**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica
do estado de São Paulo**

Natalia Juliana Nardelli Gonçalves

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2011**

Natalia Juliana Nardelli Gonçalves
Bacharel em Ciências Biológicas

**Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica
do estado de São Paulo**

Orientadora:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Gonçalves, Natalia Juliana Nardelli
Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica do estado de São Paulo /
Natalia Juliana Nardelli Gonçalves. - - Piracicaba, 2011.
86 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Áreas de conservação 2. Biodiversidade 3. Cianobactérias 4. Diversidade genética
5. Mata Atlântica 6. RNA ribossômico I. Título

CDD 589.46
G635d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADECIMENTOS

Nesta importante fase da minha vida, tenho muito a agradecer:

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore pela orientação e suporte neste período;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade;

Ao CNPq e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas neste período;

Ao Prof. Márcio Lambais pela confiança e apoio no programa de pós-graduação;

À profa. Dra. Siu Mui Tsai por disponibilizar equipamentos e aos técnicos Fábio Duarte e Francisco Montrazi por todo suporte;

À pós-doutoranda e amiga Janaína Rigonato, fundamental no desenvolvimento do trabalho;

Aos colegas e amigos do laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP): Adriana Lorenzi, Ana Cláudia Alleoni, Ana Paula Dini, Bruna Ribeiro, Carol Hoff, Diego Genuário, Elaine Crespim, Estela Stenico, Isabela Ascêncio, Marcelo Gomes, Patrícia Schaker, Paula Acedo e por toda a ajuda e amizade, agradeço especialmente à estagiária Mariana Leal e ao doutorando Danilo Alvarenga;

Àqueles que me fizeram entender que amigos são a família que nos permitem escolher:

À minha grande amiga Cristiane Cipola, obrigada por sempre acreditar em mim mais do que eu mesma e por me ajudar a tornar esse sonho realidade. Os laços que temos transcendem qualquer entendimento e distância, amo você!

À minha grande amiga Lícia Vaghi, que mesmo distante torceu por mim todos os dias, e vibrou comigo em todas as vitórias, amo você!

Ao grande amigo Fernando Andreote, por todos os momentos de descontração, convivência e constante ajuda, e ao Felipinho, que junto com a Cris e o Fernando foram minha família nestes anos;

Aos grandes amigos que fiz neste período: Armando Dias, Bruna Oliveira, Carol Pamplona, Luciana Mecatti, Luiz Felipe Martins, Marina Gumiere, Polé Lourenço, Raphael “Tozado”, e às “Codornas”: Julis, Bibian e Laurinda;

Aos amigos: Arthur Guth, Clebiana e Paulinho Rezende, Deborah Carvalho, Muriel Filho e Simone Ramos, por todas as risadas, por sempre acreditarem em mim e por todo apoio e força apesar da distância;

Aos meus queridos Nino e Wal por toda ajuda, terei sempre muito amor e gratidão por vocês!

Aos meus pais Ana e Edison e meu irmão Diego por todo encorajamento, apoio e amor em todos os momentos da minha vida;

Ao meu amor e companheiro, Carlos Gruli, obrigada por me fazer tão feliz e estar ao meu lado em todos os momentos!

A todos que não encontraram seus nomes aqui e que de forma direta ou indireta colaboraram para a concretização desta pesquisa;

A Deus e ao meu anjo protetor, por terem me dado a certeza de que quando a fé está aliada ao caráter, à competência e à dedicação, tudo é possível!

Muito Obrigada!

Trago no olhar visões extraordinárias, de coisas que abracei de olhos fechados...

Florbela Espanca

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão Bibliográfica	15
2.1.1 Biodiversidade	15
2.1.2 A Mata Atlântica e as Unidades de Conservação.....	16
2.1.3 A filosfera como habitat para os micro-organismos.....	20
2.1.4 Cianobactérias	23
2.1.5 Os métodos moleculares e a subunidade 16S do RNA ribossômico.....	25
2.1.5.1 Técnicas moleculares em ecologia microbiana	27
2.1.5.1.1 DGGE - Denaturing Gradient Gel Eletroforesis	27
2.1.5.1.2 Biblioteca genômica	28
2.1.5.1.3 PCR tempo real.....	29
2.2 Objetivo	30
2.2.1 Objetivos específicos.....	30
2.3 Materiais e métodos.....	31
2.3.1 Descrição do local de coleta	31
2.3.2 Amostragem e extração de DNA da superfície foliar.....	34
2.3.3 Amplificação por PCR do gene RNAr 16S	38
2.3.4 PCR-DGGE	39
2.3.4.1 Análise estatística do DGGE.....	40
2.3.5 Construção da biblioteca de clones	40
2.3.6 Sequenciamento da biblioteca de clones	41
2.3.7 Análises das sequências do gene de RNAr 16S e definição de unidades taxonômicas operacionais	43
2.3.8 Índices de riqueza e diversidade; rarefação e construção de árvore filogenética.....	44
2.3.9 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	45
2.4 Resultados e Discussão.....	46
2.4.1 Diversidade de cianobactérias na filosfera	46

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica do estado de São Paulo

A Mata Atlântica brasileira, atualmente, está reduzida a pequenos fragmentos florestais protegidos em unidades de conservação, que representam apenas 7,6% de sua área original. O Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), localizado no estado de São Paulo é a maior área de proteção integral deste bioma do litoral brasileiro. A superfície da folha de árvore (filosfera) oferece uma grande área de habitat para os micro-organismos, mas constitui um ambiente extremo. O desenvolvimento de comunidades microbianas é dependente de fonte de carbono e de nutrientes essenciais inorgânicos comumente liberados pela planta para a sua superfície. No entanto, um grupo especial de bactérias, Cyanobacteria, é menos dependente da planta para sua nutrição, pois estes organismos são autotróficos para carbono e nitrogênio. Portanto, Cyanobacteria é particularmente interessante para se avaliar neste ambiente. Neste estudo, a comunidade de cianobactérias colonizadoras das filosferas de uma área de conservação (PESM) da floresta ombrófila densa foi avaliada usando abordagens moleculares independente de cultivo. O DNA genômico de cianobactérias foi extraído da superfície de folhas das árvores *Euterpe edulis* e *Guapira opposita* de dois locais dentro do Parque, ou seja, núcleo de Picinguaba próximo ao nível do mar e núcleo Santa Virgínia a 800 metros de altitude. Além disso, as superfícies de folhas de *Garcinia gardneriana* encontrada apenas no núcleo de Picinguaba e de *Merostachys neesii* encontrada somente no núcleo de Santa Virgínia foram avaliadas. As análises da estrutura da comunidade de cianobactérias por PCR-DGGE mostraram que a colonização é dependente das espécies de plantas e independente das localizações das plantas. A análise da composição da comunidade de cianobactérias na superfície das folhas baseada nas bibliotecas de clones de RNAr 16S revelou que dentre um total de 980 clones obtidos, 22% deles pertenciam a 10 gêneros conhecidos. Cerca de 78% dos clones restantes foram filotipos de cianobactérias não cultivadas. As coberturas das bibliotecas de clones de RNAr 16S variaram de 70 a 85%, e as curvas de rarefação (a 5% distância evolutiva) indicaram um bom suporte para esses dados. Após o alinhamento das seqüências, 384 UTOs foram geradas, sendo 257 UTOs de seqüências únicas, sugerindo que as filosferas avaliadas têm alta riqueza e diversidade. A comparação da comunidade de cianobactérias entre as filosferas (β -diversidade), utilizando a ferramenta estatística β -libshuff, mostrou que estes ambientes abrigam táxons distintos em seu filoplano, em concordância com os dados de PCR-DGGE. A predominância de seqüências de RNAr 16S dos ordens Nostocales e Synechococcales foi observada dentre as cianobactérias descritas. Entre essas, um número elevado de seqüências relacionadas com gêneros capazes de fixar N_2 foram encontradas. As espécies *G. opposita* e *E. edulis* em Santa Virgínia e *E. edulis* em Picinguaba apresentaram níveis elevados de índice de diversidade de Simpson (0,01), enquanto *M. neesii* teve o maior índice de riqueza ACE ($405,1 \pm 139,24$). A quantificação de cianobactérias utilizando PCR em tempo real também mostrou que *M. neesii* é a espécie de planta com maior número de cópias de RNAr 16S por cm^2 de folha. Os resultados deste estudo mostraram que as cianobactérias da filosfera desse ecossistema de floresta tropical são influenciadas pelas espécies de plantas e um número elevado de táxons permanecem por ser descritos.

Palavras-chave: RNAr 16S; PCR-DGGE; Biblioteca de clones; Diversidade genética

ABSTRACT

Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of the Atlantic Forest of São Paulo state

The Brazilian Atlantic rainforest currently is reduced to small forest fragments protected in conservation units, representing only 7.6% of its original area. The Serra do Mar State Park (SMSP) located in São Paulo state is the largest fully protected area of this biome in the Brazilian coast. The plant leaf surface (phyllosphere) offer a large habitat area for microorganisms but constitute rather an extreme environment. The development of microbial communities is dependent of carbon source and certain essential inorganic nutrients commonly released from the plant to its surface. However, a special group of bacteria, Cyanobacteria, is less dependent of the plant for their nutrition since these organisms are autotrophic for carbon and nitrogen. Therefore, cyanobacteria are particularly interesting to be evaluated in this environment. In this study, the cyanobacteria community colonizing phyllospheres in a protected conservation area of the ombrophilous dense rainforest of SMSP was assessed using cultivation-independent molecular approaches. Cyanobacteria genomic DNA were extracted from surface leaves of the *Euterpe edulis* and *Guapira opposita* trees of two locations inside of the Park, i.e., Picinguaba nucleus close to the sea level and Santa Virginia nucleus at 800 meters of altitude. Also, surface leaves of *Garcinia gardneriana* found only in the Picinguaba nucleus and *Merostachys neesii* found only in Santa Virginia nucleus were evaluated. The analyses of cyanobacterial community structure by PCR-DGGE showed that colonization is dependent of the plant species and independent of plants locations. The analysis of composition of cyanobacterial community in the surface leaves based on 16S rRNA clones libraries revealed that among a total of 980 clones obtained, 22% of them belonged to 10 known genera. About 78% of the remaining clones were uncultured cyanobacteria phylotypes. The 16S rRNA clone libraries coverage ranged from 70 to 85%, and the rarefaction curves (at 5% evolutionary distance) indicated a good support for these data. After sequences alignment, 384 OTUs were generated, with 257 OTUs of them being unique sequences, suggesting that the phyllospheres evaluated have high richness and diversity. Comparison of cyanobacterial community among the phyllospheres (β -diversity) using statistical J-libshuff tool, showed that these environments harbor distinct taxa in their phylloplane, in agreement to PCR-DGGE data. A predominance of 16S rRNA sequences of the orders Nostocales and Synechococcales was observed within the known cyanobacteria. Among those, a high number of sequences related with genera capable to fix N_2 were found. The species *G. opposita* and *E. edulis* located in Santa Virginia and *E. edulis* in Picinguaba showed high levels of Simpson diversity index (0.01), while *M. neesii* had the highest ACE richness index (405.1 ± 139.24). The cyanobacterial quantification using real time PCR also showed that *M. neesii* is the plant species with the highest number of copies of 16S rRNA per cm^2 of leaf. The results of this study showed that phyllosphere cyanobacteria in this rainforest ecosystem are influenced by plant species and a high number of taxa remaining to be described.

Keywords: 16S rRNA; PCR-DGGE; Clone libraries; Genetic diversity

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, floresta ombrófila densa, possui uma biodiversidade de aproximadamente 20 mil espécies de plantas, das quais mais de 8 mil são endêmicas. Atualmente, está reduzida a pequenos fragmentos florestais, que representam apenas 7,6% da formação original, tornando os estudos relacionados com a sua biodiversidade um tema urgente a ser desvendado. A maior parte dos remanescentes contínuos de Mata Atlântica está localizada principalmente na costa do estado de São Paulo e do Paraná. Neste bioma destaca-se o Parque Estadual da Serra do Mar, localizado no estado de São Paulo, como a maior área de proteção integral do litoral brasileiro. O parque é administrado pelo Instituto Florestal de São Paulo e devido a sua extensão está subdividido em 8 núcleos administrativos.

Os núcleos são protegidos contra ação antrópica e abrigam uma grande diversidade de espécies nativas e endêmicas, sendo que a superfície foliar das plantas tem sido alvo de muitos estudos. A interface entre a superfície foliar (filosfera) e a atmosfera é uma via fundamental para a ciclagem de nutrientes, principalmente o nitrogênio, sendo que este intercâmbio de nutrientes pode ser mediado por populações microbianas, que estão sendo consideradas as principais responsáveis pelo aporte desse nutriente em ecossistemas tropicais úmidos. No grupo das bactérias destacam-se as cianobactérias por serem as únicas com capacidade de realizar a fixação de carbono (pela fotossíntese) e de nitrogênio (pela fixação biológica do nitrogênio). Assim, este grupo se torna essencial para o aporte de nutrientes nesse ecossistema. Cianobactérias colonizadoras de folhas de plantas localizadas nos núcleos de Picinguaba, no município de Ubatuba e de Santa Virgínia, em São Luiz do Paraitinga são focos deste estudo.

