



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIENCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**EFEITO DE BORDA E INVASÃO VEGETAL NA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS  
DE SOLO**

**GABRIEL ALEXANDER COLMENAREZ  
PENA**

Foz do Iguaçu  
2022

**EFEITO DE BORDA E INVASÃO VEGETAL NA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS DE  
SOLO**

**GABRIEL ALEXANDER COLMENAREZ PENA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao 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 Bacharel Biotecnologia.

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

Coorientador: Prof. Wagner Antonio Chiba de Castro

Foz do Iguaçu  
2022

GABRIEL ALEXANDER COLMENAREZ PENA

**EFEITO DE BORDA E IMPACTO DA INVASÃO VEGETAL NA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS DE SOLO**

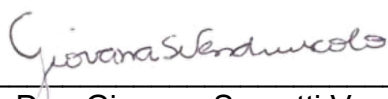
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA



---

Prof. Dra. Giovana Secretti Vendruscolo  
UNILA



---

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas  
UNILA

Foz do Iguaçu, 17 de janeiro de 2023.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Gabriel Alexander Colmenarez Peña

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
(.....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Efeito de borda e invasão vegetal na biodiversidade de fungos de solo

Nome do orientador(a): Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Data da Defesa: 20/12/2022

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):


a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 17 de janeiro de 2023



Assinatura do Responsável

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha vó por me fazer a pessoa que sou hoje, me criar desde pequeno e querer sempre o melhor para mim.

A minha orientadora Rafaella Costa Bonugli, que foi a primeira professora da biotecnologia com a que tive contato, ainda lembro da primeira conversa durante a recepção quando era calouro, foi um momento muito inspirador para continuar o caminho da biotecnologia, as disciplinas dela sempre foram as que me permitiam ver que eu estava tomando o caminho correto enquanto a minha vida profissional, obrigado por toda a sua dedicação para o curso de biotecnologia, obrigado por confiar em mim para o TCC e obrigado por todo o ensino que me fez melhor profissional e pessoa.

Ao meu co-orientador Wagner Antonio Chiba de Castro, você me permitiu aprender e enxergar muitas coisas sobre mim, forças e fraquezas, agradeço a paciência com a bioinformática e a análise de dados que não é uma coisa fácil, mas você fez que eu não enxergasse como algo difícil e sim como um desafio.

Ao meu irmão por ser meu pilar, quando estive confuso e não acreditei em mim mesmo.

A todos meus amigos próximos que acompanharam o desenvolvimento do TCC, a motivação que vocês me deram quando mais precisei, não está escrita.

*But when the stars are the only things we share  
Will you be there?*  
**Benjamin Francis Leftwich**

PEÑA, Gabriel Alexander Colmenarez. **EFEITO DE BORDA E INVASÃO VEGETAL NA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS DE SOLO**. 2022. 48 p. *Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.*

## RESUMO

A Mata Atlântica é um dos principais *hotspots* de biodiversidade do mundo. Hoje em dia, só restam 10 % do seu bioma original, o qual se encontra fragmentado na forma de remanescentes florestais. O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é o principal remanescente da Mata Atlântica de interior no Brasil. Esta Unidade de Conservação (UC) é afetada não somente por fatores inerentes à fragmentos florestais, como efeito de borda, mas também por invasão de plantas não nativas. Apesar do papel estruturante no ecossistema, degradando a matéria orgânica e na ciclagem do carbono, pouco se sabe sobre a riqueza e composição das comunidades fúngicas de solo do PNI e, principalmente, sobre os efeitos das alterações ambientais sobre essas comunidades. Para avaliar a o efeito de borda e a invasão vegetal por *Tradescantia zebrina* (Comelinaceae) nas comunidades fúngicas de solo do PNI, foram coletadas amostras de solo de quatro tratamentos com diferentes graus de perturbação explorando influências da borda florestal e da invasão vegetal, em conjunto e em separado. As amostras foram sequenciadas com a amplificação da região ITS e analisadas por bioinformática quanto a diversidade taxonômica e funcional. *Mortierella* foi o gênero com maior presença nos diferentes tratamentos florestais. Não houve diferenças significativas na diversidade e função das comunidades fúngicas de solo entre os diferentes tratamentos, com grande presença de guildas patogênicas oportunistas. Inicialmente, identificamos que a diversidade de fungos do PNI é tão grande que as diferenças entre os tratamentos não superam as diferenças encontradas entre os diferentes pontos de coleta dentro dos tratamentos. Assim, o número de amostragem deve ser ampliado visando compreender melhor os efeitos na comunidade. Por outro lado, o estudo permitiu à amplificação do conhecimento da diversidade desse grupo no PNI, avaliada ineditamente por métodos independentes de cultivo.

**Palavras-chave:** Metabarcoding, ITS, *Tradescantia zebrina*, *Mortierella*, Parque Nacional do Iguaçu, ASV.

PEÑA, Gabriel Alexander Colmenarez. **EDGE EFFECT AND PLANT INVASION ON BIODIVERSITY OF FUNGAL SOIL**. 2022. 48 p. Undergraduate thesis (Bachelor's Degree in Biotechnology) – Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020

## ABSTRACT

The Atlantic Forest is one of the main biodiversity hotspots in the world. Nowadays, only 10 % of its original biome remains, which is fragmented in the form of forest remnants. The Iguaçu National Park (PNI) is the main remnant of the Atlantic Forest in the interior of Brazil. This Conservation Unit (CU) is affected by factors inherent to forest fragments, such as the edge effect and by the invasion of non-native plants. Despite the structuring role in the ecosystem, degrading organic matter and carbon cycling, little is known about the richness and composition of fungal communities in the PNI soil and, mainly, about the effects of environmental changes on these communities. To evaluate the effect of edge and plant invasion by *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae) in the soil fungal communities of the PNI, soil samples were collected from four treatments with different degrees of disturbance in the park, exploring influences of forest edge and plant invasion, together and separately. The samples were sequenced with amplification of the ITS 86-F and ITS 4R region, testimonies by bioinformatics regarding taxonomic and functional diversity. *Mortierella* was the genus with the highest presence in the different forest treatments. There were no significant differences in the diversity index and function of soil fungal communities between the different treatments, with a large presence of opportunistic pathogenic guilds. Perhaps the diversity of fungi in the PNI is so great that the differences between treatments do not exceed the differences found between different collection points within treatments. Thus, the number of samples should be increased to better understand the effect of diversity in different treatments. On the other hand, the study allowed the amplification of the knowledge of the diversity of this group in the PNI, unprecedentedly evaluated by independent methods of cultivation.

Keywords: Metabarcoding, ITS, *Tradescantia zebrina*, *Mortierella*, National Park of Iguaçu, ASV.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Esquema de coleta das amostras de solo do Parque Nacional Iguaçu..20
- Figura 2. Diagrama de Venn da distribuição dos ASVs entre os pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI)..25
- Figura 3. Abundância relativa dos Filos (a) e classes (b) das amostras de solo do Parque Nacional do Iguaçu nos pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda invadida (BI)..27
- Figura 4. Abundância relativa taxonômica dos gêneros das amostras de solo do Parque Nacional do Iguaçu nos pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI)..28
- Figura 5. Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu entre os pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI)..33
- Figura 6. Abundância das guildas assignadas das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu entre os pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI)..35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice de diversidade de espécies das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu.31

Tabela 2. Análise multivariada não paramétrica (PERMANOVA) e do efeito da localização (borda ou interior), Invasão (área invadida e não invadida) e as interações entre os efeitos na estruturação das comunidade de fungos da Mata Atlântica32

Tabela 3. Dados das sequencias de entrada, filtradas, fita Foward sem ruido e após filtro de quimera.47

Tabela 4. Abundância relativa das guildas funcionais assignadas das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu dos pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI).47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASVs	Amplicon Sequence Variant
BI	Borda Invadida
BN	Borda Nativa
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNAr	DNA ribossomal
eDNA	Enviromental Deoxyribonucleic Acid
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza
II	Interior Invadido
IN	Interior Nativo
nMDS	Non-metric multidimensional scaling
OTU	Operational taxonomic unit
PNI	Parque Nacional do Iguaçu
UC	Unidades de Conservação
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>21</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>26</b>
4.1 ANÁLISES DE METABARCODING DE FUNGOS NAS ÁREAS INVADIDAS E ÁREAS NÃO INVADIDAS NA REGIÃO DA BORDA E INTERIOR DO PARQUE NACIONAL IGUAÇU .....	26
4.2 AGRUPAMENTO E TAXONOMIA DOS ASVS .....	26
4.3 DIVERSIDADE E RIQUEZA DOS FUNGOS NAS AREAS DE BORDA E INTERIOR, INVADIDAS E NÃO INVADIDAS .....	32
4.4 GUILDAS FUNCIONAIS.....	35
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da Floresta Estacional Atlântica brasileira ser considerada um dos cinco principais *hotspots* da diversidade biológica (MYERS et al., 2000), encontra-se constantemente ameaçada. Somente no estado do Paraná, originalmente formado por 98 % de floresta, hoje restam 10 % do bioma original (GRACIOTIM, 2014) composto geralmente por remanescentes florestais inseridos em áreas urbanas sob a forma de Unidades de Conservação (UC) (MIELKE et al., 2015). As UC são espaços especiais para a manutenção do meio natural que surgiram em resposta às mudanças do uso e cobertura da terra, bem como ao desmatamento, conservação da biodiversidade, manutenção do patrimônio genético e proteção de ecossistemas naturais (HASSLER, 2005).

O maior remanescente de Floresta Atlântica de interior do Brasil é o Parque Nacional do Iguaçu (PNI), integrando um dos mais importantes contínuos biológicos do Centro-Sul da América do Sul (ICMBIO, 2018). O PNI abriga 158 espécies de mamíferos, 390 de aves, 48 de répteis, 12 de anfíbios, 175 de peixes e pelo menos 800 de invertebrados. Foram identificados até o momento, 761 angiospermas, 16 pteridófitas e 464 espécies de fitoplâncton. Quanto à comunidade de fungos do PNI, a literatura é escassa, apesar de seu status de UC, a biodiversidade pode ser ameaçada por fatores como a invasão de espécies exóticas e o efeito de borda (ICMBIO, 2018).

No processo de invasão biológica, ocorre a introdução de espécies não nativas em habitats e ecossistemas que antes não faziam parte (VITOUSEK, 1996). Plantas invasoras são táxons vegetais cuja presença se deve à introdução intencional ou acidental como resultado da atividade humana (RICHARDSON et al., 2000). Espécies invasoras representam uma das maiores ameaças à biodiversidade (BURGIEL & MUIR, 2010). Mesmo em lugares que foram preservados como áreas naturais, constata-se que as espécies nativas estão continuamente perdendo terreno para invasores exóticos (FINE, 2002), que podem alterar a composição do ecossistema por meio de interações complexas relacionadas a tamanho da planta, produção de serapilheira e retenção, fluxos, reciclagem e elevação dos níveis de nitrogênio no ecossistema (CURRIE et al., 2014) e mudança do microclima do solo (RENATE ZILLER, 2001). Embora uma planta invasora seja erradicada, a vegetação pode não voltar a sua composição original (VILÀ M, & GIMENO I, 2007).

