde, como material estruturante, a biorremediação de solo contaminado por petróleo. Tese, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- Saparrat, M. C. N. et al. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rígida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1534–1540, 2002.
- Sato, H. et al. A Thirty-Year Survey Reveals That Ecosystem Function of Fungi Predicts Phenology of Mushroom Fruiting. *PLoS ONE* 7(11): e49777, 2012.
- Scharlemann J. P. W. et al. Global soil carbon: understanding and managing the largest terrestrial carbon pool. *Carbon Management*, 5(1):81-91, 2014.
- Schimel, J. P.; Weintraub, M. N. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biol. Biochem.* 35:549–563, 2003.
- Schoch, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *109(16):6241-6246*, 2012.
- Schrijver, A. et al. On the importance of incorporating forest edge deposition for evaluating exceedance of critical pollutant loads. *Applied Vegetation Science*, 10:(2)293-298, 2007.
- Schumacher, M. V. et al. Produção de serapilheira em uma floresta de *araucaria angustifolia* (Bertol) Kuntze no município de Pinhal Grande-RS. *R. Árvore*, 28(1):29-37, 2004.
- Sedmera, P. et al. New biotransformation of some reducing sugars to the corresponding (di)dehydro(glycosyl) aldoses or alduronic acids using fungal pyranose dehydrogenase. *J Mol Catal B*, 41:32–42, 2006.
- Shao, S. et al. Lignin characteristics of *Abies beshanzuensis*, a critically endangered tree species. *Journal of Wood Science*, 54:81-86, 2008.
- Shleev, S. V. et al. A Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*, 86:693-703, 2004.

- Shleev, S., et al. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4):841-847, 2009.
- Simberloff, D. Non-native species do threaten the natural environment?. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 18(6):595-607, 2005.
- Sinsabaugh R. L. et al. Enzymes and Microbial Dynamics of Litter Decomposition. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*, 9:249-265, 2002.
- Snajdr J. et al. Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(2):291-303, 2011.
- Snajdr, J. et al. Dominant trees affect microbial community composition and activity in post-mining afforested soils. *Soil Biology & Biochemistry* 56:105-115, 2013.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG III*. 3ª Ed. 768, 2010.
- Spohn M.; Chodak M. Microbial respiration per unit biomass increases with carbon-to-nutrient ratios in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 81:128-133, 2015.
- Standish R. J. et al. Invasion by a Perennial Herb Increases Decomposition Rate and Alters Nutrient Availability in Warm Temperate Lowland Forest Remnants. *Biological Invasions*, 6:71-81, 2004.
- Staszczak, M. et al. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity. *Journal of Basic Microbiology*, 40:51-63, 2000.
- Sung, G-H. et al. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal–arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2):495-502, 2008.
- Suto, M.; Tomita, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4):305-311, 2001.
- Tan, T. C. et al. The 1.6 Å crystal structure of pyranose dehydrogenase from *Agaricus meleagris* rationalizes substrate specificity and reveals a flavin intermediate. *PLoS One* 8:e53567, 2013.
- Tedersoo L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346:1052-1053, 2014.
- Terrón M.C. et al. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet. Biol.* 41:954-962, 2004.
- Touahar I. E. et al. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 481:90-99, 2014.

- Trivedi, P. et al. Microbial regulation of the soil carbon cycle: Evidence from gene–enzyme relationships. *ISME J.*, 10:2593–2604, 2016.
- Urbanová M. et al. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology & Biochemistry* 1-13, 2015.
- Valentín, L. et al. Loss of diversity in wood-inhabiting fungal communities affects decomposition activity in Norway spruce wood. *Frontiers in Microbiology*, 5:230, 2014.
- Válery, L. et al. In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biological invasions*, Dordrecht, 10(8):1345-1351, 2008.
- Valle, J. S. Produção, Identificação e Caracterização Molecular de Lacases de *Agaricus blazei* Obtidas por Fermentação de Resíduos Agroindustriais. Curitiba, UFPR, 2012.
- Valle, J. S. et al. Effect of different compounds on the induction of laccase production by *Agaricus blazei*. *Genetics and Molecular Research* 14(4):15882-15891, 2015.
- Van Wilgen, B. W. et al. Big returns from small organisms: developing a strategy for the biological control of invasive alien plants in South Africa. *S. Afr. J. Sci.* 96:148-152, 2000.
- Vega, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3):277-279, 2008.
- Věříšková, J.; Baldrian, P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J.* 7:477-486, 2013.
- Wang, K. et al. Fabrication of a novel laccase biosensor based on silica nanoparticles modified with phytic acid for sensitive detection of dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 197:292-299, 2014.
- Wei, Z. et al. The divergence between fungal and bacterial communities in seasonal and spatial variations of wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 628:969-978, 2018.
- Whalley, A. J. S. The xylariaceous way of life. *Mycological Research*, 100:(8):897-922, 1996.
- Whittaker, R. J. et al. Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography*, Hoboken, 28: 453-470, 2001.
- Wong, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157:174-209, 2009.
- Wright, J. E.; Wright, A. M. Checklist of the mycobiota of Iguazú national park (Misiones, Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40(1-2):23-44, 2005.
- Xiao Y. et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2, *Mycologia*, 96:26-35, 2004.
- Xiao J. et al. Remote sensing of the terrestrial carbon cycle: A review of advances over 50

Years. Remote Sensing of Environment 233, 111383, 2019.