Para acessar as comunidades cianobacterianas presentes na superfície foliar, as análises moleculares têm sido consideradas como uma metodologia revolucionária, assim como para complementar e suprir as limitações dos métodos dependentes de cultivo. Para se conhecer os micro-organismos presentes no ambiente estudado foram utilizadas metodologias baseadas na avaliação da região 16S do RNAr por ser um gene conservado entre as espécies e ainda por apresentar muitas sequências depositadas em bancos de dados públicos, para comparações e inferências relacionadas com as espécies presentes no ambiente estudado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Biodiversidade

Biodiversidade refere-se à variabilidade biológica e uma das definições mais coerente é dada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais, sendo: “biodiversidade envolve todas as formas de vida, ecossistemas e processos ecológicos, e abrange a sua hierarquia em níveis genético, taxonômico e de ecossistema”. Desta maneira, refere-se à variedade de vida, incluindo a variabilidade genética dentro das populações e espécies; a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas; e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos (BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992).

O termo biodiversidade diz respeito tanto ao número de diferentes categorias biológicas (riqueza) quanto à abundância relativa dessas categorias (equitabilidade). Também inclui variabilidade em nível local (alfa diversidade), complementariedade biológica entre habitats (beta diversidade) e variabilidade entre paisagens (gama diversidade) (WHITAKER, 1972). A esse respeito, biodiversidade é tida como a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, dos recursos genéticos e seus componentes. No conhecimento da biodiversidade nos diferentes ecossistemas está a base do progresso biotecnológico esperado em diferentes áreas da ciência aplicada (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999).

Neste contexto a Mata Atlântica, floresta ombrófila densa, possui uma biodiversidade de aproximadamente 20 mil espécies de plantas, das quais mais de 8 mil são endêmicas. Atualmente, está reduzida a pequenos fragmentos florestais, que representam apenas 7,6% da formação original, tornando os estudos relacionados com a sua biodiversidade um tema urgente a ser desvendado.

2.1.2 A Mata Atlântica e as Unidades de Conservação

Em estudos ecológicos os termos Mata Atlântica e Ombrófilo (floresta ombrófila densa) de acordo com Coutinho (2009) e Veloso, Rangel Filho e Lima (1991) devem ser referenciados como matas tropicais pluviais, que recebem altos índices de precipitação ao longo do ano, caracterizando o clima tropical úmido. As matas tropicais pluviais somadas a outros 28 ecossistemas (manguezais, matas de restinga, matas tropicais estacionais decíduas e semidecíduais e cerrados) constituem o perfil Tropical Atlântico.

A partir dessas características Veloso, Rangel Filho e Lima (1991) subdividiram a vegetação floresta ombrófila densa seguindo diferenças topográficas e fisionômicas (Figura 1) em:

- Floresta ombrófila densa alto-montana, que ocorre no cume da Serra do Mar, em altitudes acima de 1200m, com vegetação entre 8 e 20 m de altura que se desenvolvem sobre solos litólicos;
- Floresta ombrófila densa montana, recobre a Serra do Mar entre 500 e 1200 m;
- Floresta ombrófila densa submontana, situa-se na encosta da Serra do Mar, com faixas de altitude variando entre 50 e 500 m;
- Floresta ombrófila densa de terras baixas, entre 5 a 50 m de altitude em solo arenoso, com camada de húmus pouco profunda e lençol freático raso;
- Floresta ombrófila densa aluvial: matas ciliares que ocorrem em áreas de inundação de rios, próximo a mangues e restingas.

Figura 1 - Perfil esquemático da floresta ombrófila densa: 1. floresta ombrófila densa aluvial, 2. floresta ombrófila densa de terras baixas, 3. floresta ombrófila submontana, 4. montana, 5. alto-montana (VELOSO; RANGEL FILHO; LIMA, 1991)

Os estudos de Clark, Clark e Read (1998) e Oliveira Filho e Fontes (2000) em regiões da Amazônia e floresta ombrófila densa, respectivamente, mostraram que as variações florísticas estão intimamente relacionadas com o clima, sendo que fatores como temperatura e precipitação foram apontados como responsáveis por variações na composição e abundância de espécies. Neste contexto, Franke et al. (2005) esclareceram que a denominação Mata Atlântica relaciona-se apenas com sua proximidade com o oceano, e que de acordo com a classificação técnica de Köppen as variações climáticas vão de tropical, tropical de altitude até subtropical com variações de temperatura entre 14 e 21°C.

A maior parte dos remanescentes contínuos de Mata Atlântica está localizada principalmente na costa do estado de São Paulo e do Paraná, sudeste/sul do Brasil, devido principalmente ao relevo irregular da Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba. Em São Paulo, onde há apenas 5% de florestas nativas com pouca ação antrópica, destacam-se as regiões serranas (LEITÃO FILHO, 1994), e cerca da metade dos remanescentes florestais de grande extensão estão protegidos na forma de unidades de conservação. Nos 500 anos decorridos de fragmentação e degradação das formações naturais, foram poupadas apenas as regiões serranas, principalmente a fachada da Serra do Mar. Este fato se deve, sobretudo, por estas áreas serem impróprias para práticas agrícolas. Hoje, essas regiões de vegetação nativa estão inseridas em uma matriz extremamente alterada pela ação antrópica e pulverizada em pequenos remanescentes (Figura 2), geralmente muito degradados (MYERS; MITTERMEIER; MITTERMEIER, 2000). A maior parte desses pequenos remanescentes está no estado de São Paulo, protegidos na maioria

dos casos pela área de proteção integral da Mata Atlântica, o Parque Estadual Serra do Mar (PESM) (HIROTA, 2003; INSTITUTO FLORESTAL - IF, 2006).

O Parque Estadual da Serra do Mar, localizado no estado de São Paulo, é a maior área de proteção integral do litoral brasileiro. Criado em 30 de agosto de 1977, através do Decreto N° 10.251 (30/08/1977), seus 315.390 hectares abrangem parte de 23 municípios, desde Ubatuba, na divisa com o estado do Rio de Janeiro, até Pedro de Toledo no litoral sul do estado. No planalto, abriga cabeceiras formadoras dos rios Paraíba do Sul, Tietê e Ribeira de Iguape. Dentro do parque encontram-se todos os tipos de vegetação existentes na região costeira: floresta ombrófila densa, restinga, campo de altitude, manguezal e várzea (IF, 2006), conta com características que fazem dele um caso a parte entre as unidades de conservação brasileiras (SÃO PAULO, 2006), sendo elas:

- maior parque da Mata Atlântica;
- único corredor biológico íntegro conectando os remanescentes florestais do sul do estado do Rio de Janeiro aos remanescentes do Vale do Ribeira e Paraná, possibilitando a manutenção dos fluxos gênicos e a preservação de espécies que necessitam de grandes territórios para sua sobrevivência;
- composto por conjuntos de ecossistemas, tais como florestas densas, campos naturais, mangues, restingas e várzeas, que das escarpas da serra à planície costeira guardam boa parte das espécies endêmicas e ameaçadas de extinção do bioma;
- protege as cabeceiras formadoras das bacias do Paraíba do Sul, Tietê e dos mananciais que abastecem a baixada santista e litoral norte.

Figura 2 - Remanescentes da Mata Atlântica e limites do Parque Estadual Serra do Mar
Fonte: São Paulo (2006)

O Parque é administrado pelo Instituto Florestal de São Paulo e devido a sua extensão está subdividido em 8 núcleos administrativos: Caraguatatuba, Cunha/Indaiá, Curucutu, Pedro de Toledo, Picinguaba, Pilões, São Sebastião e Santa Virgínia (I F, 2006).

O núcleo de Picinguaba possui uma área de abrangência de 47.000 ha, totalmente inserido no município de Ubatuba. Sua localização, ambientalmente estratégica, faz a ligação entre o PESM (cerca de 315 mil ha) com o Parque Nacional da Serra da Bocaina (80 mil ha) e com a área de proteção ambiental (APA) do Cairuçu, no estado do Rio de Janeiro (30 mil ha), formando um grande corredor ecológico. A floresta em Picinguaba chega até os costões rochosos e se espalha pela planície litorânea em sete praias sendo o único ponto do PESM que atinge a orla marítima. O clima é bastante úmido e as temperaturas médias variam entre 19,5°C (junho) a 25,9°C (fevereiro). Este núcleo está localizado a aproximadamente 20 m da margem direita do Rio da Fazenda, no bairro Fazenda da Caixa em Ubatuba, na trilha que sai da Casa da Farinha e vai até Paraty. De acordo com a classificação do IBGE (VELOSO; GÓES FILHO, 1982), a vegetação do local se caracteriza como floresta ombrófila densa atlântica, por ser uma formação com alta diversidade e endemismo (MYERS; MITTERMEIER; MITTERMEIER, 2000). Este

ambiente possui um perfil de variação de altitude entre 64 e 89 m acima do nível do mar, sendo que sua fisionomia é característica de submontana (VELOSO; GOÉS FILHO, 1982).

O Núcleo Santa Virgínia (7.557 ha) está inserido no município de São Luiz do Paraitinga, Vale do Paraíba em São Paulo, a uma altitude de 880 m, com clima tropical úmido e temperatura média de 21°C, predominando a vegetação de floresta ombrófila densa alto-montana. Está classificada como “zona intangível” pelo plano de manejo do PESH, que refere-se a áreas com fitofisionomia de vegetação primária ou com baixa intervenção humana, onde apenas pesquisas científicas são permitidas. A pluviosidade neste núcleo é alta (1800 mm anuais), o que pode ser explicado pela proximidade da serra ao litoral. Desta forma, a massa de ar equatorial atlântica sobe devido à presença da Serra do Mar, tornando o ambiente extremamente úmido. Gentry (1988) em suas pesquisas confirmou que a umidade é uma das principais variáveis associadas com a riqueza de espécies entre diversas comunidades. O máximo de riqueza de espécies pode ser associado com regiões montanhosas, de acordo com Barthlott et al. (2005) que inclui o Brasil entre os 5 centros de diversidade de plantas vasculares no mundo.

O sucesso de preservação da biodiversidade da Mata Atlântica está estreitamente vinculado ao sucesso do restabelecimento da conectividade entre todas as áreas que integram este bioma. Isto implica no deslocamento do foco das unidades de conservação para a gestão integrada da paisagem, envolvendo desde fragmentos naturais de florestas até centros urbanos, passando por pastos, áreas de silvicultura, etc. Essa concepção se concretiza no projeto “Corredores Ecológicos”, do Ministério do Meio Ambiente do Brasil, cuja gestão do plano para o corredor central da Mata Atlântica foi colocado em prática há cinco anos (GUEDES et al., 2005).

2.1.3 A filosfera como habitat para os micro-organismos

A interface entre a superfície foliar (filosfera) e a atmosfera é uma via fundamental para a ciclagem de nutrientes (principalmente nitrogênio) (ABRIL; TORRES; BUCHER, 2005). Sendo que, o intercâmbio de nutrientes entre filosfera/atmosfera pode ser mediado por populações microbianas (FREIBERG, 1998; FURNKRANZ et al., 2008). Muitos autores têm considerado que a fixação de nitrogênio através dos micro-organismos presentes na filosfera pode ser o principal mecanismo para o aporte desse nutriente em ecossistemas tropicais úmidos

(BENTLEY, 1987; DOJANI et al., 2007; FREIBERG, 1998; FRITZ SHERIDAN; PORTÉCOP, 1987; FURNKRANZ et al., 2008; YANG et al., 2000).

A filosfera tem se tornado alvo de muitos estudos, diversos pesquisadores têm dado ênfase a esse hábitat, pois pode abrigar diversos grupos de micro-organismos (FREIBERG, 1998; KARAMANOLI et al., 2000). Lindow e Brandl (2003) destacaram as bactérias como principais colonizadores da filosfera, podendo ser encontradas em uma densidade de 10^6 - 10^7 células por cm^2 de folha. Em regiões tropicais, a copa das árvores proporciona um ambiente úmido, ideal para o desenvolvimento bacteriano, aumentando consideravelmente a densidade de células na superfície foliar (BALDOTO; OLIVARES, 2008). Ainda, de acordo com os estudos de Dulla et al. (2005), os micro-organismos associados às folhas diferem substancialmente daqueles associados a outras partes das plantas, como por ex. raízes.