O gênero *Tradescantia*, pertencente à família Commelinaceae, inclui

90 espécies de plantas (PELLEGRINI, 2017), geralmente com raízes fibrosas ou tuberosas, das quais diversas espécies são consideradas invasoras (SÁNCHEZ DE LORENZO, 2004). *Tradescantia zebrina heyneh. ex bosse* é uma planta comumente cultivada nos trópicos e regiões temperadas. É nativa do México e da América Central, distribuída em muitas áreas tropicais e subtropicais em ambos os hemisférios (FADEN, 2008), é considerada uma forte competidora, e pode afetar a diversidade de espécies em fragmentos florestais, multiplica-se rapidamente em qualquer época do ano, estabelecendo grande biomassa em áreas invadidas (MANTOANI et al., 2013). Embora, não se tenham estudos claros de como a *T. zebrina* pode afetar o bioma terrestre, entre os efeitos de plantas exóticas invasoras estão a alterações em propriedades ecológicas essenciais, ciclagem de nutrientes e produtividade vegetal, cadeias tróficas, estrutura, dominância, distribuição e funções de espécies num dado ecossistema, distribuição de biomassa, densidade de espécies, porte da vegetação, acúmulo de serrapilheira e de biomassa (RENATE ZILLER, 2001). Ela é conhecida por causar danos no bioma em diversos países no mundo (MANTOANI et al., 2013), incluindo o Brasil (ZENNI & ZILLER, 2011), estando presente no Parque Nacional do Iguaçu (RODOLFO et al., 2008) com uma maior taxa de crescimento na região da borda da floresta (CHIBA DE CASTRO et al., 2022).

A borda da floresta é a área sobre a qual os componentes bióticos e abióticos deste habitat são influenciados pelo ambiente matriz (CROCKATT, 2012). Um dos principais motivos para estudar essas regiões de transição, é que elas podem ser sentinelas sensíveis da mudança ambiental (FONSECA, 2008). “Efeito de borda” é um termo usado para descrever diferenças e interações de fatores ecológicos ou atributos sistemáticos em zonas de dois ou vários ecossistemas diferentes que pode levar à mudança em componentes e atividades (TING & SHAOLIN, 2008). As consequências do efeito de borda estão ligadas ao problema generalizado da fragmentação do habitat, especialmente decorrente da separação de uma paisagem em vários usos da terra, criando manchas de habitat pequenas e disjuntas, que pode danificar o habitat de diversas espécies. Tem sido demonstrado que pequenas manchas de habitat resultantes da fragmentação, não fornecem recursos e condições para muitas espécies vegetais e estão associadas ao aumento da predação (FONSECA, 2008). O efeito de borda, especialmente no microclima, provavelmente influencia os fungos no nível individual e, portanto, da comunidade (CROCKATT, 2012), pois bordas da floresta são funcionalmente diferentes do interior em termos de

microambiente (CAMARGO, 1995). Maiores níveis de radiação solar, temperatura, umidade, déficit de pressão de vapor, umidade (MATLACK, 1993), deposição de nutrientes e acidificação do solo (DE SCHRIYER et al., 2007) são fatores que podem afetar comunidades microbianas e fúngicas. A isso, se junta a influência que as plantas invasoras têm nas condições do solo e, por consequência, na comunidade fúngica (KOURTEV, 2002).

Os fungos são um dos componentes mais importantes dos ecossistemas florestais, são a maior biomassa viva responsável pela decomposição orgânica do solo da floresta, sendo as principais fontes de enzimas necessárias para a decomposição vegetal (STEINER et al., 2002). A capacidade dos fungos de degradar a matéria orgânica se deve ao seu sistema enzimático. Existem dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares, sendo o sistema hidrolítico produtor de hidrolases responsáveis pela degradação de polissacarídeos, e um sistema ligninolítico oxidativo e extracelular único, que degrada a lignina e abre os anéis fenólicos (SÁNCHEZ, 2009).

Dentre os fungos de solo, os fungos micorrizos participam da associação mutualística do tipo simbiótico com raízes de algumas plantas. Essa associação é fator-chave na tolerância do estresse hídrico para a planta hospedeira e participa ativamente da absorção de nutrientes pela maioria das plantas terrestres (MOHAN et al., 2014). Já os fungos endofíticos podem viver no interior de uma planta por pelo menos parte da sua vida, sem aparentemente causar danos à planta hospedeira e atuam no controle biológico, por meio da produção de metabólitos secundários potenciais com função antimicrobiana, protegendo as plantas de infecções por patógenos (SEGARA, 2019).

Ainda hoje, a relação ecossistêmica dos fungos no solo não é bem estudada. É necessário compreender os fatores que influenciam a distribuição e a função dos fungos nas florestas para uma modelagem precisa do ciclo global do carbono e para um conhecimento completo das suas funções no ecossistema florestal (CROCKATT, 2012). Vários estudos têm mostrado que as mudanças nas condições climáticas podem afetar comunidades fúngicas do solo direta ou indiretamente causando mudanças na composição e função das comunidades (CASTAÑO, 2019). Portanto, se faz necessário estudar os efeitos e interações de impactos ambientais que influenciam diretamente as condições do solo sob a comunidade fúngica de solo.

O método mais comum para estudo de microrganismos desde o início

da microbiologia foi a cultura *in vitro* e o isolamento em culturas puras (SARHAN et al., 2019), mas diferentes microrganismos prosperam em diferentes ambientes e têm uma variedade de necessidades de crescimento, como nutrientes, pH, condições osmóticas e temperatura (BASU et al., 2015). Com o progresso da seletividade dos meios de cultivo foi possível sua aplicação para identificação, estudo de propriedades, testes de metabólitos secundários e determinação da composição genética de microrganismos (SARHAN et al., 2019). Esses métodos baseados em cultura possuem a vantagem de quantificar a abundância absoluta de células dos microrganismos vivos cultiváveis (ZAPKA et al., 2017), porém no caso dos fungos a identificação baseada em características morfológicas é muitas vezes complicada, difícil e demorada devido às muitas condições a serem (PAUVERT, et al., 2019).

Uma grande dificuldade dos meios de cultura é a incapacidade de mimetizar 100% o ambiente natural dos microrganismos, e é comum sua aplicação sem levar em consideração a origem do microrganismo (SARHAN et al., 2019). Estudos de DNA ambiental revelam a existência de muitos microrganismos, incluindo fungos, que não crescem usando as técnicas de cultura atualmente disponíveis (BEGEROW, 2010), assim o acesso que temos ao mundo microbiológico é limitado, com menos de 1% da biodiversidade microbiológica podendo ser cultivada (RAPPÉ, 2003), fenômeno conhecido como “a grande anomalia da contagem de placas” descoberto por Staley e Konopka quando observaram diferenças entre o número de células de ambientes naturais que formam colônias viáveis em meio de ágar e os números observados por microscopia (STALEY, & KONOPKA, 1985). As razões pelas quais tantas espécies não crescem em laboratório ainda não são bem entendidas (EPSTEIN, 2013), mas isso deixou em evidência a necessidade de métodos alternativos a cultura tradicional que permitam estudar as comunidades microbianas que não são capazes de crescer em placas no laboratório.

Após a conclusão do projeto genoma humano houve o surgimento das ciências ômicas, com a finalidade de analisar os componentes dos organismos vivos na sua totalidade, (EVANS, 2000) permitindo seus estudos além do isolamento em placas, assim os métodos independentes de cultura permitiram identificar uma grande proporção da diversidade microbiológica que não era possível estudar anteriormente (HODKINSON & GRICE, 2015). Ferramentas moleculares independente de cultivo concentram-se no sequenciamento de ácidos nucleicos, fornecendo informações genéticas, filogenéticas e funcionais sobre organismos ou comunidades específicas,



chamado de sequenciamento de DNA genômico ou metagenômico respectivamente (JANSSON et al., 2012), usando sequências de genes de rRNA como ferramentas para identificação de espécies (FRANK et al., 2002), a metatranscriptômica permitem o estudo sobre o estado de expressão dos genes e o papel funcional dos genes ou organismos no ambiente investigado pela extração do RNA do ambiente microbiano (URICH, et al., 2008), a metaproteômica detecta proteínas expressas e, assim, verificam funções microbianas in situ em um determinado habitat de uma comunidade de microrganismos (RAM et al., 2005). Abordagens que combinam a aplicação de várias ciências ômicas são necessárias para vincular diversidade genômica com a atividade e função dos microrganismos no ecossistema (MORRIS et al., 2010).

O sequenciamento de nova geração provocou uma mudança radical na análise de fungos de solo (FRAC et al., 2018), permitindo a identificação até o nível de espécie (SCHOCH, et al., 2012). Porém, mesmo com todos os avanços tecnológicos, as NGS apresentam vários desafios no estudo da biodiversidade fúngica, pois nem sempre as análises moleculares são suficientes para identificação até nível de espécies, especialmente em fungos (WATANABE et al., 2011). Outros fatores que influenciam na identificação dos fungos são os primers usados na amplificação, a plataforma de sequenciamento, o método usado para montar as leituras, o método de agrupamento de sequências e os filtros posteriormente aplicados. Em adição, as sequências obtidas podem ser interpretadas usando unidades taxonômicas operacionais (operational taxonomic unit - OTU) ou variantes de sequência única (ASVs) (PAUVERT et al., 2019), o que gera um desafio para os pesquisadores na hora de escolher as metodologias para estudo dos fungos.

Dentro da metagenômica está o metabarcoding (NAVIA, 2018), metabarcoding refere-se à caracterização de sequências do DNA visando “códigos de barras” específicos do genoma microbiano (ORGIAZZI et al., 2015), códigos de barras de DNA são sequências padronizadas que identificam espécies de todos os reinos eucarióticos usando primers aplicáveis ao grupo taxonômico (SCHOCH et al., 2012). As sequências da subunidade menor de rDNA evoluem de forma relativamente lenta e são úteis para estudar organismos distantes, enquanto os genes de rRNA mitocondrial evoluem mais rapidamente e podem ser úteis no nível ordinal ou familiar (WHITE et al., 1990). O trabalho inicial de identificação filogenética e molecular em fungos começou com genes ribossômicos nucleares com três componentes principais do operón ribossômico fúngico: a subunidade grande (large sub-unity - LSU,

variadamente referida como 26S ou 28S); a subunidade pequena (small sub Unity - SSU, ou 18S), e o Espaçador Transcrito Interno (Internal Transcribed Spacer- ITS), compreendendo duas seções (ITS1, ITS2) (SEIFERT, 2009). A região ITS foi selecionada como o código de barra universal para fungos (SCHOCH et al., 2012).

Embora os estudos de comunidades microbianas tenham aumentado exponencialmente devido aos avanços nas tecnologias de sequenciamento, a grande quantidade de dados gerados permanece difícil de analisar e interpretar (JOOS et al., 2020). Para analisar os dados genômicos as sequências de DNA microbiano podem ser agrupadas OTUS por meio de um limiar de similaridade (KNIGHT et al., 2018), OTU é uma coleção de sequências 16S de rRNA que têm uma certa porcentagem de divergência de sequência, no caso do nível de espécie não superior a 3% (GILLILLAND et al., 2012). Embora OTUs possam discriminar sequências que diferem por causa de erros de sequenciamento e amplificação, não pode explicar pequenas variações biológicas (JOOS et al., 2020). Recentemente, foram desenvolvidos novos métodos que resolvem variantes de sequência única (ASVs) a partir de dados de amplicón pela inferência das sequências biológicas na amostra antes da introdução de erros de amplificação e sequenciamento, distinguindo variantes de sequência que diferem em apenas um nucleotídeo (CALLAHAN et al., 2017). ASVs são exatas, o que significa que são sequências reais claramente delineadas e comparáveis, facilitando a meta-análises e possibilitando a combinação de dados entre projetos (TIPTON et al., 2021). As melhorias na reutilização, reprodutibilidade e abrangência das ASVs frente as OTUs são suficientemente relevantes para considerar as ASVs sobre OTUs como unidade padrão de análise e relatório de genes marcadores (CALLAHAN et al., 2017).