Xu, W. et al. Fungal diversity in deep-sea sediments of a hydrothermal vent system in the Southwest Indian Ridge. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 131:16-26, 2018.

Yang, J. et al. TiO₂-CuCNFs based laccase biosensor for enhanced electrocatalysis in hydroquinone detection. Journal of Electroanalytical Chemistry, 766:16-23, 2016.

Yildirim, N. et al. Laccase Enzyme Activity during Growth and Fruiting of *Pleurotus eryngii* Under Solid State Fermentation Medium Containing Agricultural Wastes. Int. J. Pure Appl. Sci. 1:64-71, 2015.

Yuan, Z-L. et al. From pattern to process: species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzuensis*. Fungal Biology, 115(3):197-213, 2011.

Zeng, S.; Qin, X.; Xia, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. Biochemical Engineering Journal, 119:92-100, 2017.

Zenni, R. D.; Ziller, S. R. An overview of invasive plants in Brazil. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, 34(3):431-446, 2011.

Zhang, H. W. et al. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.*, 18:448, 2006.

Zheng, Y. et al. Dryland forest management alters fungal community composition and decouples assembly of root- and soil- associated fungal communities. Soil Biol. Biochem. 109:14-22, 2017.

Ziller, S.R.; Dechoum, M. S. Plantas e vertebrados exóticos invasores em unidades de conservação no Brasil. Bio Brasil, biodiversidade brasileira revista científica. 3:2, 2013.

Zjawiony, J. K. Biologically Active Compounds from *Aphylophorales* (*Polypore*) Fungi. J. Nat. Prod. 67:300-310, 2004.

8 APÊNDICES

8.1 Gêneros totais identificados

| Diversidade de gêneros encontrados | | |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| g__Dictyosporium | g__Dothiorella | g__Protohydnum |
| g__Rhizophagus | g__Colletotrichum | g__Tomentella |
| g__Geastrum | g__Beauveria | g__Saitozyma |
| g__Stereopsis | g__Fusarium | g__Gymnopus |
| g__Acremonium | g__Fusariella | g__Vishniacozyma |
| g__Plectosphaerella | g__Nectria | g__Subulicystidium |
| g__Bionectria | g__Gliocladiopsis | g__Marasmius |
| g__Myrmecridium | g__Albifimbria | g__Papiliotrema |
| g__Volutella | g__Campylospora | g__Rigidoporus |
| g__Beltraniopsis | g__Ijuhya | g__Leucopaxillus |
| g__Fusidium | g__Hydropisphaera | g__Ganoderma |
| g__Idriella | g__Clonostachys | g__Phlebia |
| g__Nigrospora | g__Brevistachys | g__Pluteus |
| g__Virgaria | g__Paramicrothyrium | g__Psathyrella |
| g__Bartalinia | g__Phialophora | g__Calvatia |
| g__Porobeltraniella | g__Gibberella | g__Coprinellus |
| g__Beltraniella | g__Aschersonia | g__Panaeolus |
| g__Castanediella | g__Calonectria | g__Lepista |
| g__Neopestalotiopsis | g__Paramyrothecium | g__Singerocybe |
| g__Pestalotiopsis | g__Nectriopsis | g__Conocybe |
| g__Acrocalymma | g__Terfezia | g__Radulomyces |
| g__Cladosporium | g__Phillipsia | g__Entoloma |
| g__Cycasicola | g__Diaporthe | g__Thanatephorus |
| g__Montagnula | g__Nigrograna | g__Ceratobasidium |
| g__Pseudopithomyces | g__Biatrispora | g__Anthopsis |
| g__Roussoella | g__Torula | g__Lepiota |
| g__Periconia | g__Paradictyoarthrinium | g__Lepiota |
| g__Letendraea | g__Alternaria | g__Hydropus |
| g__Helminthosporium | g__Curvularia | g__Crepidotus |
| g__Lentithecium | g__Bipolaris | g__Simocybe |
| g__Coniothyrium | g__Candida | g__Pyrenochaetopsis |
| g__Pyrenochaeta | g__Wiesneriomyces | g__Dictyocheirospora |
| g__Setophoma | g__Pseudocercospora | g__Pseudorobillarda |
| g__Edenia | g__Lophiostoma | g__Chaetospermum |
| g__Setophaeosphaeria | g__Angustimassarina | g__Efibulobasidium |
| g__Didymella | g__Acrostalagmus | g__Mingxiaea |
| g__Phoma | g__Triscelophorus | g__Epicoccum |
| g__Stagonosporopsis | g__Hannaella | g__Rhizophlyctis |
| g__Lasiodiplodia | g__Ceriporia | g__Mycena |
| g__Cistella | | |

Figura 12. Gêneros identificados, das amostras de serapilheira nativa e invadida por *Tradescantia zebrina*, do PNI após 100 dias de incubação em sistema de *litter bag*.