Yadav et al. (2004) estudaram a colonização bacteriana em 8 espécies de árvores perenes em um ecossistema mediterrâneo no norte da Grécia. Estes autores constataram que a colonização foi altamente variável entre as espécies de árvores e, ainda, associaram essas variações a diversos fatores, incluindo características morfológicas como tricomas foliares. Baldoto e Olivares (2008) destacaram que a distribuição de bactérias está associada a características anatômicas da superfície das folhas, verificando que as bactérias colonizam diferentes regiões dependendo de características como espaços intercelulares, estômatos e tricomas, sendo que esta distribuição pode ocorrer em células solitárias, microcolônias e biofilmes (MONIER; LINDOW, 2003). Mechaber et al. (1996) consideraram que a topografia da superfície das folhas afeta diretamente a disponibilidade de micro-hábitats para os micro-organismos colonizadores. Ainda, a formação de protuberâncias e depressões na superfície foliar podem limitar a difusão passiva de nutrientes do interior para a superfície da folha.

A superfície das folhas pode ser considerada como um hábitat único para micro-organismos epifíticos. De acordo com Yadav et al. (2004), pode ser considerada um hábitat efêmero durando de poucas semanas a muitos anos para espécies lenhosas perenes. Este hábitat é altamente dinâmico e está constantemente exposto a variações das condições ambientais. As comunidades epifíticas são submetidas à frequentes alterações de fatores ambientais, como temperatura, umidade relativa, velocidade dos ventos e radiação UV e também precisam se

adaptar a condições nutricionais variáveis. Para sobreviver e se multiplicar na superfície das folhas, diante dessas alterações constantes, as bactérias desenvolveram estratégias de colonização, como por ex. formação de biofilmes (LEVEAU; LINDOW, 2001; MONIER; LINDOW, 2003; MONIER; LINDOW, 2005).

Vários estudos demonstraram a importância da disponibilidade de fontes de carbono para a colonização da filosfera (LEVEAU; LINDOW, 2001; MERCIER; LINDOW, 2000; MILLER et al., 2001). Nutrientes do interior da folha podem ser liberados para a superfície através de feridas causadas por insetos ou danos causados por chuvas e ventos (LEVEAU; LINDOW, 2001). Tais conhecimentos sugerem que a distribuição de nutrientes na superfície das folhas é heterogênea, limitando o desenvolvimento de algumas bactérias e favorecendo o de outras em determinadas regiões do filoplano. Neste contexto, Dulla et al. (2005) relataram que algumas bactérias enviam sinalização “quorum-sensing” (Figura 3) de acordo com sua localização na superfície foliar e a concentração de nutrientes disponível.

Figura 3 - Comportamento de bactérias em microsítios da superfície foliar com diferentes teores de nutrientes (DULLA et al., 2005)

Lindow e Brandl (2003) e Lambais et al. (2006) mostraram em seus estudos que diferentes espécies vegetais selecionam comunidades bacterianas distintas, e que este é um hábitat relativamente pouco estudado, mas com potencial para abrigar uma grande diversidade de micro-organismos epifíticos, havendo estimativas de que até 97% das bactérias habitantes de filosfera ainda não tenham sido descritas. Freiberg (1998) relatou que o número e a composição

de espécies mudam com a idade da folha, de maneira que os primeiros colonizadores da filosfera são principalmente bactérias, actinobactérias, fungos e outros. Juntamente com os exsudados foliares, eles fornecem um substrato adequado para as sucessivas colonizações por algas, leveduras, líquens e posteriormente artrópodes que se alimentam dos micro-organismos.

2.1.4 Cianobactérias

As cianobactérias constituem um dos grupos mais diversos e abundantes de micro-organismos (WILMOTTE, 1994) e possuem uma longa história evolutiva, sendo que inicialmente foram representadas por organismos unicelulares de água doce, e à medida que se distribuíam entre os diversos ambientes foram adquirindo complexidade morfológica e fisiológica (BLANK; SANCHEZ BARACALDO, 2010). A longa história evolutiva das cianobactérias é tida como a razão de sua abundante ocorrência nos mais diversos tipos de habitats.

A sistemática do grupo das cianobactérias tem uma história confusa, uma vez que esse grupo de micro-organismos foi classificado de acordo com vários sistemas diferentes. A presença de clorofila e a liberação de O_2 a partir do processo fotossintético são elementos significativos para inclusão deste grupo junto às algas (BOLD; WYNNE, 1985). No entanto, a classificação mais amplamente aceita nos dias atuais está baseada na Nomenclatura Bacteriana, pois sabe-se que de acordo com análises da composição da parede celular e a estruturas dos ribossomos, sua natureza é procariótica e justifica seu posicionamento junto as bactérias Gram-negativas. Após ter sua origem confirmada, um enfoque bacteriológico foi proposto (STANIER; COHEN BAZIRE, 1977) Entretanto, descrições de novos táxons cianobacterianos por critérios microbiológicos continuam escassas até os dias atuais (OREN, 2011). Os sistemas de classificação, microbiológico (CASTENHOLZ, 2001; RIPKA et al., 1979) e botânico (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1999, 2005) passaram então a enfatizar características morfológicas para determinação de táxons. É importante ressaltar que já existe uma proposta para um sistema de classificação unificado, baseado nas relações filogenéticas consideradas em conjunto com aspectos morfológicos (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005; KOMÁREK, 2010).

A estrutura celular das cianobactérias é típica de Gram-negativas (WOESE, 1987) e se agrupam filogeneticamente ao domínio Bacteria, porém realizam fotossíntese oxigênica como algas e plantas (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; STAL; MOEZELLAR, 1997). Sua natureza fotossintética aeróbica requer apenas água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sobreviver, mas algumas podem ser heterotróficas facultativas, crescendo no escuro e na presença de determinados substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELLAR, 1997).

Algumas espécies de cianobactérias possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico contribuindo para a fertilidade dos solos e águas (DOJANI et al., 2007; HERRERO; MURO PASTOR; FLORES, 2001; RAI; BERGMAN, 2002; ZEHR, 2011). Essa capacidade está associada à presença de células vegetativas modificadas, chamadas heterócitos, que possuem um envoltório celular capaz de proteger a enzima nitrogenase, evitando a entrada de O_2 , o qual é um inibidor desta enzima, que é responsável por fixar o N_2 do ar atmosférico e o transformar em amônia. Em algumas cianobactérias filamentosas, a fixação de nitrogênio ocorre em células vegetativas em condições anóxicas e em várias espécies unicelulares a fixação ocorre na fase escura do dia (FAY, 1992; FIORE; HONDA, 2008; GALLON, 1992).

As cianobactérias podem desenvolver estruturas que auxiliam na adaptação em ambientes diversos, como os acinetos, que são células de resistência que atuam como esporos (THIEL; WOLK, 1983). Outras estruturas conferem vantagem adaptativa para as cianobactérias, como os hormogônios, que são filamentos modificados que atuam como elemento de dispersão e infecção no estabelecimento da associação cianobionte-hospedeiro (FIORE; HONDA, 2008), e os aerótopos, que são vesículas de ar responsáveis pela flutuabilidade e habilidade de regular a movimentação na coluna d'água de acordo com as condições do ambiente (OLIVER; GANF, 2000).

Este grupo de micro-organismos apresenta uma grande diversidade morfológica, podem apresentar-se como unicelulares (cocóides e bacilos) e filamentosas (ramificadas ou não) (WATERBURY, 2006; WHITTON; POTTS, 2000). Não possuem flagelos, mas as espécies filamentosas geralmente possuem movimento deslizante e podem migrar através de superfícies úmidas. Apesar de serem organismos de dimensões microscópicas, o tamanho de suas células varia entre 1 a 100 μ m, existindo a possibilidade de serem vistas a olho nu, pois formam densos

mantos contendo inclusive outras espécies microbianas (BROCK, 1973). Whitton e Potts (2000) enfatizaram que as cianobactérias podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, inclusive os considerados extremos, isso se deve a sua independência nutricional, adaptação fisiológica e tolerância a condições desfavoráveis a seu desenvolvimento.

As cianobactérias desempenham um papel importante na biorremediação de ambientes contaminados. Atuam na biossorção de metais pesados e na biodegradação de derivados de petróleo, hidrocarbonetos e outros xenobióticos (JUHASZ; NAIDU, 2000; SANDAU; SANDAU; PULZ, 1996). Outra característica a ser ressaltada é a capacidade de estabelecer relações de simbiose com fungos, plantas e animais, essa associação é vantajosa para o hospedeiro permitindo o acesso a ambientes pobres nutricionalmente e hostis (BERGMAN et al., 1997).

Sergeeva, Liaimer e Bergman (2002) reportaram que cianobactérias colonizadoras da filosfera podem ser benéficas às plantas de diversas maneiras: produzem biofilmes os quais podem proteger a planta hospedeira contra a predação de insetos e podem produzir hormônios vegetais reguladores de crescimento e disponibilizar nitrogênio fixado. Desta forma, a Mata Atlântica representa um ambiente propício para a alta ocorrência e diversidade de cianobactérias, principalmente devido às suas condições climáticas.

2.1.5 Os métodos moleculares e a subunidade 16S do RNA ribossômico

Estudos em ecologia molecular utilizando técnicas independentes de cultivo (extração de DNA, reação de polimerase em cadeia - PCR, clonagem e sequenciamento) têm reduzido os problemas associados a metodologias clássicas de estudos de micro-organismos, e são capazes de revelar uma diversidade microbiana que não podia ser acessada a partir de cultivo e morfologia (HUGHES et al., 2001), sendo então consenso para diversos autores que a melhor forma de se conhecer a diversidade microbiana é a junção de métodos moleculares e de cultivo, otimizando custo e tempo e ampliando o acesso à diversidade (ARMOUGOM; RAOULT, 2009; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

As análises moleculares revolucionaram os estudos com comunidades microbianas, porém alguns erros intrínsecos às técnicas devem ser levados em consideração como: o tipo de lise celular empregada para a extração de DNA, os oligonucleotídeos escolhidos para o fragmento alvo e a possibilidade de formação de quimeras. Para que estes fatores não alterem a confiabilidade dos resultados, as análises de dados devem ser feitas com muita atenção, e mais de uma metodologia deve ser empregada em conjunto (FARRELLY; RAINEY; STACKERBRANDT, 1995; OSBORNE et al., 2005; REYSENBACH et al., 1992; VON WINTZINGERODE; GOBEL; STACKERBRANDT, 1997).

A caracterização molecular e a filogenia de cianobactérias tem sido baseada quase que exclusivamente no gene RNAr 16S (Figura 4). Muitos estudos sobre a evolução bacteriana têm se embasado nos conhecimentos a partir deste gene (STACKERBRANDT; GOEBEL, 1994; WOESE, 1987).

Figura 4 – Regiões hipervariáveis do gene RNAr 16S, marcadas por traços cinzas no eixo x, extraído de Ashelford et al. (2005)

Lambais et al. (2006) estudaram a biodiversidade microbiana da folha de três espécies de árvores da Floresta Amazônica, amplificando o gene RNAr 16S. Uma varredura das amostras de folhas indicou uma diversidade de 95 a 671 espécies por amostra, comprovando que métodos rápidos e moleculares de análise para a diversidade das comunidades microbiológicas são necessários.

De acordo com Araya et al. (2003) e Taton et al. (2003), para uma análise completa, diversas técnicas moleculares devem ser associadas, como por ex. FISH (hibridização in situ), DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), clonagem e sequenciamento. Essas

metodologias quando aplicadas separadamente possuem suas limitações, porém ao serem agrupadas promovem vantagens capazes de fazer uma varredura completa no ambiente estudado. Portanto, a combinação de várias técnicas permite um conhecimento mais aprofundado da comunidade e um aporte muito maior e mais esclarecedor quanto à diversidade e suas relações temporais e espaciais.

2.1.5.1 Técnicas moleculares em ecologia microbiana

2.1.5.1.1 DGGE - Denaturing Gradient Gel Eletroforesis

O PCR-DGGE é um método de estudo utilizado em levantamento e comparações da estrutura e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). A técnica de DGGE foi utilizada primeiramente por Muyzer, De Wall e Uitterlinden (1993) e está fundamentada na separação de fragmentos de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de sequências, em um gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação crescente composto por ureia e formamida. Quando sequências de mesmos pares de bases atingem o gradiente de desnaturação a uma determinada posição no gel, a migração praticamente cessa. Sequências de pares de bases diferentes irão parar de migrar em diferentes posições devido à variação de gradiente de desnaturação e, assim, podem ser separados pelo DGGE. Muyzer, De Wall e Uitterlinden (1993), ainda definiram esta técnica como muito apropriada não somente para caracterizar comunidades complexas, como também para inferir filogenia dos membros da comunidade, testar pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de micro-organismos a partir de amostras ambientais e acompanhar a dinâmica de populações específicas em funções de variações ambientais.