Diante desses aspectos levantamos as seguintes problematizações que serviram de balizas para a realização de uma pesquisa exploratória sobre o tema: Será que o efeito de borda e a invasão da espécie exótica *T. zebrina* estão afetando as comunidades fúngicas do solo do Parque Nacional Iguaçu? Caso aconteça, elas têm efeito sinérgico?

Este estudo tem como objetivo avaliar a comunidade fúngica em áreas da floresta estacional invadidas e não invadidas por *T. zebrina* na região de borda e interior da floresta usando metabarcoding da região ITS do DNAr e análise funcional a partir do script FUNGuild.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da invasão de *T. zebrina* e da borda florestal sobre as comunidades fúngicas do Parque Nacional do Iguaçu.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Extrair o DNA ambiental (eDNA) das amostras de solo do Parque Nacional Do Iguaçu;
2. Sequenciar a região ITS do eDNA extraído;
3. Realizar a bioinformática dos dados genômicos utilizando ASVs como unidade padrão de análise para genes marcadores de fungo;
4. Avaliar a diversidade taxonômica e a composição da comunidade fúngica em relação ao efeito da invasão da planta *T. zebrina* na borda e interior;
5. Analisar a diversidade funcional usando FUNGuild em relação ao efeito da invasão da planta *T. zebrina* na borda e interior.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta

A coleta foi realizada no Parque Nacional do Iguaçu (25°05', 25°41' S; 53°40' e 54°38' W) em outubro de 2021. Foram coletadas 12 amostras de solo, em triplicatas, de quatro tratamentos que representam diferentes impactos ambientais:

- 1) Borda florestal com invasão (BI): solo coletado na borda da floresta com presença de *T. zebrina*;
- 2) Borda florestal sem invasão (BN): solo coletado na borda da floresta sem a presença de *T. zebrina*;
- 3) Interior florestal com invasão (II): solo coletado sob invasão de *T. zebrina*, na mancha de invasão mais distante da borda;
- 4) Interior florestal sem invasão (IN): solo coletado no interior da floresta, ao menos 100m de qualquer borda e sem presença de *T. zebrina*, (Figura 1).

Para a coleta, inicialmente realizou-se uma limpeza superficial retirando galhos, folhas, e quaisquer material orgânico da superfície e cavou-se 10 cm, removendo o horizonte O do solo. A partir disso, foi coletado uma amostra de solo em cada ponto, com suas respectivas sub-réplicas. As amostras foram acondicionadas em caixa térmica até o laboratório. No laboratório as réplicas foram homogeneizadas para a composição de uma amostra composta de cada ponto e armazenadas a -20 °C.

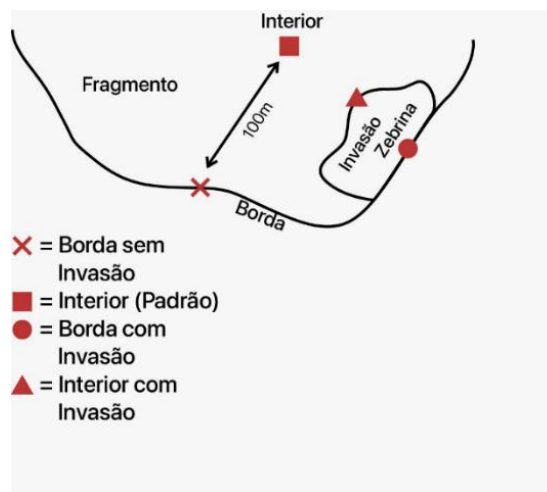


Figura 1. Esquema de coleta das amostras de solo do Parque Nacional Iguaçu. Fonte: Autoria própria.

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

### 3.2.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado 0,250 g de cada amostra composta (solo com e sem invasora na área da borda e interior da floresta). 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 preparações de DNA foram avaliadas e quantificadas pela medida das absorbâncias a 260 nm, 280 nm, 320 nm e 230 nm no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Em seguida, o DNA extraído, purificado, alíquotado e armazenado a -80 °C.

### 3.2.2 Sequenciamento das amostras

O sequenciamento 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)

### 3.2.3 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 oligonucleotídeo forward e 0,3 µM de oligonucleotídeo reverse, 1 µL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20 µL. Para a amplificação foram utilizados os primers descritos: ITS\_860-F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGAATCATCGAATCTTTGAA-3') e ITS\_4R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), conforme Bail, 2020.

O programa de amplificação consistiu na 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.

### **3.2.4 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: 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).

### **3.2.5 Purificação e Quantificação da Biblioteca**

As bibliotecas geradas foram submetidas às etapas de purificação utilizando bead magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de primers. Após se realizou a quantificação pela metodologia de PCR em Tempo Real utilizando Kit KAPAKK4824 (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 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 Bioinformática**

Todo o processamento das amostras na etapa de bioinformática foi realizado no desenvolvimento do TCC II. A inspeção de qualidade e processamento das sequências 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, 2013), específico para leituras do amplicon ITS, seguindo as recomendações e parâmetros sugeridos por Pauvert et al., 2019, para a correção de erros.

A função "Filter And Trim" foi usada para filtragem de qualidade com opções que incluíam remoção de primers, bases ambíguas (N), sequências com menos de 50 pb e um erro esperado (MaxEE) maior que 2. Após a filtragem de qualidade, um modelo de erro para sequenciamento foi construído com a função "learnErrors" e as leituras diretas foram desreplicadas com a função "derep" para recolher sequências repetidas. Essas sequências foram removidas para obter um conjunto de ASVs e filtradas para detecção de quimeras com a função "removeBimeraDenovo". Por fim, para contabilizar possíveis contaminações e sangramento de índice, uma tabela com as contagens de ASVs e um conjunto de sequências sem ruído foi exportada. ASVs com baixa frequência (menos de 9) foram excluídos das contagens de tabela e sequências sem ruído.

Após a obtenção da tabela de frequência das variantes de sequência única (ASVs) das sequências processadas, estas foram classificadas e anotadas em base a referência taxonômica UNITE, a qual é exclusiva para fungos (Nilsson et al., 2019). 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.

Para realizar a classificação de sequenciamento e atribuição taxonômica, uma abordagem de classificação de aprendizado de máquina implementada no Qiime2 foi aplicada. Sequências classificadas com taxonomia atribuída e contagens de tabela de ASV, foram analisadas e plotadas com o software R, usando os pacotes Phyloseq (MCMURDIE & HOLMES, 2013) e ggplot2 (Wickham, 2016).

### **3.4 Análise funcional das Guildas**

Os táxons identificados foram caracterizados e classificados em guildas funcionais usando o banco de dados FUNGuild (acessado em novembro de 2022) que classifica os ASVs de acordo com a função que pode exercer no ambiente. Foram utilizadas as ASVs classificadas com nível de confiança "Possível", "Provável" e "Altamente Provável". As guildas funcionais das demais ASVs classificadas como "Não atribuídas" ou "NULL", foram colocadas na categoria "NA". Os táxons

classificados como saprotróficos de solo, saprotróficos de serapilheira ou saprotróficos de madeira foram agrupados em uma categoria única de saprotróficos de solo-planta. Esses táxons que foram classificados com segurança em mais de uma guilda foram classificados na classe >1 Guilda, exceto no caso de táxons que foram classificados com segurança em quatro ou mais guildas, incluindo guildas de patógenos e saprotróficos; estes foram classificados na classe de Espécies Patogênicas Oportunistas.

### 3.5 Métodos Estatísticos

Para análise da diversidade  $\alpha$  das comunidades fúngicas, que se refere ao número e abundância relativa das espécies dentro de uma comunidade (Whittaker et al., 2001), usando índices de diversidade de Shannon ( $H'$ ) e o índice de dominância de Simpson ( $C$ ) (Brower & Zar, 1984). Para verificar se houve diferenças significativas na diversidade  $\beta$  (que avalia a dissimilaridade entre as comunidades, baseada na composição de espécies) 1) entre as áreas da invasão dentro das réplicas espaciais, 2) e entre as áreas da borda e interior da floresta e 3) entre a interrelação das amostras coletadas sob invasão ou não e borda ou não, simultaneamente, foi realizada uma two-way PERMANOVA (Anderson, 2001) usando a função 'adonis2' do pacote 'vegan' (Oksanen et al., 2019), onde 'treatment' e 'invaded' foram os dois fatores que representam a borda e invasão respectivamente. Para representar visualmente a variação na distribuição espacial dos pontos segundo sua composição da comunidade fúngica, foi realizado o escalonamento multidimensional não métrico (nMDS). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2022).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 ANÁLISES DE METABARCODING DE FUNGOS NAS ÁREAS INVADIDAS E ÁREAS NÃO INVADIDAS NA REGIÃO DA BORDA E INTERIOR DO PARQUE NACIONAL IGUAÇU

Um total de 468.267 transcritos foram gerados para as 12 amostras. Após processamento de qualidade (filtragem, *denoising* e remoção de quimera), foi obtido um conjunto final com 241.515 de sequências para a fita forward, as quais foram agrupadas em 1930 ASVs, após descartar as ASVs com uma ocorrência menor a 10, 758 ASVs foram mantidos. A partir da junção das réplicas dos pontos, um diagrama de Venn foi construído e cada ponto apresentou no mínimo 93 ASVs e no máximo 116 ASVs únicos. Um total de 173 ASVs foram comuns nos quatro pontos, (Figura 2).

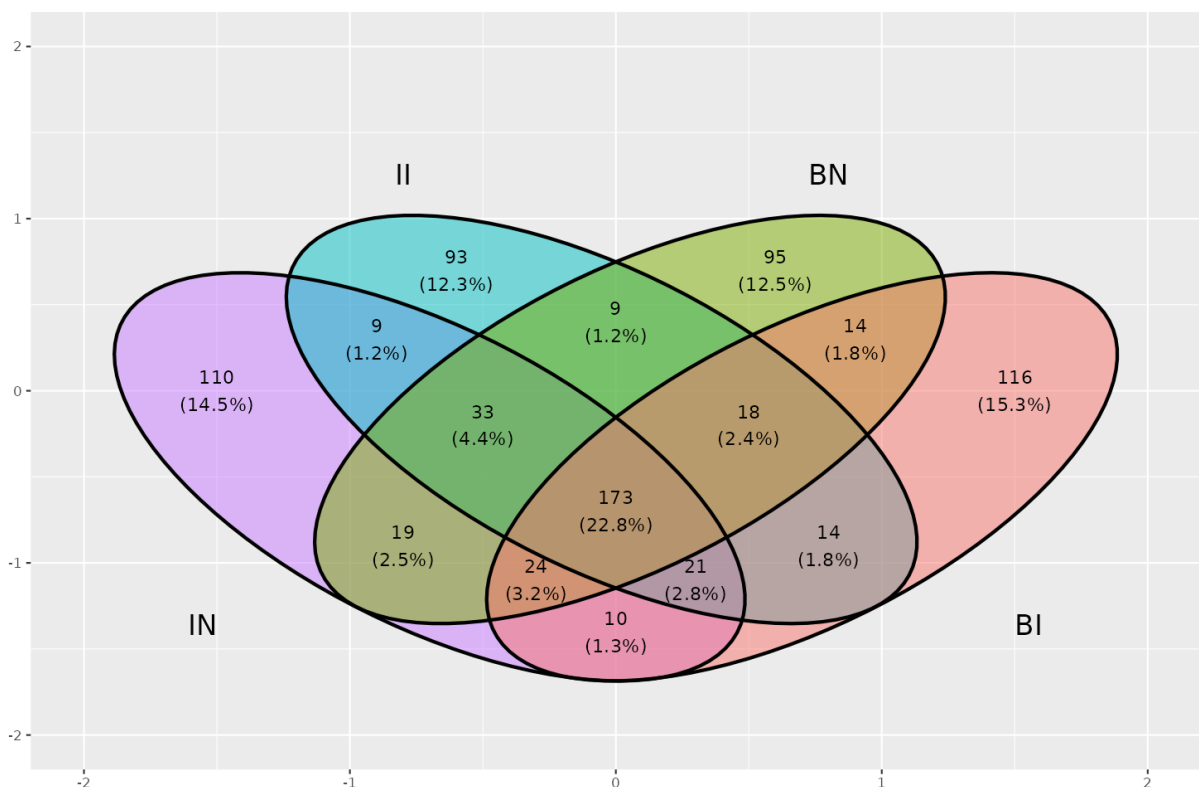


Figura 2. Diagrama de Venn da distribuição dos ASVs entre os pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI). Fonte: Autoria própria.