O perfil de bandas de DNA no gel de DGGE pode ser visualizado a partir de diferentes colorações. A fluorescência conferida por corantes intercalantes ao DNA como ex. brometo de etídeo e outros corantes fluorescentes, apesar de produzir menos “background” pode deixar de corar bandas com menor conteúdo de DNA. O nitrato de prata mostra um resultado mais

representativo, com maior resolução e é capaz de corar bandas de menor massa de DNA (MUYZER; SMALLA, 1998).

A técnica de PCR-DGGE é amplamente utilizada em estudos de comunidades bacterianas e a comparação visual passou a não ser suficiente para se extrair todas as informações. Assim, os dados gerados (qualitativos ou quantitativos) passaram a ser utilizados em análises multivariada. Para essa técnica as imagens dos géis são normalizadas e convertidas gerando matrizes de presença/ausência de bandas que passam a ser tratadas como espécies, da mesma forma as intensidades das bandas são consideradas como a frequência de ocorrência destas espécies nas comunidades bacterianas a serem avaliadas (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Garcia-Pichel, Prufert-Bebout e Muyzer (1996) avaliaram a população de *Microcoleus chthonoplastes* isoladas de mantos microbianos em ecossistemas marinhos (entremarés) em sete localidades (Alemanha, Espanha, Egito e México). As bandas obtidas com a técnica de DGGE foram sequenciadas e os autores constataram que esta cianobactéria tem uma distribuição cosmopolita, pois foi encontrada em todos os locais amostrados. Taton e colaboradores (2003) avaliaram um manto microbiano em um lago da Antártica por análises morfológicas e moleculares, incluindo o DGGE, e identificaram 15 filotipos contra apenas 6 morfotipos identificadas por análises microscópicas. O trabalho desenvolvido por Asari et al. (2008) teve como objetivo central estimar a diversidade, variação sazonal e filogenia de comunidades de cianobactérias em palha de arroz, sendo que o perfil de DGGE mostrou diferenças significativas nas comunidades drenadas e inundadas e concluíram também que as cianobactérias eram dominantes no ambiente estudado.

2.1.5.1.2 Biblioteca genômica

As bibliotecas genômicas consistem em coleções de sequências de DNA, construídas considerando-se material genético de qualquer organismo (TINGRE; RUBIN, 2005). A construção e o sequenciamento de bibliotecas de clones de genes ribossomais é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas, que possibilita a comparação entre

genótipos de micro-organismos não cultivados, que representam 99% do total de espécies presentes em amostras ambientais (SCHLOSS et al., 2009).

A técnica de clonagem do gene RNAr 16S consiste em ligar um fragmento de DNA ambiental a um vetor, geralmente um plasmídeo, e introduzi-lo em uma célula hospedeira, como a *Escherichia coli*. Em seguida, a cultura de *E. coli* é plaqueada em meio com ágar e os insertos são isolados e sequenciados. Essas sequências são comparativamente analisadas e a identificação filogenética pode ser inferida (MUYZER; SMALLA, 1998). A técnica além da identificação filogenética permite também determinar a abundância relativa de unidade taxonômica operacional (UTO) de uma comunidade (SANZ; KOCHLING, 2007).

Brown et al. (2005) afirmaram que as bibliotecas genômicas fornecem informações detalhadas de sequências representativas da comunidade, e seu papel na descoberta da diversidade e estabelecimento da filogenia é inquestionável, porém é uma técnica trabalhosa, demorada e cara.

2.1.5.1.3 PCR tempo real

A PCR em tempo real (qPCR) é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR. Essa técnica foi usada para quantificar cianobactérias em um lago da Alemanha (KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003) e também em vários lagos da Finlândia (VAITOMAA et al., 2003). Andreote (2007) utilizou a técnica para quantificação de bactérias do rizoplane de eucalipto. Lorenzi (2008) implementou a técnica de PCR em tempo real para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos cianobacterianos potencialmente produtores de toxinas microcistinas. Briand et al. (2008) avaliaram a competição entre linhagens de cianobactérias produtoras e não produtoras de microcistinas em diferentes condições ambientais. Sipari et al. (2010) utilizaram a técnica de PCR em tempo real para detectar e quantificar cópias do gene que codifica para a microcistina (*mcyE*). Al Tebrineh et al. (2010) avaliaram a partir do qPCR *Anabaena circinalis* e outras cianobactérias produtoras de saxitoxina em diferentes ambientes aquáticos com formação de florações.

A detecção para quantificar os produtos da amplificação é realizada por meio de marcadores fluorescentes. O marcador mais comumente utilizado é o corante SYBR Green I, disponibilizado pela empresa Invitrogen, o qual possui a capacidade de se intercalar à dupla fita de DNA e emitir sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521 nm. O sinal emitido é utilizado para determinar a quantidade de produtos amplificados presente em cada ciclo da reação. Quando a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR, ocorre a quantificação propriamente dita e é alcançado o valor de C_t (limiar do ciclo de detecção – “cycle threshold”). A fluorescência emitida abaixo desse valor é considerada ruído de fundo (“background”) (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

Esta técnica pode ser utilizada com duas abordagens distintas: quantificação relativa ou absoluta. A quantificação relativa indica variações quantitativas em uma sequência alvo comparado a um gene de referência, estimando alterações em nível de expressão do RNAm. Já a absoluta expressa a quantidade exata de ácidos nucleicos em relação a uma unidade específica (ng/reação, células/mL) (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

2.2 Objetivo

- O objetivo geral deste projeto foi gerar informações sobre a diversidade de cianobactérias que colonizam a filosfera de espécies de plantas nativas da Mata Atlântica no estado de São Paulo.

2.2.1 Objetivos específicos

- Analisar a estrutura da comunidade de cianobactérias da filosfera por meio da técnica de PCR-DGGE;
- Comparar a comunidade de cianobactérias presentes na filosfera das plantas: *Euterpe edulis*, *Garcinia gardneriana*, *Guapira opposita* e *Merostachys neesii*, localizadas nos núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do PESM;

- Verificar qual variável (espécie ou localização da planta) exerce maior influência à colonização de cianobactérias;
- Identificar as espécies de cianobactérias por meio da construção e análise de bibliotecas de sequências do gene RNAr 16S;
- Analisar a relação filogenética destes organismos comparando com as cianobactérias conhecidas;
- Avaliar de forma quantitativa a representatividade do grupo na colonização das folhas através do PCR em tempo real.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Descrição do local de coleta

O estudo foi realizado a partir de amostras de folhas coletadas de plantas presentes em duas parcelas do Parque Estadual Serra do Mar: Parcela E, localizada no núcleo Picinguaba, no município de Ubatuba e Parcela N, no núcleo de Santa Virgínia no município de São Luiz do Paraitinga (Figura 5). A parcela no núcleo Picinguaba localiza-se próxima ao nível do mar enquanto que a de Santa Virgínia está a uma altitude de 880 metros. As parcelas foram mapeadas em um perímetro de 100 x 100 m (um hectare) com sub-parcelas de 10 x 10 m (Figura 6).

Figura 5 - Localização dos pontos de coleta (círculos) no PESM

Fonte: Instituto florestal <http://www.iflorestal.sp.gov.br/unidades_conservacao/informacoes.asp?cod=27>. Acesso em: 31 ago. 2010

Figura 6 - Representação esquemática das subparcelas dentro das parcelas E e N (um hectare). Pontos pretos em evidência correspondem às estacas brancas de PVC em intervalos de 50 metros. Extraído de Padgurschi (2010)

O núcleo de Picinguaba, (23° 20'03"S 44° 49' 56" W) possui uma área de abrangência de 47.000 ha, totalmente inserido no município de Ubatuba. O clima é bastante úmido e as temperaturas médias variam entre 19,5°C (junho) a 25,9°C (fevereiro). A vegetação do local se caracteriza como floresta ombrófila densa atlântica e fisionomia submontana, e possui um perfil de variação de altitude entre 64 e 89 m acima do nível do mar (ARAÚJO, 2009).

O Núcleo Santa Virgínia (23° 17' a 23° 24'S e 45° 03' a 45° 11' W) está localizado no município de São Luiz do Paraitinga (7557ha), Vale do Paraíba, São Paulo, a uma altitude de 880 metros, com clima tropical úmido e temperatura média de 21°C, apresentando altos índices pluviométricos e predominando a vegetação de floresta ombrófila densa alto-montana (PADGURSCHI, 2010).

2.3.2 Amostragem e extração de DNA da superfície foliar

A escolha das espécies foi fundamentada de acordo com o índice de valor de importância (IVI), estabelecido no III Relatório do projeto BIOTA FAPESP de Gradiente Funcional (JOLY; MARTINELLI, 2008), o qual levou em consideração os parâmetros: número, frequência relativa, densidade relativa e dominância relativa de indivíduos. Este índice baseou-se, portanto, na representatividade da espécie para o hábitat, considerando número de indivíduos e relevância ecológica, o que não quer dizer que táxons menos representativos não tenham importância na comunidade.

Baseando-se neste estudo, espécies com IVI superior a 6,0 foram escolhidas dentro das parcelas estudadas: *Guapira opposita* (IVI 9,99) (Figura 7B) e *Euterpe edulis* (IVI 21,5) (Figura 7C) são espécies muito abundantes em ambas as parcelas estudadas. Ainda, deve-se considerar que o palmito juçara (*E. edulis*) apresenta grande valor econômico agregado, bem como sua importância no manejo sustentável (CONTE, 2004), enquanto que *G. opposita* apresentou potencial terapêutico em estudos de bioprospecção por ter propriedades antiinflamatórias (SANTOS et al., 2010).

Duas espécies arbóreas exclusivas de cada parcela, ou seja, *Garcinia gardneriana* existente na parcela E em Picinguaba e *Merostachys neesii* encontrada somente na parcela N em

Santa Virgínia foram também selecionadas para o estudo. A escolha de *G. gardneriana* (figura 7A) levou em consideração o seu IVI de 6,03, sendo sua abundância na parcela E visualmente notória. A taquara *M. neesii* (figura 7D) foi escolhida pois é uma das espécies que apresenta alto potencial para se tornar invasiva quando em condições propícias para sua dispersão e crescimento, ou seja, devido a ação que a floresta Atlântica vem sofrendo pelo corte seletivo de madeira ou pela retirada do palmito *E. edulis* (FANTINI; GURIES, 2000).

A amostragem foi realizada selecionando quatro indivíduos de cada espécie (Tabela 1), sendo que havia uma distância média de 15 metros entre os indivíduos amostrados, considerados a partir de medidas lineares e desconsiderando o relevo. Cerca de 10 folhas de cada indivíduo foram coletadas com auxílio de podão, tendo como altura máxima 8 metros (sub-bosque) (Figura 8A). Em seguida, as folhas foram separadas com auxílio de tesoura de poda e acondicionadas em sacos plásticos estéreis (Figura 8B), identificadas e posteriormente armazenadas à 4°C.

Tabela 1 – Espécies de plantas selecionadas e locais de coleta

Espécies coletadas na	Espécie coletadas na	Número total de indivíduos
Parcela Picinguaba e nº de indivíduos amostrados	Parcela Santa Virgínia e nº de indivíduos amostrados	
<i>Garcinia gardneriana</i> (8)	<i>Merostachys neesii</i> (8)	8
<i>Guapira opposita</i> (4)	<i>Guapira opposita</i> (4)	8
<i>Euterpe edulis</i> (4)	<i>Euterpe edulis</i> (4)	8

Figura 7 - Exemplos de: A) *Garcinia gardneriana*; B) *Guapira opposita*; C) *Euterpe edulis* e D) *Merostachys neesii*

Figura 8 - A) Manipulação do podão para retirada das amostras; B) Corte dos galhos com tesoura de poda e armazenamento das folhas em campo

No laboratório, três folhas de cada planta amostrada foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de água ultra-pura e pérolas de vidro (15 g, esferas de três mm) esterilizadas em autoclave. Em seguida, estas amostras foram submetidas à agitação (230 rpm) à 20°C por 1 h. Após este período as folhas foram descartadas e o volume líquido foi transferido para tubos plásticos de 50 mL e centrifugados por 20 min a $7000 \times g$ à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o volume foi reduzido a 3 mL, sendo o precipitado conservado em dois microtubos de 1,5 mL para cada árvore.

O DNA total do lavado obtido foi extraído utilizando o kit MoBio Powersoil™ DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O precipitado obtido na lavagem descrita anteriormente foi transferido para um tubo “PowerBead” (2 mL) e homogeneizado em vórtex; 60 µL da solução C1, responsável pela lise celular, foram adicionados ao tubo, aquecido por 5 min a 60°C e resfriado em temperatura ambiente, por três vezes consecutivas. Então, o tubo contendo a mistura foi agitado por 10 min em velocidade máxima em agitador Vortex-Genie® (MoBio Laboratories Inc.) onde foi acoplado um adaptador (Vortex Adapter MoBio Laboratories Inc.). Após centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 s, cerca de 450 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo (2 mL) novo e 250 µL da solução C2, foi adicionada visando separar o DNA dos componentes não desejáveis, tais como

carboidratos, lipídeos e proteínas. A mistura foi incubada por 5 min a 4°C, sendo novamente centrifugada a $10.000 \times g$ por 1 min. O sobrenadante (cerca de 600 µL) foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 200 µL da solução C3, que também tem a função de precipitar carboidratos, lipídeos e proteínas separando-os do DNA. Após a homogeneização por agitação, a mistura foi incubada novamente a 4°C por 5 min. Decorrido este período centrifugou-se a amostra por 1 min a $10.000 \times g$, e transferiram-se 750 µL do sobrenadante a um microtubo novo, sendo adicionados 1200 µL da solução C4, necessária para ligar o DNA a uma coluna de purificação. Esta coluna foi acoplada a um microtubo de 2 mL adicionando-se 675 µL da mistura contendo o DNA. Após a centrifugação por 1 min a $10.000 \times g$, a fração eluída foi descartada e o procedimento repetido até que todo o volume tivesse passado pela coluna. O DNA aderido à coluna foi lavado com 500 µL da solução C5, utilizada para a lavagem do DNA, que foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 s. Para garantir que a coluna estivesse completamente seca a solução de lavagem foi descartada e o procedimento de centrifugação foi repetido por mais 1 min a $10.000 \times g$. A coluna foi então transferida para um microtubo novo e o DNA foi eluído com 100 µL da solução tampão C6. O DNA extraído foi checado e quantificado em gel de agarose 1%, corado com SYBR[®] Green I (1:1000) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), utilizando como marcador de peso e massa molecular “Low Mass DNA Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), visualizado e fotodocumentado em luz UV (Kodak Gel Logic 212 Imaging System, Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA).

2.3.3 Amplificação por PCR do gene RNAr 16S

A PCR inicial foi realizada com os iniciadores para o gene RNAr 16S: 27F1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1494Rc (5'TACGGCTACCTTGTTACGAC3') (NEILAN et al., 1997). Reações foram realizadas separadamente para cada uma das plantas amostradas nos diferentes locais. Cada reação (25 µL) consistiu em: 0,5 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences, Lituânia, EU), 10 ng de DNA genômico, 2,5 µL de tampão de PCR 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 3 mM de MgCl₂ cada iniciador numa concentração final de 0,25 µM, 200 µM de cada dNTP, numa concentração de 10 mM, 0,5 µL BSA (10µg mL⁻¹) e 1 µL de formamida ultra-pura. O ciclo utilizado para a amplificação em

termociclador TECHNE TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra) foi de: 3 min de desnaturação inicial a 95°C, 30 ciclos de 94°C por 10 s, 50°C por 20 s, e 72°C por 1 min, extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR[®] Green I (1:1000) utilizando como marcador de massa molecular Low Mass DNA Ladder visualizado e fotodocumentado em luz UV.

2.3.4 PCR-DGGE

Os produtos da PCR do gene RNAr 16S obtidos utilizando os iniciadores 27F1/1494Rc, conforme descrito no item acima, foram usados para realizar uma nova amplificação “nested-PCR” com os iniciadores: CYA359F, (5’GGGGAATTTTCCGCAATGGG3’) acrescido de um grampo de 40 bases de GC (5’CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG3’), CYA781aR (5’GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT3’) e CYA781bR (5’GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT3’). Nas reações de “nested-PCR” foi utilizado de 50 a 100 ng do produto da primeira PCR como molde, em uma reação contendo: tampão PCR 1X, 3 mM de MgCl₂, 0,25 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polymerase em um volume total de 25 µL. A amplificação foi conduzida da seguinte maneira: 5 min a 94°C de desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 1 min, e 7 min de extensão final a 72°C. Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% conforme descrito no item 2.3.3.

O gel de DGGE foi montado utilizando o equipamento Ingeny phor U2 system (Ingeny International BV, Goes, Holanda). A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 6% (37.5:1 acrilamida:bisacrilamida) em solução tampão 0,5 X [0.04 M Tris base, 0.02 M acetato de sódio, e 10 mM EDTA (pH 7.4)]. O gradiente do gel de DGGE foi de 25 a 60% de ureia e formamida como desnaturante, 100% desnaturante consistiu em 40% (vol/vol) formamida e 7 M ureia. Foi aplicado o volume total da reação (cerca de 20 µL) acrescido de 3 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30% preparado em tampão 1X TE). O DGGE foi conduzido numa voltagem constante de 100 V a 60°C por 15 h. Decorrido este tempo o gel foi corado com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) e registrado com máquina digital

(SONY Cyber-shot 10.1 Mega Pixels) em transiluminador de luz branca (VariQuest 100, FOTODYNE Incorporated, Hartland, WI, EUA). O perfil eletroforético do DGGE foi avaliado utilizando o sistema de análise de imagem Bionumerics (Applied Maths, NV), as bandas foram identificadas e uma matriz binária foi construída levando em consideração a presença e ausência das bandas.

2.3.4.1 Análise estatística do DGGE

A análise multivariada foi realizada para correlacionar os fatores ambientais (localidade e espécie de planta), com a ocorrência das bandas do DGGE utilizando o pacote de programas PRIMER6 package (PRIMER-E Ltd., Plymouth, Reino Unido), onde foi construída uma matriz de similaridade pelo coeficiente Bray Curtis. Esta matriz de similaridade foi usada para gerar o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS). Os valores de “stress” obtidos na análise NMDS relacionam-se com a confiabilidade da interpretação dos resultados, sendo que valores inferiores a 0,05 mostram que a configuração das amostras no espaço de ordenação indica baixa probabilidade de má interpretação, valores inferiores a 0,2 sugerem a interpretação juntamente com outras ferramentas, e valores superiores a 0,3 não conferem boa representatividade (Ter BRAAK; SMILAUER, 2002). Para observar os padrões de similaridade entre as amostras e a importância desses padrões foi usada a análise de similaridade (ANOSIM) (CLARKE; GREEN, 1988) que é um método estatístico que permite avaliar diferenças entre grupos em um conjunto de dados multivariados. Esta análise produz valor estatístico, R, que representa o nível de separação entre os grupos teste (CLARK, 1993). O valor de R indica o grau de separação entre os grupos de amostras, com uma pontuação 1 indicando dissimilaridade completa e 0 (zero) indicando sobreposição, ou seja, não há diferença entre grupos (CLARKE; GORLEY, 2006).

2.3.5 Construção da biblioteca de clones

As condições de amplificação por PCR do gene de RNAr 16S para a construção das bibliotecas de clones foram as mesmas utilizadas para a análise de DGGE, conforme descrito anteriormente, no entanto o iniciador CYA 359F usado não foi acrescido do grampo de bases GC.

A amplificação por PCR do gene de RNAr 16S foi realizada para cada amostra de DNA de cada planta individualmente. Entretanto, para a construção da biblioteca de clones, as quatro amostras de cada espécie de planta foram combinadas, constituindo 6 bibliotecas: *G. opposita* Santa Virgínia, *G. opposita* Picinguaba, *E. edulis* Santa Virgínia, *E. edulis* Picinguaba, *M. neesii* Santa Virgínia e *G. gardneriana* Picinguaba. Em seguida, estes produtos de amplificação foram quantificados utilizando o fluorímetro Qubit™ (Invitrogen) e ligados em vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, EUA). O vetor pGEM®-T Easy tem 3.015 pb de tamanho, é linearizado com EcoR V e possui a adição de 3' terminal timidina em ambos os lados, sendo que essa terminação aumenta a eficiência da ligação. Para garantir a eficiência de ligação às extremidades dos fragmentos de PCR foi adicionada uma adenina de acordo com a seguinte reação: 2 µL de tampão de PCR (10X), 0,5 µL de dATP (100 µM) e 0,5 U Taq DNA Polymerase, a reação foi incubada a 72 °C por 30 min. Os procedimentos para a clonagem seguiram as instruções do fabricante, da seguinte forma: 20 ng de inserto foram adicionados a 5 µL de tampão, 1 µL de pGEM®, 1 µL de ligase T₄ e água ultra-pura (Millipore) para completar um volume de 10 µL, a reação permaneceu por 1 hora em temperatura ambiente (cerca de 25 °C) e em seguida foi armazenada a 4°C até a etapa seguinte.

A transformação foi realizada com células quimiocompetentes *Escherichia coli* DH5α por choque térmico (SAMBROOK et al., 1989), onde foram adicionados 10 µL dos produtos ligados em 50 µL de células. As colônias transformantes foram selecionadas pela coloração branca - azul, em placas contendo meio LB Agar, X-gal e ampicilina, ambos os últimos na concentração de 100 µg mL⁻¹. Colônias brancas foram selecionadas aleatoriamente, transferidas para novas placas com meio LB Agar, X-gal e ampicilina para confirmação da coloração. Posteriormente, estas foram cultivadas em 1 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µg mL⁻¹) em placas de cultura com 96 poços de 2 mL cada.

2.3.6 Sequenciamento da biblioteca de clones

Os plasmídeos contendo o fragmento do gene de RNAr 16S foram extraídos das células de *E. coli* DH5α da seguinte forma: placas de 96 poços no formato quadrado profundo contendo 1 ml de meio líquido LB (Luria-Bertan) e vedadas com filmes adesivos furados com agulha para

aeração foram usadas para crescer as células de *E. coli* durante 16 horas com agitação (250 rpm) a 37°C. Após esse período, as células foram centrifugadas a $4000 \times g$ por 6 min a 20°C para sua sedimentação. O filme adesivo foi retirado e o sobrenadante descartado. Adicionou-se em cada poço 240 µL de solução GTE (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,5, EDTA 10 mM pH 8,0), as placas foram vedadas com os adesivos e agitadas vigorosamente por 2 min em vórtex, para ressuspender as células. As placas foram novamente submetidas à centrifugação, nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado, e o pélete ressuspensionado em 80 µL da solução GTE por vigorosa agitação em vórtex. Aliquotas (60 µL) da suspensão de células foram transferidas para microplacas de polipropileno de 96 poços (com fundo em U), previamente acrescidas de 1 µL de RNase (20 mg mL⁻¹). Em seguida, adicionou-se a cada poço 60 µL de uma solução de NaOH/SDS 1:1 (NaOH 4M; SDS 10%) e as microplacas foram seladas com o filme adesivo. O conteúdo foi misturado por inversão das microplacas (10 vezes) e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Decorrido este período, as microplacas foram centrifugadas a $4000 \times g$ por 1 min, sendo em seguida, adicionado 60 µL de uma solução de acetato de potássio (3M) e ácido acético glacial (11,5%). As microplacas foram vedadas com adesivos, invertidas 10 vezes para homogeneização e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. As microplacas foram incubadas a 90°C por 30 min, resfriadas em gelo por 10 min e centrifugadas a $4000 \times g$ por 10 min. Uma microplaca-filtro de 96 poços (Millipore PVDF 0,02 µm) foi fixada, com fita adesiva, sobre uma microplaca de polipropileno de 96 poços (com fundo em V). O volume total do sobrenadante de cada poço foi transferido para o poço da placa-filtro. O sistema com a placa-filtro foi então centrifugado por 4 min a $4000 \times g$ para que todo o volume atravessasse o filtro para o poço da microplaca inferior. A microplaca-filtro foi retirada, e 90 µL de isopropanol absoluto foram adicionados ao filtrado que estava no poço com fundo em V. A microplaca foi vedada com adesivo e invertida 10 vezes para homogeneização. A microplaca foi centrifugada por 45 min a $4000 \times g$ a 20°C. O adesivo foi retirado e o sobrenadante descartado. O material precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado, sendo centrifugado por mais 5 min a $4000 \times g$. O sobrenadante foi descartado e a microplaca foi submetida a um pulso de $200 \times g$ na posição invertida sobre um papel absorvente.

As amostras foram secadas em temperatura ambiente e posteriormente ressuspensas em 30 µL de água ultrapura (Millipore) autoclavada e armazenada a -20°C. Os plasmídeos extraídos foram checados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR[®] Green I (1:1000)

utilizando como marcador de massa molecular “Low Mass DNA Ladder” visualizado e fotodocumentado em luz UV.