### 4.2 AGRUPAMENTO E TAXONOMIA DOS ASVS

Dentre os 758 ASVs foram identificados quatro filos (Figura 3),

Mortierellomycota foi o filo mais abundante para as regiões de Borda Nativa, Interior Invadido e Interior Nativo (36,25 % BI, 54,54 % BN, 72,91 % II, 45,00 % IN), já o filo Ascomycota foi o mais presente na região de Borda Invadida (55,86 % BI 35,13 % BN, 24,07 % II, 34,89 % IN), os outros dois filios que apareceram em menor porcentagem foram o Basidiomycota (07,74 % BI, 0,010 % BN, 28,73 % II, 19,90 % IN) e Mucoromycota (00,14 % BI, 00,45 % BN, 00,14 % II, 00,20 % IN).

A nível de classe, das 14 identificadas, Mortierellomycetes, Sordariomycetes, Dothideomycetes e Agaricomycetes foram as mais abundantes com até 97 %, enquanto as outras nove classes representavam entre 2 e 7 % das classes totais na amostra (Figura 3).

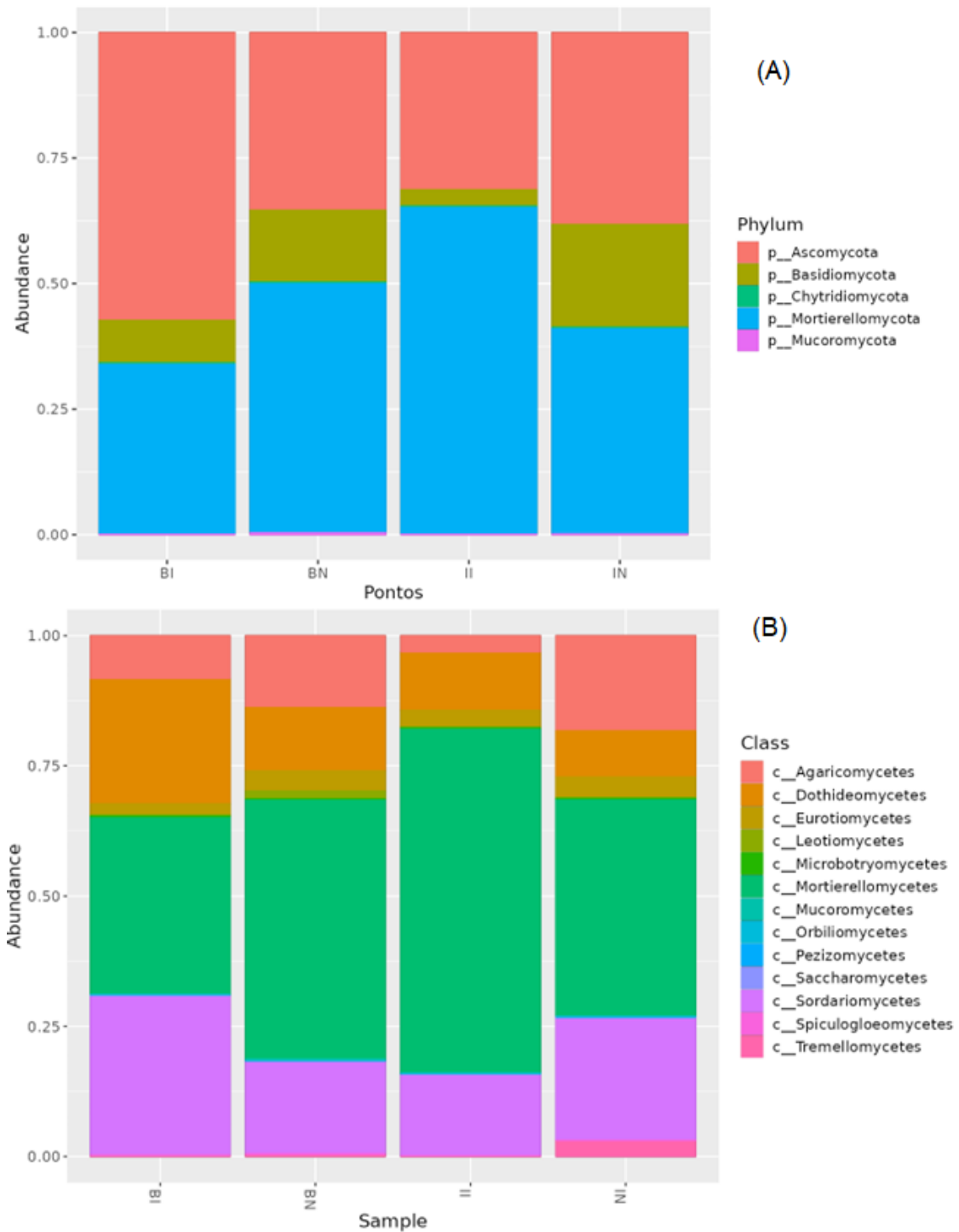


Figura 3. Abundância relativa dos Filos (a) e classes (b) das amostras de solo do Parque Nacional do Iguaçu nos pontos Interior Nativo (IN), Interior Invasido (II), Borda Nativa (BN) e Borda invadida (BI).  
Fonte: Autoria Própria

Foram identificados 166 gêneros entre os quatro pontos, *Mortierella* foi o mais abundante em todos os pontos, com abundância variando entre 36,35 % e 72,73 % (Figura 4). Para o Interior Nativo o segundo gênero mais abundante foi *Trichoderma* com 12,63 % e o terceiro foi *Geastrum*, que foi ausente nos pontos Borda Nativa, Interior invadido e apenas teve presença de 0,20 % na Borda Invadida. A Borda Invadida apresentou um perfil diferenciado com *Cladosporium* e *Fusarium* como o segundo e terceiro entre os gêneros mais abundante com 15,77 % e 15,20%, respectivamente. Já para Borda Nativa e Interior Invadido não houve outros gêneros com abundância superior a 10 %, além do *Mortierella*. Não foi possível identificar a nível de gênero 176 ASVs, provavelmente pela ausência da espécie na base de dados da região estudada (ITS). A figura 4 mostra a frequência relativa taxonômica de gêneros.

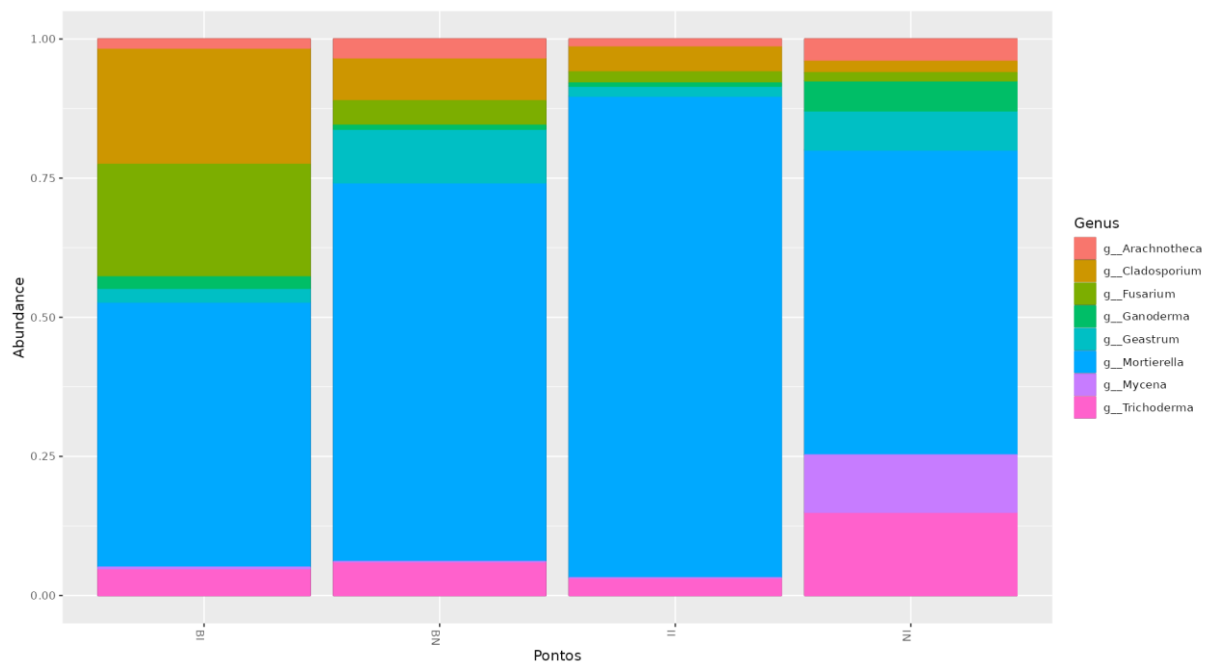


Figura 4. Abundância relativa taxonômica dos gêneros das amostras de solo do Parque Nacional do Iguaçu nos pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI). Fonte: Autoria própria.

O grupo mais impactante do trabalho é *Mortierella*, este grupo pertence à família Mortierellaceae, da ordem Mortierellales, (LIAO, 2021). A maioria das espécies de *Mortierella* tem micélio fino e, na cultura de ágar, muitas vezes mostra uma série característica de zonas em forma de leque e os esporângios são sustentados por esporangióforos ramificados ou não ramificados (WEBSTER & WEBER, 2007). São

fungos comumente isolado de solos (CHESTERS & PEBERDY, 1965) e espécies saprófitas de *Mortierella* são frequentemente isoladas entre florestas e comunidades fúngicas de madeira morta (OZIMEKE & HANAKA, 2021), silagem, feno, (Webster & Weber, 2007), pellets fecais e exoesqueletos de artrópodes abundantes em materiais em decomposição (DEACON, 2006). Este grupo de fungos possui um ciclo sexual característico que incorpora zigospóros e feromônios específicos bem como um ciclo assexuado de esporulação vegetativo (STREEKSTRA, 2010). *Mortierella* pode funcionar como um saprófito que impulsiona o ciclo do carbono do solo, o metabolismo lipídico e a degradação da quitina (ZHANG et al, 2020).

Ruiz Gómez et al. (2019) obteve similitudes nos resultados do estudo das comunidades fúngicas do solo em montados degradados (florestas de azinheiras, sobreiros, carvalhos ou castanheiros, de equilíbrio muito delicado e que subsistem apenas no Mediterrâneo, na Argélia, em Marrocos e sobretudo no Sul da Península Ibérica), sendo *Mortierella* o gênero de maior abundância nesse estudo. Este gênero pode ser considerado um indicador do nível de resiliência dos ecossistemas, pois é um gênero difundido e proeminente membros de comunidades de solo, possui a capacidade de solubilizar fósforo, bem como estabelecer simbiose com raízes de plantas (FRÖHLICH-NOWOISKY et al, 2015).

Na área nativa, destaque-se a presença de *Geastrum*, que pertence à família Geastraceae, tem sido registrado em florestas decíduas úmidas, florestas semi-perenes, bosques e plantações de café (VERMA, 2018), e no Brasil se tem trabalhos com registro em diversos bioma, incluindo o Semiárido, a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica (CABRAL et al., 2017), e em solo coberto por serapilheira (CROUS et al. 2018). Atualmente, há cerca de 60 espécies registradas no Brasil, e entre 100 e 120 no mundo (Assis, 2019). O gênero *Geastrum* pode ser saprófito, realizar conexões micorrízicas (VERMA, 2018) ou briófitos facultativos (TEDERSOO et al., 2010) na ausência de outros competidores micorrízicos (Sousa, 2015).

Na área de invasão é possível identificar (Figura 4) que a invasão diminuiu expressivamente três gêneros: *Geastrum*, *Trichoderma* e *Mycena*. *Trichoderma* pertence à classe Sordariomycetes do filo Ascomycota (BENÍTEZ et al., 2004), são fungos de vida livre altamente interativos em ambientes radiculares, solo e foliares (MACHADO, 2012), esse gênero de fungos tem principalmente reprodução assexuada, mas podem ser encontrados na fase sexuada em materiais lenhosos e herbáceos, porém muitas das suas cepas não tem estágio sexual conhecido

(HARMAN, et al., 2014). Facilmente encontrado em regiões de clima temperado (MEYER et al., 2019), eles são produtores de proteínas extracelulares e são mais conhecidos por sua capacidade de produzir enzimas que degradam a celulose e a quitina (HARMAN, et al., 2014). *Trichoderma* frequentemente é encontrado no solo e crescendo em madeira, casca, outros fungos e inúmeros outros substratos, demonstrando seu alto potencial oportunista e sua adaptabilidade a várias condições ecológicas (DRUZHININA et al., 2011), eles são aplicados como agentes de controle biológico devido à sua alta capacidade reprodutiva, capacidade de sobreviver em condições muito desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, forte agressividade contra fungos fitopatogênicos e eficiência na promoção do crescimento vegetal e mecanismos de defesa (BENÍTEZ et al., 2004).

O gênero *Mycena* está entre os mais ricos em espécies do Agaricales, filo Basidiomycota, com mais de 500 descritas (THOEN et al., 2020). Quase todos os membros do gênero são saprotróficos e desempenham um papel vital na decomposição da serapilheira, especialmente em florestas e bosques (UZUN et al., 2017), mas tem estudos que sugerem sua ocorrência como endófitos de raízes (GRELET et al., 2017) e fungo micorriza (ZHANG et al., 2012). Vários táxons são generalistas, sem substrato específico ou demandas de recursos, outros são altamente particulares sobre as condições de habitat e substrato (TYLER, 1991). Neste grupo a reprodução sexuada é o sistema reprodutivo dominante, enquanto a reprodução assexuada é um fenômeno raro (MÖHLMANN, 2011)

Na borda, a invasão diminui a dominância de *Mortierella* (Figura 4) com a introdução expressiva de *Cladoporium* e *Fusarium*. A presença de *Fusarium*, de acordo com a literatura, parece não ter importante impacto ecológico em relação ao balanço de energia, ciclagem de nutrientes e interação microbiana (Mandeeel, 2006). Cavalcanti et al. (2020) relata que as espécies de *Fusarium* têm uma distribuição ampla e são principalmente patógenos do solo de cultura agrícola, mas também podem endófitos, enquanto para *Cladosporium* algumas espécies são saprófitas e amplamente distribuídas, outras podem habitar nichos ecológicos particulares e limitados (Bensch et al., 2012), o que em muitos casos pode indicar capacidade de colonização generalizada. Contudo, como nosso estudo avalia a presença de invasão, a entrada desses grupos generalistas na borda invadida, pode indicar possíveis impactos ecológicos já que a invasão diminuiu um grupo, e a vegetação permitiu a colonização de outros mais generalistas, não há garantia que

não houve mudanças no solo, na ciclagem de nutrientes e em outros fatores ecológicos.

Embora tenham se detectado vários ASVs exclusivos (figura 1), dando a impressão da existência de nichos ecológicos criados pela localização (borda ou interior) ou pela invasão, não há relação aparente a nível de gênero entre presença desses gêneros exclusivos e o efeito de borda ou a invasão, pois a abundância deles na sua maioria chega a ser menor que 1% do total dos gêneros.

Em adição, a ausência de identificação taxonômica de 176 AVS a nível de gênero mostra como a diversidade fúngica é desconhecida e ressalta a importância dos trabalhos de levantamento taxonômico.

#### 4.3 DIVERSIDADE E RIQUEZA DOS FUNGOS NAS AREAS DE BORDA E INTERIOR, INVADIDAS E NÃO INVADIDAS

A avaliação da diversidade  $\alpha$  utilizando o índice de Shannon, considerando somente o local (borda e interior), resultou em índices maiores na região da borda do que no interior (Tabela 2). Esses resultados se repetiram com o índice Simpson, que favorece a maior ocorrência de espécies raras.

Tabela 1. Índice de diversidade de espécies das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu.

Tratamento	Amostra	Observado	Shannon	Simpson
Local	Borda	214,5	3,810	0,945
	Interior	196	3,257	0,874
Invasão	Invadido	195	3,532	0,898
	Nativa	215	3,535	0,921
Local e inva- são	Borda invadida	201	3,902	0,957
	Borda não inva- dida	228	3,717	0,933
são	Interior invadido	189	3,161	0,840
	Interior Nativo	202	3,533	0,909

Fonte: Autoria própria.

Na análise considerando apenas a invasão, esta condição não resultou em diferenças entre as áreas nativas e a invadidas, contrário de Bail (2021), onde a serrapilheira invadida apresentou maior diversidade comparada com a nativa. Provavelmente, essa variação se deve ao tipo de substrato, uma vez que em Bail

(2021), a serapilheira permitiu a colonização diferenciada e de possivelmente novos grupos funcionais. Avaliando os parâmetros em conjuntos (local e invasão), vemos que as regiões de maior valor da diversidade foram da borda, sendo a de maior valor, a borda invadida.

Para a diversidade beta, o teste two-way PERMANOVA não mostrou diferença significativa na composição da comunidade fúngica do solo entre a invasão ou não, borda ou não, e os tratamentos conjuntamente (Tabela 2). A Figura 5 ilustra a ausência de variação.

Tabela 2. Análise multivariada não paramétrica (PERMANOVA) e do efeito de borda (borda ou interior), Invasão (área invadida e não invadida) e as interações entre os efeitos na estruturação das comunidades de fungos da Mata Atlântica.

Fatores	Df	SumOfSqs	R2	F value	P value
Treatment	1	0,432828770	0,139	1,619	
		7			0,0687
Invaded	1	0,279199092	0,089	1,0447	
		3			0,3691
Treatment:Invaded	1	0,258280065	0,083	0,966	
		2			0,4548
Residual	8	0,213801864	0,687	-	-
		2			

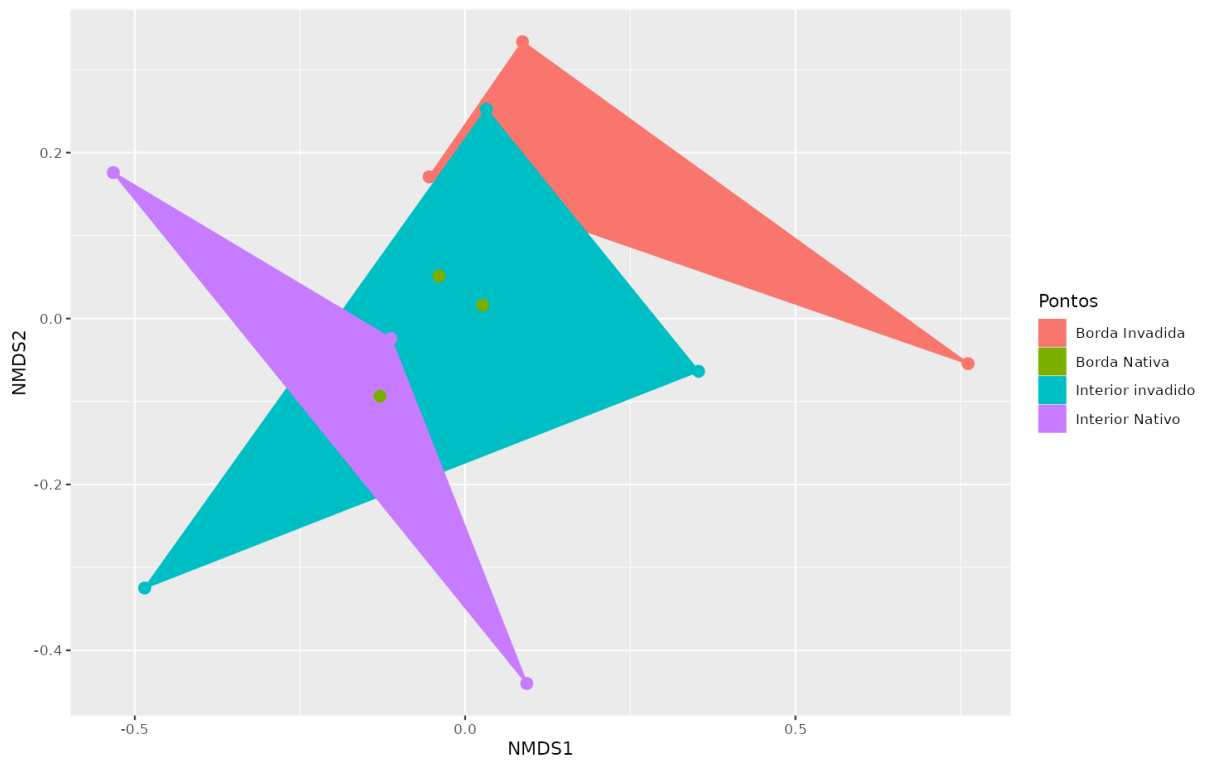
Fonte: Autoria própria.

\* Df: Grau de liberdade; SumOfSqs: soma das distâncias ao quadrado (euclidianas) de cada ponto ao ponto médio; R2: Porcentagem da variação da variável dependente explicada pelo modelo; F value: Variação entre a média das amostras; P value: Nível de significância.