A reação de sequenciamento foi realizada usando 200 ng de plasmídeo, 10 pmol do iniciador do vetor M13F, 1 µL de DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), 2 µL de tampão (200 mM Tris-HCl pH 9.0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultrapura (Millipore) esterilizada para um volume final de 10 µL, em 25 ciclos de 20 s a 95°C, 15 s a 50°C e 1 min a 60°C. O produto da PCR foi precipitado adicionando-se 2 µL de tampão [acetato de sódio 3M pH 9,0 EDTA 0,5 M pH 8,0 - (1:1)] e 60 µL de etanol 100%, centrifugado por 45 min a 4.000 × g. O sobrenadante foi descartado e posteriormente lavado com 200 µL de etanol 70% centrifugando-se por 10 min a 4.000 × g. Esse processo de lavagem foi repetido, porém com tempo de centrifugação de 5 min. Os péletes contendo DNA foram secos em temperatura ambiente no escuro, ressuspensos em 10 µL de Hi-Di formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sequenciados em um sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3.7 Análises das sequências do gene de RNAr 16S e definição de unidades taxonômicas operacionais

As sequências de nucleotídeos do gene de RNAr 16S “reads” foram analisadas pelo programa Geneious v5.1 (DRUMMOND et al., 2010) para a remoção de bases de baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20), fragmentos do vetor e dos oligonucleotídeos iniciadores. Posteriormente foram comparadas com sequências publicadas no banco de dados GenBank pela ferramenta de busca BLASTn. As sequências representantes de organismos com maiores valores de porcentagem de cobertura, pontuação e identidade foram selecionadas para representar os grupos por afiliação filogenética.

A análise das sequências foi realizada utilizando o programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009). Uma matriz de distância foi gerada e as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) pelo método de agrupamento “Furthest Neighbor”, onde todas

as sequências dentro de cada UTO são no máximo 3 ou 5% distante evolutivamente uma das outras.

2.3.8 Índices de riqueza e diversidade; rarefação e construção de árvore filogenética

A riqueza de cada biblioteca foi estimada pelo índice não-paramétrico de ACE (CHAO; LEE, 1992) e valores representativos de diversidade foram avaliados pelo índice de Simpson (estimador de máxima verossimilhança) utilizando o programa Mothur.

Uma curva de rarefação foi construída baseando-se em um procedimento de randomização, onde são feitas várias reamostragens do conjunto de amostras e em seguida é feita uma média do número de espécies encontradas em cada amostra. A partir dessa média são construídas curvas que representam uma parcela do número de espécies em função do número de indivíduos amostrados. As curvas de rarefação geralmente se desenvolvem rapidamente no princípio, onde as espécies mais comuns são encontradas, e começam a atingir o platô quando apenas espécies mais raras continuam a ser reconhecidas.

A cobertura recíproca das bibliotecas foi analisada utilizando o programa J-libshuff 1.22 (SINGLETON et al., 2001), onde duas bibliotecas são consideradas significativamente diferentes quando a estatística $p < 0,05$. Este método usa o teste normalizador de dados Cramer-von Mises para testar se duas comunidades tem a mesma estrutura (SINGLETON et al., 2001; SCHLOSS et al., 2009). A significância é testada por permutação de sequências entre duas bibliotecas (A e B). Sendo um teste assimétrico, torna possível a biblioteca A ser diferente em relação a B, enquanto B em relação a A pode não ser significativo (YANNARELL et al., 2006).

Um clone representante de cada UTO foi selecionado utilizando o programa Mothur para a construção da árvore filogenética, de maneira que foi considerada como sequência representativa aquela com a menor distância evolutiva entre as demais sequências dentro de cada UTO. Os representantes de cada UTO, juntamente com as sequências representativas dos gêneros de cianobactérias depositadas no GenBank, foram selecionados para a construção da árvore filogenética. Esta foi construída usando a matriz de distância Kimura-2 parameter (KIMURA,

1980) e o método “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987) realizando uma reamostragem de 1000 vezes “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985). Por limitações computacionais, e um grande número de UTOs obtidas, as árvores filogenéticas foram construídas de forma separada, agrupando as UTOs representantes de cada ordem cianobacteriana em uma árvore filogenética distinta, para melhor visualização e interpretação; obtendo-se desta forma seis árvores filogenéticas representando as ordens: Nostocales, Synechococcales, Pseudoanabaenales, Oscillatoriales e Chroococcales e cianobactérias não-cultivadas.

2.3.9 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação de genes de RNAr 16S de cianobactérias foi feita com o intuito de inferir sobre a abundância deste grupo de organismos na filosfera das espécies de plantas estudadas. Para isto, reações de amplificação foram conduzidas em duplicatas para cada amostra de DNA obtidos das superfícies foliares em solução contendo Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG, (Invitrogen), oligonucleotídeos iniciadores (359F, 781aR e 781bR) numa concentração de 0,25 mM cada, 10 ng de DNA e água ultrapura (Millipore) esterelizada, para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada nas mesmas condições descritas no item 2.3.4 no equipamento StepOne Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). Uma curva padrão foi construída a partir de diluições em série 1:10 de DNA plasmidial contendo o fragmento alvo (variando de 0,001 a 10 ng). A curva foi estabelecida relacionando-se as concentrações conhecidas de DNA com os respectivos valores do limiar da fluorescência (Ct – “threshold cycle”), sendo esta posteriormente usada para interpolar a quantificação das amostras.

Após a ciclagem, uma curva de desnaturação foi construída, com temperatura variando de 63 a 94°C, para se confirmar que o sinal de fluorescência era originado especificamente do produto da PCR e não de dímeros de oligonucleotídeos ou outros artefatos da técnica. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct, médio, obtido a partir da média aritmética das duplicatas, para quantificar o número de cópias do gene alvo por cm² de superfície foliar.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Diversidade de cianobactérias na filosfera

Um trabalho prévio sobre os micro-organismos presentes na filosfera de plantas da Mata Atlântica foi desenvolvido por Lambais et al. (2006), onde foi constatado que a diversidade microbiana nesse ambiente é muito maior do que se imaginava. A partir dessa avaliação foi estruturado o projeto temático BIOTA FAPESP intitulado: Diversidade microbiana na filosfera e solo da Mata Atlântica. Este projeto aborda estudos inéditos, incluindo avaliações de comunidades de cianobactérias na filosfera, avaliando sua riqueza, diversidade, importância para a superfície foliar, dentre diversas outras relações com os demais grupos de bactérias e sua contribuição para o ambiente, sendo esta dissertação parte deste projeto temático.

Os dados obtidos neste trabalho a partir do perfil eletroforético de DGGE são indicativos de que a comunidade de cianobactérias é muito rica neste ambiente, verificado pelo alto número de bandas visualizadas pela imagem do gel de DGGE (Figura 9), ao contrário do que foi indicado para colonização de cianobactérias em árvores de manguezais (RIGONATO, 2010). A autora demonstrou que naquele caso a diversidade era baixa devido ao pequeno número de bandas visualizadas no gel de DGGE. Ao analisar o agrupamento gerado pelo dendrograma de similaridade dos perfis eletroforéticos de DGGE (Figura 10), pode-se verificar que existe uma influência exercida pela localização das plantas de acordo com os locais de coleta sobre a comunidade cianobacteriana, porém a variável de maior relevância para a determinação do agrupamento foi espécie de planta. Mais uma vez, contrariamente ao encontrado neste trabalho, Rigonato (2010) em suas análises de filosfera de plantas do manguezal constatou, a partir da análise do dendrograma de similaridade, que os clados se formaram de acordo com os locais dentro do manguezal, sendo espécie de árvores de menor importância. No entanto, os resultados obtidos por Lambais et al. (2006), foram semelhantes aos encontrados neste estudo, relatando que as diferenças entre as comunidades microbianas relaciona-se com as diferentes espécies de plantas avaliadas e não à localização. Essas diferenças foram atribuídas a fatores como diferença na idade das folhas, posição da copa alterando incidência de luz e microclima.

Apesar do ecossistema de manguezal avaliado por Rigonato (2010) estar localizado dentro do bioma Mata Atlântica, observou-se claramente a diferença na colonização das folhas entre os habitats comparados, de maneira que ficou claro que os fatores intrínsecos de cada ambiente refletem diretamente na colonização das folhas pelos micro-organismos, assim como para variações florísticas (CLARK; CLARK; READ, 1998; OLIVEIRA FILHO; FONTES, 2000). Podemos inferir desta maneira, que o PESM apresenta condições climáticas e ambientais, como por ex. variações de temperaturas, incidência de raios solares, variações nas características químicas e físicas do solo, mais homogêneas do que aquelas encontradas nos ambientes de mangue.

Figura 9 - Perfil de bandas de DGGE para filosfera: Marcador (M); *Merostachys neesii* em Sta. Virgínia (1-4); *Garcinia gardneriana* em Picinguaba (5-8); *Euterpe edulis* em Picinguaba (9-12); *Euterpe edulis* em Sta. Virgínia (13-16); *Guapira opposita* em Picinguaba (17-20) e *Guapira opposita* em Sta. Virgínia (21-24)

Figura 10 - Dendrograma de similaridade do perfil eletroforético obtido pela metodologia de DGGE das amostras de folha de Mata Atlântica. *M. neesii* Santa Virgínia; *G. gardneriana* em Picinguaba; *E. edulis* em Picinguaba; *E. edulis* em Sta. Virgínia; *G. opposita* em Picinguaba e *G. opposita* em Sta. Virgínia

A análise NMDS representa os resultados da variação da colonização das folhas pelas cianobactérias nas duas diferentes parcelas do PESM, considerando como variáveis ambientais: as espécies de planta e os locais de coleta (núcleos de Picinguaba e Santa Virgínia). Os resultados da NMDS quando avaliados para a variável localidade indicaram mais uma vez que a colonização da filosfera pelas cianobactérias não depende da localização das plantas (Figura 11), de forma que os pontos referentes a Picinguaba e Santa Virgínia estão dispersos na área do gráfico e não formaram agrupamento distinto (Stress = 0,22). Entretanto, levando-se em consideração a colonização de cianobactérias de acordo com as espécies de plantas (Figura 12) observou-se diferenças na comunidade deste micro-organismo de acordo com a espécie de planta, formando agrupamentos distintos (Stress 0,22). A única exceção foi a espécie *Euterpe edulis*, a qual abriga comunidade cianobacteriana distinta dependendo da localização da planta.

Figura 11 - Análise multivariada de escalonamento multidimensional não-métrico considerando a variável localidade

Figura 12 - Análise multivariada de escalonamento multidimensional não-métrico considerando a variável espécie de planta

A análise estatística de similaridade ANOSIM mostrou que existe uma clara separação de acordo com as espécies de plantas (Tabela 2), sendo que valores próximos a 1 (um) indicam grupos distintos. Para local de coleta o valor gerado para este teste foi de 0,214 (Tabela 3), sendo que valores próximos a zero indicam que não existem diferenças representativas entre grupos, mostrando que não ocorreu separação das amostras por localidade. Sendo assim, este dado está de acordo com aqueles apresentados para o dendrograma de similaridade e NMDS, os quais em conjunto dão grande suporte para a afirmação de que a variável que mais influenciou a colonização da filosfera pelas cianobactérias foi a espécie de planta e a variável localidade passou a ser pouco significativa.

Tabela 2 – Teste estatístico ANOSIM considerando a variável espécie de planta

Grupos	R Estatística	Nível de Significância %
<i>Merostachys</i> x <i>Guapira</i>	0,651	0,2
<i>Merostachys</i> x <i>Euterpe</i>	0,513	0,4
<i>Merostachys</i> x <i>Garcinia</i>	0,781	2,9
<i>Guapira</i> x <i>Euterpe</i>	0,264	1,1
<i>Guapira</i> x <i>Garcinia</i>	0,679	0,2
<i>Euterpe</i> x <i>Garcinia</i>	0,540	0,4

Tabela 3 – Teste estatístico ANOSIM considerando a variável localidade

Local	Estatística R	Nível de significância %
SantaVirgínia x Picinguaba	0,214	0,5%

Bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S foram feitas afim de se acessar a diversidade visualizada a partir dos dados apresentados para a metodologia de DGGE. Após todas as triagens (sequências com qualidade superior a 20, similaridade com sequências de cianobactérias do GenBank, remoção de quimeras) foram consideradas 980 sequências válidas, distribuídas de acordo com a espécie de planta e de cada local coletado (Tabela 4), agrupados em 10 gêneros cianobacterianos diferentes (Figura 13) e na grande maioria em sequências de cianobactérias não cultivadas (Tabela 5).