Tanto a borda, quanto a invasão e a interação entre estes fatores não apresenta influência sob a comunidade de fungos. Estatisticamente, isso se deve a diferença entre as réplicas, que foi igual o maior que a diferença com outros tratamentos. Conforme a Figura 5, a distância entre os pontos de um mesmo tratamento chega a ser maior que a distância entre um tratamento e outro, o que sugere uma heterogeneidade da diversidade entre pontos de coleta que pode ser maior que entre tratamentos. Essa diferença espacial é também reportada em Oliveira (2020), onde a serrapilheira invadida do PNI não apresentou mudanças na diversidade dos fungos lignocelulolíticos comparada a nativa.



a



b

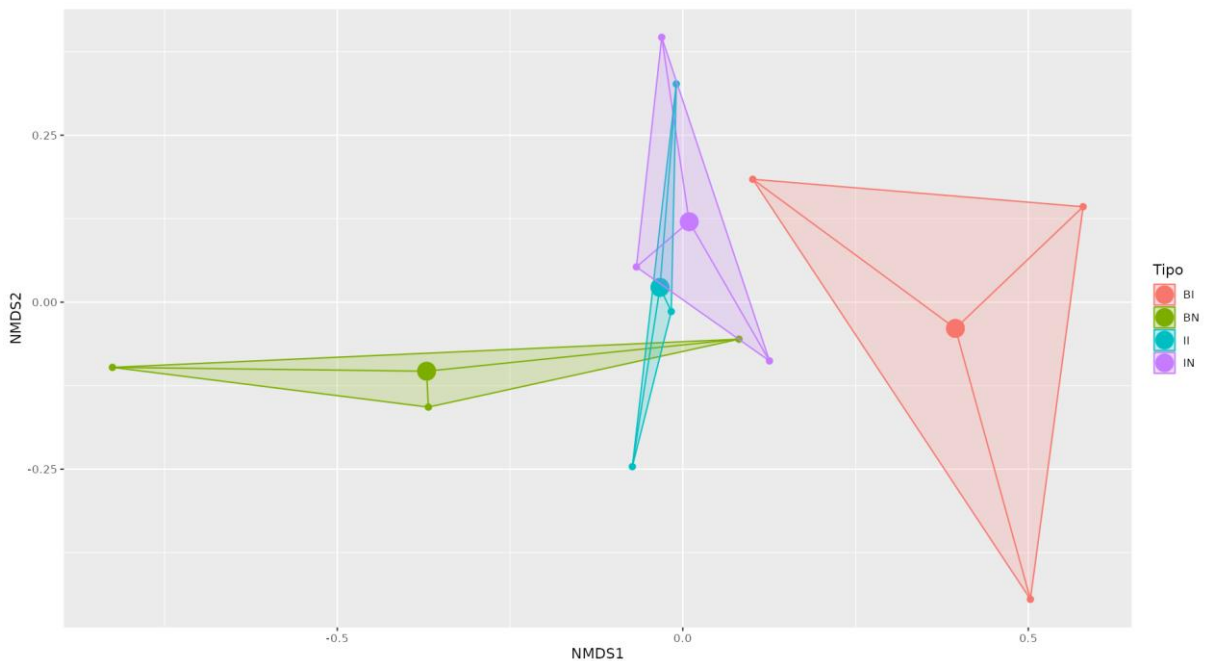


Figura 5. Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) (a) e teste de homogeneidade de dispersões multivariadas (PERMDISP) das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu entre os pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI). Fonte: Autoria própria.

Outros estudos prévios demonstraram como as comunidades fúngicas

do solo podem variar em uma escala regional. Liu et al. (2022) apresenta alta variedade da diversidade alfa e beta entre os sítios estudados de savana temperada, Bahram et al. (2012) reportou que riqueza de espécies diminuiu com o aumento da altitude no Irã, e Pellissier et al. (2014) sugeriu que diferentes linhagens de fungos exibem separação de nicho ambiental, como pode ser observado no nosso estudo. Na Mata Atlântica, Pacchioni (2010) reportou maior diversidade de fungos nas amostras do solo que apresentaram maior presença de plantas superiores. Já Moreia (2020) mostrou maior similaridade e diversidade entre os pontos no seu estudo, contrário do que acontece no nosso, onde as amostras foram bastante heterogêneas. Essa variação pode ser explicada pelas diferenças geográficas entre as coletas e as características dos locais, mesmo sendo ambos realizados no mesmo fragmento de floresta estacional.

Estudos demonstram que o efeito de borda tem redução da biomassa nas regiões mais próximas da borda na serrapilheira (DOS SANTOS, R. S., BARRETO-GARCIA, P. A. B., & SCORIZA, 2018). Bail (2012), confirma que a presença da *T. zebrina* pode influenciar na comunidade fúngica local da serrapilheira e alterar na sua velocidade de decomposição. Efeitos bióticos como esses podem influenciar de maneira direta ou indireta as comunidades fúngicas, porém é difícil medir o impacto devido à natureza heterogênea do ambiente. Assim, heterogeneidade pode parecer um problema para entender as comunidades de solo altamente ricas em espécies, porém abordagens espacialmente estruturadas podem nos ajudar na compreensão dos fatores responsáveis pela diversidade de organismos que vivem nos solos (ETTEMA & WARDLE, 2002).

#### **4.4 GUILDAS FUNCIONAIS**

Dos ASVs classificados, as guildas ecológicas mas abundantes foram a de patógenos oportunistas em todos os pontos (superior a 58 %). Aqueles que não tiveram atribuição funcional foram classificados como NA (Não Atribuídos), estando entre 9 e 18 %. As guildas com mais de uma função estão entre 3 e 10 %. Por fim, os saprófitos indefinidos entre 5 e 12 %. As oito restantes guildas representaram entre o 3 e 7 % das guildas totais nos quatro pontos.

É possível observar maior predominância de saprófitos indefinidos nas regiões sem invasão, especialmente na borda, e uma diminuição de patógenos de planta nesses pontos (Figura 6).

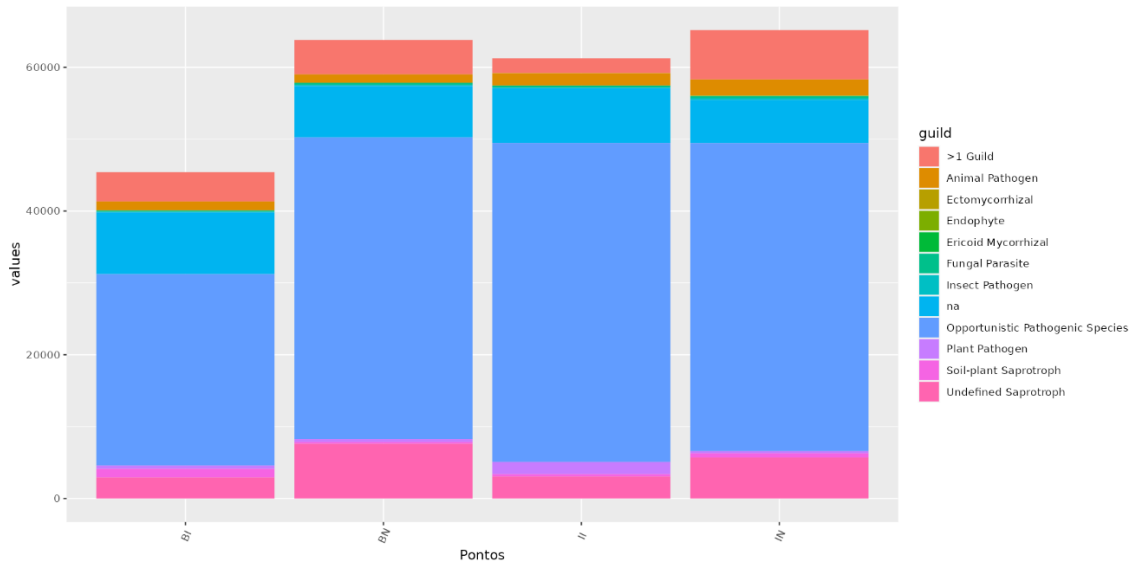


Figura 6. Abundância das guildas assignadas das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu entre os pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI). Fonte: Autoria própria.

A guilda de Patógenos Oportunistas foi a mais abundantes em todos os pontos, esses fungos podem ter o potencial de ocupar nichos complexos ou múltiplos, alguns com capacidade de atuar como patógenos facultativos ou saprotróficos em solos (PHILLIPS, 2019). Nessa guilda encontramos os fungos do gênero *Mortierella*, que tem a característica ser recrutado por plantas como um agente antifúngico, que também pode atuar como um patógeno oportunista em plantas doentes (JI et al., 2021), além disso, espécies invasoras produzem maiores quantidades de serapilheira facilmente decomposta, o que ajuda a explicar nossas observações de maior presença dos outros gêneros competidores em solos associados invasores.

Ausência de diferença na diversidade e função dos tratamentos florestais podem ser explicadas pela heterogeneidade dos pontos avaliados, pois a floresta estacional já é um ambiente bastante heterogêneo (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000), assim como as comunidades fúngicas da serapilheira da Mata Atlântica possuem alta diversidade taxonômica e funcional (SOUZA, 2010) no solo também temos esse padrão. A disponibilidade de recursos em habitats invadidos pode sustentar altos níveis de diversidade (ANTHONY; FREY & STINSON, 2017) e contrário a premissa de Crockatt (2012), não foram encontrados efeitos de borda em nenhum nível taxonômico dos fungos, as condições provavelmente se mantiveram ótimas nas comunidades fúngicas, mesmo com as diferenças nos ambientes, pois

elas conseguem acompanhar as mudanças ambientais de efeito de borda e a invasão.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise de metabarcoding, foi possível identificar os principais táxons presentes nos pontos coletados no Parque Nacional do Iguaçu e realizar a atribuição funcional através do FUNGuild. Com um número reduzido de conhecimento microbiológico do parque, o levantamento da biodiversidade fúngica da região é um importante resultado do trabalho.

Em relação a condição de invasão associada a borda e interior, a diversidade beta mostrou que não há diferenças significativas na composição das comunidades fúngicas entre os pontos. Provavelmente a diversidade de fungos de solo é tão grande que elas são capazes de adaptar-se aos ambientes criados pela invasão da *T. zebrina* e o efeito de borda.

A nível taxonômico e funcional, a invasão e o efeito de borda tiveram pouco impacto nas comunidades fúngicas. Porém, quando a invasão esteve em conjunto com o efeito de borda, observamos uma diminuição dos grupos *Mortierella* e *Mycena* junto com o aumento expressivos dos gêneros *Cladosporium* e *Fusarium*. A mudança na vegetação relacionada com o efeito de borda e a presença da planta invasora pode estar desempenhando um papel crítico nesse desbalanço, havendo um possível efeito sinérgico. Ademais, a análise sob diferentes escalas taxonômicas e funcionais, podem revelar influências destes impactos ambientais sob as comunidades estudadas.

A guilda mais abundante foi a de patógenos oportunistas o que se encaixa com a abundância do *Mortierella*, que foi o gênero de maior presença no estudo, porém, pela característica de flexibilidade enquanto a função, não conhecemos o papel que os fungos estão desempenhando nos ambientes, e se há mudança com a presença da *T. zebrina* ou do efeito de borda. Estudos de transcriptômica e proteômica ajudariam a entender a interação entre o fungo e o meio ambiente e confirmar ou não a ausência de impacto.

## REFERÊNCIAS

- Assis, N. (2019). **Geastrum hyalinum (Basidiomycota, Geastraceae), a new species from Brazilian Southern Amazon.** *Studies in Fungi*, 4(1), 90–96. <https://doi.org/10.5943/sif/4/1/11>
- Anthony, M. A; Frey, S. D; Stinson, K. A. (2017). **Fungal community homogenization, shift in dominant trophic guild, and appearance of novel taxa with biotic invasion.** *Ecosphere*, 8(9). <https://doi.org/10.1002/ecs2.1951>
- Bahram, M., Pölme, S; Kõljalg, U; Zarre, S; Tedersoo, L. (2012). **Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran.** *New Phytologist*, 193(2), 465–473. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03927.x>
- Bail, J.; Gomez, J. A. M; de Oliveira Vaz, G. C; de Castro, W. A. C; Bonugli-Santos, R. C. (2022). **Structural and functional changes in the fungal community of plant detritus in an invaded Atlantic Forest.** *BMC Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02431-8>
- Baldrian, Petr; Banin, Ehud (2016). **Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics.** *FEMS Microbiology Reviews*, (), fuw040.
- BARBOSA, J. A. A.; ALVES, B. C. F.; AGUIAR, J. O. (2020). **Ambiente e memórias acerca da caça em áreas protegidas da Floresta Atlântica.** *Novos Cadernos NAEA*. V. 23, N. 3, jan. 2021. ISSN 2179-7536. Disponível em: <<https://periodicos.ufpa.br/index.php/ncn/article/view/8101>>. Acesso em: jul. 2022.
- Basu, S; Bose, C; Ojha, N; Das, N; Das, J; Pal, M; Khurana, S. (2015). **Evolution of bacterial and fungal growth media.** In *Bioinformation* (Vol. 11, Issue 4).
- Begerow, D; Nilsson, H; Unterseher, M; Maier, W. (2010). **Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures.** In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 87, Issue 1, pp. 99–108). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>
- Benítez, T; Rincón, A. M; Limón, M. C; Codon, A. C. (2004). **Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains.** *International microbiology*, 7(4), 249-260.
- Bensch, K; Braun, U; Groenewald, J. Z; Crous, P. W. (2012). **The genus cladosporium.** *Studies in Mycology*, 72, 1–401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Biondi, D., Henrique Pedrosa-Macedo, J., & Florestal, E. (2007). **Plantas invasoras encontradas na área urbana de Curitiba.**
- Brower, J. E; Zar, J. H. (1984) **Field & laboratory methods for general ecology.** 2 ed., Dubuque: Wm. Brown Co.
- Burgiel, S.W; Muir, A. A. (2010) **Invasive species, climate change and ecosystem-**

**based adaptation: Addressing multiple drivers of global change. Global invasive species programme (GISP).** Disponível em: <[https://www.gisp.org/whatsnew/docs/Climate\\_Change\\_ReportA4.pdf](https://www.gisp.org/whatsnew/docs/Climate_Change_ReportA4.pdf)>. Acessado em dezembro 2022.

Cabral, T. S; Sousa, J. O; Silva, B. D. B; Martín, M. P; Clement, C. R; Baseia, I. G. (2017). **A remarkable new species of Geastrum with an elongated branched stipe.** *Mycoscience*, 58(5), 344–350.

Callahan, B. J; McMurdie, P. J; Holmes, S. P. (2017). **Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis.** *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. doi:10.1038/ismej.2017.119

Callahan, B. J; McMurdie, P. J; Rosen, M. J; Han, A. W; Johnson, A. J. A; Holmes, S. P. (2016). **DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Cavalcanti, A. D; da Silva Santos, A. C; de Oliveira Ferro, L; Bezerra, J. D. P; Souza-Motta, C. M; Magalhães, O. M. C. (2020). **Fusarium massalimae sp. nov. (F. lateritium species complex) occurs endophytically in leaves of Handroanthus chrysotrichus.** *Mycological Progress*, 19(10), 1133–1142.

Castaño, C; Lindahl, B. D., Alday, J. G; Hagenbo, A; Martínez de Aragón, J; Parladé, J; Pera, J; & Bonet, J. A. (2018). **Soil microclimate changes affect soil fungal communities in a Mediterranean pine forest.** *New Phytologist*, 220(4), 1211–1221. <https://doi.org/10.1111/nph.15205>

Chiba de Castro W. A, Luz, R. C, Peres, C. K. **Seasonality and forest edge as drivers of Tradescantia zebrina Hort. ex Bosse invasion in the Atlantic Forest.** *Brazilian Journal of Biology*. 2022, v. 82

Camargo, J. L; & Kapos, V. (1995). **Complex edge effects on soil moisture and microclimate in central Amazonian forest.** *Journal of Tropical Ecology*, 11(2), 205–221.

Chesters, C. G. C; Peberdy, J. F. (1965). **Nutritional Factors in Relation to Growth and Fat Synthesis in Mortierella vinacea.** In *J. gen. Microbiol* (Vol. 41).

Currie, W. S; Goldberg, D. E; Martina, J; Wildova, R., Farrer, E., & Elgersma, K. J. (2014). **Emergence of nutrient-cycling feedbacks related to plant size and invasion success in a wetland community-ecosystem model.** *Ecological Modelling*, 282, 69–82.

Meyer, M. C., Mazaro, S. M., & da Silva, J. C. (2019). **Trichoderma: uso na agricultura.** *Embrapa Soja-Livro científico (Alice)*.

Crous, P. W; Luangsa-Ard, J. J; Wingfield, M. J; Carnegie, A. J; Hernández-Restrepo, M; Lombard, L; Roux, J; Barreto, R. W; Baseia, I. G; Cano-Lira, J. F; Martín, M. P; Morozova, O. v; Stchigel, A. M; Summerell, B. A; Brandrud, T. E; Dima, B., García, D; Giraldo, A., Guarro, J; Groenewald, J. Z. (2018). **Fungal planet description sheets: 785– 867.** *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41, 239–251.

Crockatt, M. E. (2012). **Are there edge effects on forest fungi and if so do they matter?** In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 26, Issues 2–3, pp. 94–101).

De Schrijver; R. Devlaeminck; J. Mertens; K. Wuyts; M. Hermy; K. Verheyen (2007). **On the importance of incorporating forest edge deposition for evaluating exceedance of critical pollutant loads.** , *10(2)*, 293–298.

Deacon, J.W. (2006) **Fungal Biology**, 4th edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

dos Santos, R. S; Barreto-Garcia, P. A. B; Scoriza, R. N. (2018). **Fungos micorrízicos arbusculares e serapilheira como indicadores do efeito de borda em fragmento de floresta estacional.** In *Ciência Florestal* (Vol. 28, Issue 1, pp. 324–335). Universidade Federal de Santa Maria. <https://doi.org/10.5902/1980509831603>

Druzhinina, I. S; Seidl-Seiboth, V; Herrera-Estrella, A; Horwitz, B. A., Kenerley, C. M; Monte, E; Mukherjee, P. K., Zeilinger, S; Grigoriev, I. v; Kubicek, C. P. (2011). **Trichoderma: The genomics of opportunistic success.** In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 749–759). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>

Epstein, S. (2013). **The phenomenon of microbial uncultivability.** *Current Opinion in Microbiology*. 16(5), 636–642.

ETTEMA, Christien H.; WARDLE, David A. Spatial soil ecology. **Trends in ecology & evolution**, v. 17, n. 4, p. 177-183, 2002.

EVANS, G. “**Designer science and the “omic”**”. revolution. *Nat Biotechnol* 18, 127 (2000). <https://doi.org/10.1038/72480>

Frac, M., Hannula, S. E., Belka, M., Jędryczka, M. (2018). **Fungal biodiversity and their role in soil health.** In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Media S.A.

Fröhlich-Nowoisky, J; Hill, T. C. J; Pummer, B. G; Yordanova, P; Franc, G. D; Pöschl, U. (2015). **Ice nucleation activity in the widespread soil fungus *Mortierella alpina*.** *Biogeosciences*, 12(4), 1057–1071. <https://doi.org/10.5194/bg-12-1057-2015>

Glenn R. Matlack (1993). **Microenvironment variation within and among forest edge sites in the eastern United States.** , *66(3)*, 0–194

Gessner, M. O; Swan, C. M; Dang, C. K; McKie, B. G; Bardgett, R. D; Wall, D. H; Hättenschwiler, S. (2010). **Diversity meets decomposition.** In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 25, Issue 6, pp. 372–380).

Gilliland, M. G; Young, V. B; Huffnagle, G. B. (2012). **Gastrointestinal Microbial Ecology with Perspectives on Health and Disease.** *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 1119–1134. doi:10.1016/b978-0-12-382026-6.00040-3



Graciotim, C. (2014). **Fruit-feeding butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) in Atlantic Forests of Iguassu National Park, Parana, Brazil**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

Grelet, G. A; Ba, R; Goeke, D. F; Houliston, G. J; Taylor, A. F. S; Durall, D. M. (2017). **A plant growth-promoting symbiosis between *Mycena galopus* and *Vaccinium corymbosum* seedlings**. *Mycorrhiza*, 27(8), 831–839.

HASSLER, M. L (2006). **A importância das unidades de conservação no Brasil**. *Sociedade & Natureza*, V. 17, N. 33,. Disponível em: <<https://seer.ufu.br/index.php/sociedadnatureza/article/view/9204>>. Acesso em: julho 2022.

Harman, G. E; Howell, C. R; Viterbo, A., Chet, I; Lorito, M. (2004). **Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts**. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 43–56).

Hodkinson, B. P; & Grice, E. A. (2015). **Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research**. *Advances in Wound Care*, 4(1), 50–58.

ICMBio (2018). **Plano de manejo do Parque Nacional do Iguaçu**

Jansson, J. K., Neufeld, J. D., Moran, M. A., & Gilbert, J. A. (2012). **Omics for understanding microbial functional dynamics**. In *Environmental Microbiology* (Vol. 14, Issue 1, pp. 1–3).

Ji, L., Tian, L., Nasir, F., Chang, J., Chang, C., Zhang, J., Li, X., & Tian, C. (2021). **Impacts of replanting American ginseng on fungal assembly and abundance in response to disease outbreaks**. *Archives of Microbiology*, 203(5), 2157–2170. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02196-8>

Joos, L; Beirinckx, S; Haegeman, A., Debode, J; Vandecasteele, B; Baeyen, S; De Tender, C. (2020). **Daring to be differential: metabarcoding analysis of soil and plant-related microbial communities using amplicon sequence variants and operational taxonomical units**. *BMC Genomics*, 21(1). doi:10.1186/s12864-020-07126-4

Knight, R; Vrbanc, A; Taylor, B. C; Aksenov, A; Callewaert, C; Debelius, J; Dorrestein, P. C. (2018). **Best practices for analysing microbiomes**. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 410–422. doi:10.1038/s41579-018-0029-9

Liu, D., Liu, G., Chen, L., Han, W., & Wang, D. (2022). Plant diversity is coupled with soil fungal diversity in a natural temperate steppe of northeastern China. *Soil Ecology Letters*, 4(4), 454–469. <https://doi.org/10.1007/s42832-021-0113-3>

Faden, R.B. **The author and typification of *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae)**. *Kew Bull* 63, 679–680 (2008).

Fine, P. V. A. (2002). **The invasibility of tropical forests by exotic plants.** *Journal of Tropical Ecology*, 18(5), 687–705.

Fonseca, M.S. (2008). **Encyclopedia of Ecology || Edge Effect.** 1207–1211.

Frank, D. N; Spiegelman, G. B; Davis, W; Wagner, E; Lyons, E; Pace, N. R. (2003). **Culture-independent molecular analysis of microbial constituents of the healthy human outer ear.** *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 295–303. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.295-303.2003>

Kourtev, P. S; Ehrenfeld, J. G; Haˆggblom, M; Haˆggblom, H. (2002). **Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil.** In *Ecology* (Vol. 83, Issue 11).

Machado, D. F. M; Parzianello, F. R; da Silva, A. C. F; Antonioli, Z. I. (2012). **Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente.** *Revista de Ciências Agrárias*, 35(1), 274–288.

Mandeel, Q. A. (2006). **Biodiversity of the genus Fusarium in saline soil habitats.** *Journal of Basic Microbiology*, 46(6), 480–494.

Mantoani, M. C., Dias, J., Orsi, M. L., & Torezan, J. M. D. (2013). **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).