Tabela 4 – Clones obtidos a partir de bibliotecas genômicas de RNAr 16S e sua distribuição entre as espécies de plantas estudadas

Local	Espécie	clones
Santa Virgínia	<i>Merostachys neesii</i>	193
Santa Virgínia	<i>Euterpe edulis</i>	151
Picinguaba	<i>Euterpe edulis</i>	186
Picinguaba	<i>Guapira opposita</i>	148
Santa Virgínia	<i>Guapira opposita</i>	146
Picinguaba	<i>Garcinia gardneriana</i>	156
Total		980

Figura 13 – Distribuição dos gêneros de cianobactérias entre as espécies de plantas estudadas, para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (SV) e *E. edulis*, *G. opposita* e *G. gardneriana* em Picinguaba (P)

Tabela 5 – Distribuição de clones com similaridade à cianobactérias não cultivadas na filosfera das plantas estudadas

	<i>M. neesii</i> SV	<i>G. opposita</i> P	<i>E. edulis</i> P	<i>G. gardneriana</i> P	<i>G. opposita</i> SV	<i>E. edulis</i> SV
Cianobactérias não cultivadas	108	119	123	81	124	146

Pode-se considerar que o ambiente estudado foi corretamente representado, uma vez que o índice de cobertura estimada (ICE) das bibliotecas variou de 70 a 85% para gênero (Figura 14) e de 65 a 80% para espécie (Figura 15). A rarefação calculada para as bibliotecas com UTOs a 0,05 de distância evolutiva (Figura 16) mostraram que a probabilidade de se encontrar uma maior diversidade de UTOs para gênero é pequena, já que as curvas estão próximas da assíntota. A rarefação construída com distância evolutiva 0,03 (Figura 17) indicou que ainda existe a probabilidade de se encontrar novas UTOs deste nível taxonômico neste hábitat.

Kemp e Aller (2003, 2004) abordaram a técnica de biblioteca de clones do gene RNAr 16S e demonstraram que a melhor forma de se avaliar os dados quanto a diversidade de micro-organismos foi através dos índices de diversidade, riqueza e cobertura. Neste contexto, Jackson e

Denney (2011) em suas pesquisas avaliando a variação da comunidade bacteriana associado com folhas de *Magnolia grandiflora* obtiveram entre 70 e 85 % de cobertura. Nunes (2010) avaliou a diversidade de micro-organismos na filosfera de árvores de Mata Atlântica e atingiu uma cobertura que variou entre 50 e 70%. Já na pesquisa desenvolvida por Ruiz (2010), a cobertura máxima alcançada para a diversidade de micro-organismos na filosfera de *Maytenus robusta* foi de 56%. Lambais et al. (2006) foram pioneiros nas pesquisas com filosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica e obtiveram uma cobertura variando de 67 a 81%. Com base nos resultados obtidos nestas pesquisas, o índice de cobertura estimada de cianobactérias na filosfera das plantas estudadas foi representativo, pois os valores foram semelhantes ou superiores aos encontrados em outros estudos.

Figura 14 - Índice de cobertura estimada (ICE) calculado para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (barra laranja) e *G. gardneriana*, *G. opposita* e *E. edulis* em Pinguaba (barra azul) (distância evolutiva 0,05)

Figura 15 – Índice de cobertura estimada (ICE) calculado para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (barra laranja) e *G. gardneriana*, *G. opposita* e *E. edulis* em Picinguaba (barra azul) (distância evolutiva 0,03)

Figura 16 - Curvas de rarefação calculada com distância evolutiva 0,05 para as sequências obtidas para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (SV) e *E. edulis*, *G. opposita* e *G. gardneriana* em Picinguaba (P)

Figura 17 – Curvas de rarefação calculada com distância evolutiva 0,03 para as sequências obtidas para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (SV) e *E. edulis*, *G. opposita* e *G. gardneriana* em Picinguaba (P)

A riqueza de espécies foi avaliada pelo índice ACE (CHAO; LEE 1992) onde as sequências são agrupadas de acordo com sua frequência de observação em raras e abundantes. No geral, não foi possível verificar diferenças estatísticas com relação ao índice de riqueza para as bibliotecas avaliadas.

Merostachys neesii (Figura 18) foi a espécie que apresentou o maior valor para o índice de riqueza ($405,1 \pm 139,24$), apesar de estatisticamente não significativo quando comparado com as demais espécies. De acordo com Filgueiras (1988), os bambus distinguem-se das demais gramíneas por uma série de caracteres morfológicos, anatômicos, fisiológicos e ecológicos. Segundo Janzen (1976), Soderstrom e Calderón (1979) e Schmidt (2009), o ciclo de floração registrado para diferentes espécies de bambus oscila entre 3 e 120 anos, ou seja, durante este período as plantas crescem vegetativamente, depois florescem, produzem grandes quantidades de sementes e, em geral, morrem causando um profundo impacto na dinâmica da floresta.

Considerando seus aspectos biológicos, os bambus formam grandes touceiras, conferindo resistência a alterações climáticas. Esta espécie foi encontrada apenas na parcela de Santa Virgínia, a qual possui um relevo extremamente acidentado, e foi considerada abundante neste local, talvez por sua capacidade de se adaptar às dificuldades de relevo. Unindo suas características de resistência e sua adaptação as condições do local com seu ciclo de vida longo, ela foi considerada uma excelente espécie para a colonização por cianobactérias, e talvez este seja

o motivo pelo qual a filosfera desta espécie vegetal abrigue um vasto número de cianobactérias (refletido pelo índice de riqueza). Uma vez que os bambus são geralmente adaptados a invadir áreas perturbadas, é possível na Mata Atlântica encontrar espécies ocorrendo em elevadas densidades em clareiras, alterando a dinâmica das populações e a estrutura da comunidade invadida. Resultados obtidos no estudo de Tabarelli e Mantovani (1999, 2000), aliados às informações sobre a ecologia de bambus e bambusóides, sugerem que na floresta atlântica montana este grupo de plantas pode ocupar o nicho das árvores e dos arbustos pioneiros, afetando a densidade, a diversidade e a riqueza local de espécies pioneiras e espécies tolerantes à sombra.

Guapira opposita (Figura 18) abriga uma comunidade cianobacteriana com alta riqueza apenas na parcela de Santa Virgínia ($329,7 \pm 119,79$), enquanto que a mesma espécie avaliada em Picinguaba teve o menor valor de riqueza observado neste estudo ($149,0 \pm 55,3$). Extratos vegetais da espécie *Guapira opposita* da família Nyctaginaceae têm suas propriedades etnofarmacológicas avaliadas para tratamento de diversas patologias, tais como atividade antituberculose, antiinflamatória e cicatrizante (COELHO et al., 2005; PAVAN et al., 2009). Estudos relatam as propriedades antifúngicas e antimicrobianas para bactérias gram-negativas, o que pode ser responsável pela inibição do crescimento de algumas espécies de bactérias e o desenvolvimento de outras.

Euterpe edulis (Figura 18) apresentou uma riqueza representativa em ambas às parcelas (Sta Virgínia e Picinguaba) ($311, 9 \pm 120,53$ e $327, 7 \pm 98,11$ respectivamente). França (2006) descreveu *Euterpe edulis* como uma importante espécie bioacumuladora, acumulando o elemento ferro em suas folhas. Neste contexto, Freiberg (1998) e Karamanoli (2005) afirmaram que a disponibilidade de nutrientes na folha pode influenciar sua colonização. A abundância, endemismo, e a presença de nutrientes, nas folhas de *E. edulis*, podem ter sido fatores relevantes para a alta colonização por cianobactérias.

Figura 18 – Índice de riqueza ACE obtido para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (barra azul) e *G. gardneriana*, *G. opposita* e *E. edulis* em Picinguaba (barra laranja) (distância evolutiva 0,03)

A diversidade de espécies foi avaliada pelo índice de Simpson (SIMPSON, 1949) (Figura 19), sendo que para este índice valores iguais ou próximos a zero representam alta diversidade e próximos a 1 (um) baixa diversidade. Este índice foi o primeiro a ser usado em estudos ecológicos e exprime, basicamente, a abundância das espécies mais comuns, sendo consequentemente, mais sensível a mudanças que ocorrem nestas espécies. Washington (1984), examinando a aplicabilidade de diferentes índices de diversidade à sistemas biológicos, observou que o índice de Simpson foi o que melhor expressou as condições estudadas. Por estes motivos este índice foi escolhido para representar a diversidade neste estudo. Os resultados obtidos com o índice de diversidade Simpson foram em maioria complementares aos encontrados para o índice de riqueza. As espécies *E. edulis* (Sta Virgínia e Picinguaba) e *G. opposita* (Sta. Virgínia) apresentaram alta diversidade (0,01). No caso de *G. opposita* e *G. gardneriana* em Picinguaba a diversidade foi intermediária (0,03 e 0,04 respectivamente). *M. neesii* representou a menor diversidade em comparação com as demais espécies (0,05). Considerando, a partir dos resultados estatísticos, que *M. neesii* apresentou valores altos para o índice riqueza, porém baixa diversidade de espécies, pode-se inferir que as espécies abundantes na filosfera desta planta exerceram uma forte pressão sobre espécies menos abundantes e, desta forma, as que estão adaptadas e em maior número se sobressaíram aumentando a riqueza (abundância numérica) e diminuindo a diversidade (abundância de espécies).

Os resultados encontrados para *Guapira opposita* mostraram que os indivíduos coletados em Santa Virgínia apresentaram em suas folhas maior riqueza e diversidade de cianobactérias quando comparadas com os índices de diversidade e riqueza para a mesma espécie no núcleo de Picinguaba. De acordo com Chazdon et al. (1996), Whitmore (1996) e Zhang et al. (2003), nos diferentes habitats a densidade do fluxo de fótons fotossintéticos varia temporal e espacialmente, provocando nas plantas o desenvolvimento de mecanismos de plasticidade para o estabelecimento em locais sob diferentes regimes de luminosidade. Pode-se inferir que a incidência luminosa em Santa Virgínia era (visualmente) inferior à incidência em Picinguaba; tais diferenças podem gerar alterações na estrutura foliar que são capazes de alterar a comunidade microbiana associada ao filopiano. Jackson e Denney (2011) fizeram análises de DGGE e biblioteca para avaliar a comunidade de micro-organismos na filosfera de *Magnolia grandiflora*, mostrando variações na comunidade em função de mudanças sazonais. Como o perfil do DGGE se agrupou de acordo com as estações, assim como as espécies representadas nas bibliotecas, os autores sugerem que estas mudanças podem estar relacionadas com incidência de luminosidade e outros fatores ambientais que se alteram em diferentes estações e ao longo do ano.

Figura 19 – Índice de diversidade Simpson obtido para as bibliotecas genômicas de RNAr 16S de filosfera de *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (barra azul) e *G. gardneriana*, *G. opposita* e *E. edulis* em Picinguaba (barra laranja) (distância evolutiva 0,03)

As sequências de todas as bibliotecas foram agrupadas em um total de 384 UTOs (Figura 20), sendo que 257 UTOs continham sequências únicas “singletons” e 63 foram compostas de duas sequências “dobletons” (Tabela 6), sendo que “dobletons” e “singletons” não foram representadas na Figura 21.

Apenas a UTO 3 (três) conteve representantes de todas as seis bibliotecas, apresentando similaridade com cianobactérias não cultivadas, sendo esta a terceira UTO mais abundante em número de sequências (43 sequências). Algumas UTOs foram preferencialmente de um local amostrado, representando apenas uma biblioteca: *M. neesii* Sta. Virgínia – as UTOs 38, 40, 51 e 52, similares a cianobactérias não cultivadas, e a UTO 39 similar a *Nostoc. E. edulis* Picinguaba – UTO 30 com similaridade à *Stigonematales*, e UTOs 36, 41, 56 e 57 com similaridade à não cultivadas. *E. edulis* Sta. Virgínia - com as UTOs 48, 49 e 70 similares a não cultivadas. *G. opposita* Sta Virgínia com as UTOs 32, 45, 46 e 69 similares a não cultivadas e 67 similar a *Stigonematales*. *G. opposita* Picinguaba – com as UTOs 44, 63, 64 e 65 com similaridade a não cultivadas e *G. gardneriana* Picinguaba – com as UTOs 43 e 62 com similaridade a não cultivadas (Figura 21).

Tabela 6 – UTOs formadas por sequências únicas (*singletons*) e duplas (*doubletons*). *Merostachys neesii* Santa Virgínia (MN SV), *Garcinia gardneriana* Picinguaba (GG P), *Guapira opposita* Santa Virgínia (GO SV), *Guapira opposita* Picinguaba (GO P), *Euterpe edulis* Santa Virgínia (EE SV) e *Euterpe edulis* Picinguaba (EE P)

	MN (SV)	GG(P)	GO (SV)	GO (P)	EE (SV)	EE (P)
singletons	52	36	20	54	43	52
doubletons	8	4	5	19	10	17

Figura 20 – Distribuição de sequências por UTO em cada biblioteca da filosfera das espécies da Mata Atlântica (distância evolutiva 0,03)

Foram encontrados neste estudo cinco gêneros pertencentes ao grupo de organismos filamentosos heterocitados (*Anabaena*, *Brasilonema*, *Scytonema*, *Stigonema* e *Nostoc*) dois gêneros unicelulares representantes de duas ordens (Chroococcales - *Chroococcidiopsis*, Synechococcales - *Synechococcus*) e três gêneros filamentosos homocitados também de duas ordens (Oscillatoriales - *Pseudophormidium* e *Arthrospira* e Pseudoanabaenales - *Leptolyngbya*) de acordo com a classificação de Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005).