Mielke, E. C., Negrelle, R. R. B., Cuquel, F. L., & Lima, W. P. (2015). **Espécies exóticas invasoras arbóreas no Parque da Barreirinha em Curitiba: Registro e implicações.** *Ciencia Florestal*, 25(2), 327–336.

Mohan, J. E., Cowden, C. C., Baas, P., Dawadi, A., Frankson, P. T., Helmick, K., Witt, C. A. (2014). **Mycorrhizal fungi mediation of terrestrial ecosystem responses to global change: mini review.** *Fungal Ecology*, 10, 3–19.

Möhlmann, T. (2011). **Evolution of asexual and sexual reproduction systems in a Basidiomycete: Mycena galericulata.**

Moreira, G. A. M., Pires, E. C. C., Barreto, C. C., & do Vale, H. M. M. (2020). **Total fungi and yeast distribution in soils over native and modified vegetation in central brazil.** *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 44. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200097>

Morris, R. M., Nunn, B. L., Frazar, C., Goodlett, D. R., Ting, Y. S., & Rocap, G. (2010). **Comparative metaproteomics reveals ocean-scale shifts in microbial nutrient utilization and energy transduction.** *ISME Journal*, 4(5), 673–685. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.4>

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** In *NATURE* | (Vol. 403).

Navia, D. (2018). **Metagenômica e suas aplicações no controle biológico com ácaros predadores.**

Oliveira-Filho, A. T., & Fontes, M. A. L. (2000). **Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate.** In *BIOTROPICA* (Vol. 32, Issue 4b).

Orgiazzi, A., Dunbar, M. B., Panagos, P., de Groot, G. A., & Lemanceau, P. (2015). **Soil biodiversity and DNA barcodes: Opportunities and challenges.** *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 244–250.

Ozimek, E., & Hanaka, A. (2021). **Mortierella species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils.** In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1–18). MDPI AG.

PACCHIONI, Ralfo Goes. **Metagenômica comparativa de solo de regiões de Mata Atlântica e Caatinga do Estado do Rio Grande do Norte-Brasil.** 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Pauvert, C., Buée, M., Laval, V., Edel-Hermann, V., Fauchery, L., Gautier, A., Lesur, I., Vallance, J., & Vacher, C. (2019). **Bioinformatics matters: The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline.** *Fungal Ecology*, 41, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.03.005>

Pellissier, L., Niculita-Hirzel, H., Dubuis, A., Pagni, M., Guex, N., Ndiribe, C., Salamin, N., Xenarios, I., Goudet, J., Sanders, I. R., & Guisan, A. (2014). **Soil fungal communities of grasslands are environmentally structured at a regional scale in the Alps.** *Molecular Ecology*, 23(17), 4274–4290.

Pellegrini M. O. O. (2017). **Morphological phylogeny of *Tradescantia* L. (Commelinaceae) sheds light on a new infrageneric classification for the genus and novelties on the systematics of subtribe Tradescantiinae.** *PhytoKeys* 89: 11–72. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.89.20388>

Phillips, M. L., Weber, S. E., Andrews, L. v., Aronson, E. L., Allen, M. F., & Allen, E. B. (2019). **Fungal community assembly in soils and roots under plant invasion and nitrogen deposition.** *Fungal Ecology*, 40, 107–117.

R Core Team (2013). **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ram, R. J., VerBerkmoes, N. C., Thelen, M. P., Tyson, G. W., Baker, B. J., Blake, R. C., Shah, M., Hettich, R. L., & Banfield, J. F. (2005). **Community Proteomics of a Natural Microbial Biofilm.** *Science*, 308(5730), 1915–1920.

Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). **The Uncultured Microbial Majority.** *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 369–394. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090759

Renate Ziller, S.(2001). **Os processos de degradação ambiental originados por plantas exóticas invasoras.**

Rodolfo, A. M., Gregorini, ; M Z, Cândido-Jr, J. F., & Temponi, L. G. (2008). **Levantamento e padrão de distribuição das plantas exóticas na trilha do poço preto do parque nacional do iguaçu-pr.**

Richardson, D. M., Py S Ek, P., Rejmánek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D., & West, C. J. (2000). **Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions.** In *BIODIVERSITY RESEARCH Diversity and Distributions* (Vol. 6).

Ruiz Gómez, F. J., Navarro-Cerrillo, R. M., Pérez-de-Luque, A., Oßwald, W., Vannini, A., & Morales-Rodríguez, C. (2019). **Assessment of functional and structural changes of soil fungal and oomycete communities in holm oak declined dehesas through metabarcoding analysis.** *Scientific Reports*, 9(1).

Sánchez, C. (2009). **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194.

Sánchez de Lorenzo, J. M. (2004). **Las especies del género Tradescantia cultivadas en España.** Disponível em: <<http://www.arbolesornamentales.es/Tradescantia.htm>>. Acesso em Julho 2022.

Sarhan, M. S., Hamza, M. A., Youssef, H. H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., ... Hegazi, N. A. (2019). **Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review.** *Journal of Advanced Research*.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246.

Seifert, K. A. (2009). **Progress towards DNA barcoding of fungi.** *Molecular Ecology Resources*, 9, 83–89.

Segaran, Gayathri; Sathiavelu, Mythili (2019). **Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (), 101284–.

Sousa, J de O. **O gênero Geastrum pers.(geastraceae, basidiomycota): ocorrência, chave taxonômica e descrições de novas espécies do nordeste brasileiro.** 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Souza, C.N. (2010) **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica.** Dissertação de mestrado. Lavras: UFLA.

Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). **Measurement of in Situ Activities of**

**Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats.** Annual Review of Microbiology, 39(1), 321–346.

Steiner, M., Linkov, I., & Yoshida, S. (2002). **The role of fungi in the transfer and cycling of radionuclides in forest ecosystems.** In *Journal of Environmental Radioactivity* (Vol. 58).

Streekstra, H. (2010). **Arachidonic Acid: Fermentative Production by Mortierella Fungi.** In *Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils: Second Edition* (pp. 97–114). Elsevier Inc.

Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). **Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages.** In *Mycorrhiza* (Vol. 20, Issue 4, pp. 217–263

Thoen, E., Harder, C. B., Kauserud, H., Botnen, S. S., Vik, U., Taylor, A. F. S., Menkis, A., & Skrede, I. (2020). **In vitro evidence of root colonization suggests ecological versatility in the genus Mycena.** *New Phytologist*, 227(2), 601–612.

Ting, Z., & Shaolin, P. (2008). **Spatial scale types and measurement of edge effects in ecology.** *Acta Ecologica Sinica*, 28(7), 3322–3333.

Tyler, G. (1991). **Ecology of the genus Mycena in beech (*Fagus sylvatica*), oak (*Quercus robur*) and hornbeam (*Carpinus betulus*) forest of S Sweden.** - Nord. J. Bot. 11: 111-121. Copenhagen. ISSN 0107-055X

Urich T, Lanzén A, Qi J, Huson DH, Schleper C, Schuster SC (2008). **Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome.** PLoS ONE 3(6): e2527.

Uzun, Y., Demirel, K., İçin, T. M., Bir, Y., & Kaydı, M. (2017). **A New Mycena Record for the Mycobiota of Turkey.** In *Anatolian Journal of Botany* (Vol. 1, Issue 1).

Vaz, G. C. de O. (2020) **A invasora tradescantia zebrina altera a decomposição vegetal em mata atlântica?** Dissertação de mestrado (Mestre em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020. Disponível em: <[https://portal.unila.edu.br/mestrado/biodiversidade-neotropical/GiselleVaz\\_Dissertao\\_2020\\_PPGBN.pdf](https://portal.unila.edu.br/mestrado/biodiversidade-neotropical/GiselleVaz_Dissertao_2020_PPGBN.pdf)>. Acesso em: dezembro de 2022.

Vilà, M., Gimeno, I. (2007). **Does invasion by an alien plant species affect the soil seed bank?** *Journal of Vegetation Science*, 18(3), 423.

Verma, R. K. (2018). **Diversity of macro-fungi in Central India-XVII: Geastrum fimbriatum and Geastrum triplex.** <https://www.researchgate.net/publication/329311189>

Vitousek, P.M., C.M D'Antonio, L.L Loope, and R Westbrooks (1996). **Biological invasions as global environmental change.** *American scientist* 84, N. 5 468-478.

Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K. ichi, Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., &

Hara-Kudo, Y. (2011). **Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium***. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2500–2504. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4507>

Webster, J. and Weber, R. W. S. **Introduction to fungi**. *Cambridge University Press*, 2007.

Whittaker, R. J. et al. (2001.). **Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity**. *Journal of Biogeography*, Hoboken, 28: 453-470.

White, T & Bruns, Tom & Lee, Steven & Taylor, John & Innis, M & Gelfand, D & Sninsky, John. (1990). **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics**.

Wickham H (2016). **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Zapka, C., Leff, J., Henley, J., Tittl, J., de Nardo, E., Butler, M., Griggs, R., Fierer, N., & Edmonds-Wilson, S. (2017). **Comparison of standard culture-based method to culture-independent method for evaluation of hygiene effects on the hand microbiome**. *MBio*, 8(2).

Zhang, L., Chen, J., Lv, Y., Gao, C., & Guo, S. (2012). ***Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale***. *Mycological Progress*, 11(2), 395–401.

Zhang, K., Bonito, G., Hsu, C. M., Hameed, K., Vilgalys, R., & Liao, H. L. (2020). ***Mortierella elongata* increases plant biomass among non-leguminous crop species**. *Agronomy*, 10(5).

Zenni, R. D., & Ziller, S. R. (2011). **An overview of invasive plants in Brazil**. *Revista Brasileira de Botânica*. 34(3), 431–446.

## APENDICES

Tabela 3. Dados das sequencias de entrada, filtradas, fita Foward sem ruído e após filtro de quimera após a implementação do *pipeline* “DADA2” na inferência exata das ASVs das amostras de solo do PNI.

Amostra	Input	Filtered	DenoisedF	Nonchim
10BN	37276	20604	20034	19630
1IN	37855	24220	23675	22516
2BI	39025	18766	18026	17355
2II	40775	27713	27152	24561
2IN	38309	23583	23120	22265
3IN	43809	24245	23687	21918
4BN	41361	25268	24749	22870
6BI	35946	17306	16737	15600
6II	36675	20744	20143	19058
7BN	42154	24378	23762	22786
8BI	39583	15685	15264	13911
8II	35499	20543	20042	19045
Total	468267	263055	256391	241515

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4. Abundância relativa das guildas funcionais assignadas das amostras extraídas do Parque Nacional do Iguaçu dos pontos Interior Nativo (IN), Interior Invadido (II), Borda Nativa (BN) e Borda Invadida (BI).

Guilda	IN	II	BN	BI
Patógenos oportunistas	65,70%	72,40%	65,70%	58,60%
NA	9,20%	12,40%	11,20%	18,90%
>1 Guildas	10,50%	3,36%	7,48%	8,93%
Saprófitos Indefinidos	8,75%	5,00%	11,90%	6,43%
Patogenos Animais	3,40%	2,80%	1,80%	2,69%
Saprotitos de Solo-Planta	0,87%	0,55%	0,39%	2,63%
Patogenos de Plantas	0,49%	2,74%	0,64%	1,05%
Fungos Parasitas	0,43%	0,43%	0,00432	0,43%
Patogenos de Insetos	0,36%	0,09%	0,28%	0,13%
Ectomicorrizas	0,04%	0,00%	0,00%	0,07%
Endofíticos	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%
Micorrizas ericoides	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%

Fonte: Autoria propria