A ordem Nostocales predominou nas folhas das espécies de plantas *G. gardneriana* e *M. neesii*. Esses resultados são semelhantes aos achados de Alvarenga (2011) que encontrou predominância da ordem Nostocales em folhas de *Avicennia schaueriana*, que apresenta altas taxas de excreção de sais pelas glândulas foliares. De acordo com Castardo (2007), foi extraído principalmente das folhas de *G. gardneriana* biflavonóides que possuem atividade antibacteriana. A liberação de flavonóides nas folhas de *G. gardneriana* e as altas taxas de sal nas folhas de *Avicennia schaueriana* são resultados congruentes quanto à capacidade de Nostocales se adaptar a condições adversas. O potencial para fixação de N_2 de algumas linhagens da ordem Nostocales é um indicativo de que elas possivelmente são fonte de nitrogênio para a microbiota da filosfera e/ou para a planta hospedeira, além de serem importantes para o sucesso da colonização do ambiente e para a competição com outros micro-organismos. Abril, Torres e Bucher (2005) reportaram a importância dos grupos de micro-organismos na fixação de nitrogênio em populações da filosfera em cinco espécies de árvores dominantes em ambiente semi-árido na Argentina. Sustentaram ainda que em ambientes tropicais as cianobactérias devam ser consideradas organismos relevantes na fixação de nitrogênio nas folhas.

O gênero *Synechococcus* apresentou alta representatividade, principalmente em folhas de *M. neesii*. Algumas linhagens deste gênero são fixadoras de N_2 e apesar de não possuírem heterócito para separação dos processos de fotossíntese e de fixação, elas fazem uma separação temporal, sendo que a fixação de nitrogênio só ocorre no escuro, mostrando um ciclo circadiano bem definido. Uma hipótese pode ser considerada, pois de acordo com Echevest, Agustí e Dachs (2010) o tamanho das células é um fator importante e determina sensibilidade a agentes tóxicos e poluentes. Neste contexto, sabendo que *Synechococcus* foi abundante apenas na parcela de Santa Virgínia (“zona intangível”), podemos inferir que este gênero de cianobactéria teve um ambiente adequado para seu desenvolvimento, pois o bambu está localizado em uma parcela não

antropizada e possui características que o torna menos vulnerável a adversidades ambientais e toxicológicas.

O gênero *Brasilonema* foi recentemente descrito (FIORE et al., 2007; AGUIAR et al., 2008) e foi isolado de folhas de bromélia (*B. bromeliae* – FIORE et al., 2007), orquídea (*B. octagenarum* UFV-ORI – AGUIAR et al., 2008) e eucalipto (*B. octagenarum* UFV-EI – AGUIAR et al., 2008) e neste estudo foram encontrados representantes desse gênero em folhas de espécies da Mata Atlântica. O maior número de sequências com alta similaridade foi encontrado nas folhas de *E. edulis* que são folhas longas, pinadas e com alto teor de elementos nutricionais (CONTE, 2004; FRANÇA, 2006; REIS et al., 2000).

Sequências com similaridade a *Leptolyngbya* foram encontradas nas folhas de *G. gardneriana* e *G. opposita* em Picinguaba, e apesar de serem pouco representativas em número de sequências, merecem destaque, pois algumas linhagens deste gênero são fixadoras de N₂ (BERGMAN et al., 1997; FIORE; HONDA, 2008; YAMAZAKI; NOMATA; FUJITA, 2006). Outros gêneros com menor representabilidade em número de sequências também foram encontrados na filosfera das espécies de plantas selecionadas neste estudo, totalizando 10 gêneros de cianobactérias.

Muitos estudos indicam que o N₂ pode ser fixado pelas bactérias presentes na filosfera (BENTLEY, 1987; FREIBERG, 1998; FRITZ SHERIDAN; PORTÉCOP, 1987). Furnkranz et al. (2008) em seus estudos sobre bactérias fixadoras de nitrogênio na filosfera de espécies de árvores em uma floresta da Costa Rica, constataram que as cianobactérias eram o grupo de diazotróficos mais abundante, sendo que a maioria das sequências obtidas apresentavam alta similaridade com *Nostoc* spp., *Tolypothrix distorta*, *Fischerella* spp. e cianobactérias não cultivadas. O estudo concluiu que as cianobactérias consistem em uma importante fração da comunidade diazotrófica responsável pela incorporação de N₂ e que são a chave da fixação deste nutriente neste tipo de ambiente. Dojani et al. (2007) relataram a importância das cianobactérias formadoras de biofilmes na entrada de nitrogênio no solo em uma floresta tropical na Guiana Francesa. Um dos gêneros mais abundantes foi *Chroococcidiopsis*, seguido por *Stigonema* e *Scytonema*, destacando que várias linhagens destes gêneros podem fixar nitrogênio atmosférico. Estes gêneros também

foram encontrados neste estudo, concluindo mais uma vez a importância das cianobactérias na fixação do nitrogênio.

Em todos os pontos amostrados foi encontrado um grande número de sequências semelhantes a cianobactérias não cultivadas, mostrando que ainda existe uma grande diversidade a ser descoberta.

A diferença na composição de espécies entre locais (diversidade beta) foi analisada pela comparação das bibliotecas pela ferramenta estatística J-libshuff (Tabela 7) e verificou-se que todas as bibliotecas diferem entre si (valores inferiores a 0,05 representam bibliotecas estatisticamente diferentes). Singleton et al. (2001) fizeram comparações quantitativas de bibliotecas do gene RNAr 16S de amostras ambientais e consideraram o teste J-libshuff como essencial para se comparar a composição das mesmas, avaliando as sobreposições.

Os achados neste estudo corroboram com os resultados obtidos por Nunes (2010) que avaliou a comunidade bacteriana da filosfera de plantas cultivadas (cana-de-açúcar, soja e eucalipto) e de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica e concluiu que cada planta possui sua própria comunidade microbiana. Em contrapartida, Ruiz (2010), avaliando a comunidade de bactérias na filosfera de *Maytenus robusta* em diferentes estações ecológicas da Mata Atlântica, verificou que a comunidade é influenciada principalmente pela localização geográfica, sugerindo que a relação planta/localização geográfica estabelece uma comunidade única.

Tabela 7 – Valores de p para comparação múltipla entre bibliotecas genômicas RNAr 16S das populações de cianobactérias (distância evolutiva 0,03). MN (SV) *M. neesii* Santa Virgínia; GO (SV) *G. opposita* Santa Virgínia; GO (P) *G. opposita* Picinguaba; EE (SV) *E. edulis* Santa Virgínia; EE (P) *E. edulis* Picinguaba e GG (P) *G. gardneriana* Picinguaba

	MN (SV)	GO (SV)	GO (P)	EE (SV)	EE (P)	GG (P)
MN (SV)	–	0.00668141	0.00484706	0.00756971	0.00392055	0.00327205
GO (SV)	0.00992480	–	0.00919362	0.00562515	0.00656369	0.01032109
GO (P)	0.00772298	0.00918057	–	0.00808927	0.00375711	0.00807945
EE (SV)	0.00719970	0.00182408	0.01281164	–	0.00502275	0.00582968
EE (P)	0.01244325	0.01133049	0.00616229	0.00846113	–	0.00932629
GG (P)	0.00804932	0.01215003	0.00629727	0.01433201	0.00589242	–

P-value = 0,0001.

As árvores filogenéticas construídas mostraram a grande similaridade das UTOs com sequências encontradas no banco de dados (GenBank). UTOs representantes de cianobactérias não cultivadas se agruparam com a ordem Chroococcales (Figura 21) (UTOs 186, 202 e 313), mostrando que ainda existe uma diversidade de cianobactérias desta ordem que não foi acessada, ou então não tiveram as sequências do gene RNAr 16S publicadas no banco de dados consultado. As UTOs representantes afiliadas nesta árvore filogenética estão preferencialmente distribuídas na parcela de Picinguaba na espécie arbórea *Garcinia gardneriana*, sendo que não foram encontradas representantes colonizando *M. neesii* e *E. edulis*. A árvore filogenética para a ordem Synechococcales (Figura 22), que foi representada neste estudo exclusivamente pelo gênero *Synechococcus*, teve 45% das UTOs representantes originadas da espécie *M. neesii* em Santa Virgínia, conforme já constatado neste estudo. Além disso algumas UTOs representante de cianobactérias não cultivadas também se agruparam a esta ordem (UTOs 351, 361, 266, 210, 360, 367, 139 e 256).

Figura 21 – Árvore filogenética de sequências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para a ordem Chroococcales e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

Figura 22 - Árvore filogenética de sequências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para a ordem Synechococcales e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

Para a árvore filogenética de Oscillatoriales (Figura 23) as UTOs 180, 211 e 308 também são representantes de cianobactérias não cultivadas, mostrando mais uma vez que no caso das filamentosas também existe uma grande diversidade que não é conhecida. As UTOs afiliadas a esta árvore se distribuem igualmente em *M. neesii* e *G. opposita* em Santa Virgínia e em Picinguaba nas espécies *G. gardneriana* e *G. opposita*. No caso da árvore filogenética com representantes da ordem Pseudoanabaenales (Figura 24), as UTOs 199, 294, 191, 182, 342 e 363 eram representantes de cianobactérias não cultivadas e ocorreu a formação distinta de dois clados, sabe-se que o gênero *Leptolyngbya* é polifilético e de acordo com vários autores precisa ser revisado (ALBERTANO; KOVÁČIK, 1994; JOHANSEN et al., 2008; WILMOTTE; STAM; DEMOULIN, 1997). As UTOs agrupadas a esta ordem se distribuíram em *G. opposita* e *G. gadneriana* em Picinguaba e *M. neesii* e *E. edulis* em Santa Virgínia.

Figura 23 – Árvore filogenética de sequências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para a ordem Oscillatoriales e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

Figura 24 - Árvore filogenética de sequências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para a ordem Pseudoanabaenales e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

No caso da afiliação a sequências de Nostocales (Figura 25), que foi a ordem representada com o maior número de gêneros, as UTOs são provenientes das espécies *G. gardneriana* e *E. edulis* em Picinguaba e *M. neesii* em Santa Virgínia. De acordo com Casamatta et al. (2006), as Nostocales apresentam percentual de similaridade muito alto entre si, o que dificulta a separação em gêneros e espécies.

Figura 25 - Árvore filogenética de sequências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para a ordem Nostocales e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

As sequências representativas de cianobactérias não cultivadas que não se afiliaram a nenhum grupo de cianobactérias na árvore filogenética estão representadas na figura 26. Estas sequências são muito distintas das publicadas no banco de dados, e estão distribuídas de forma homogênea em todas as espécies de plantas analisadas neste estudo, mostrando mais uma vez a grande diversidade de cianobactérias que ainda não foi acessada. Rigonato (2010) também observou a formação de um clado separado na árvore filogenética com UTOs representantes de sequências de cianobactérias não cultivadas obtidas da filosfera de árvores presentes no manguezal, localizado na Mata Atlântica. A autora indica que este fato representa um forte indício de que novos gêneros ainda não acessados estão presentes na filosfera destas árvores.

Sendo assim, a filogenia apresentada neste estudo indica mais uma vez a especificidade na colonização de folhas das diversas árvores e de bambu por espécies de cianobactérias.

Figura 26 - Árvore filogenética de sequências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para as cianobactérias não cultivadas e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

Figura 26 - Árvore filogenética de seqüências de RNAr 16S de clones de cianobactérias colonizadoras da filosfera de plantas da Mata Atlântica, baseada em 1000 reamostragens. Filogenia para as cianobactérias não cultivadas e gráfico indicando a origem das UTOs selecionadas

Para o PCR em tempo real, a variação dos Cts dentro de cada diluição (1:10 a 1:10⁵) foi igualmente distribuída, variando exatos 4 ciclos para cada ponto, o que permitiu traçar uma curva de calibração (Figura 27) representando os fatores de eficiência de amplificação de 87% e de R² de 0,99 e assim estimar com grande confiança o número de cópias de RNAr 16S por cm² de folha das espécies de plantas avaliadas.

Figura 27 – Curva de calibração do PCR em tempo real estabelecida com média de três leituras para 5 pontos com diluições de 1:10 a 1:10⁵

A maioria dos trabalhos de qPCR em filosfera até o momento estão restritos a estudos com interações planta-patógeno e contagem de células de cianobactérias e bactérias totais em monoculturas de interesse comercial (BELKIN; RAZ, 2010; RASTOGI et al., 2010; ZWIELEHNER et al., 2008). Diversos trabalhos empregam o PCR em tempo real para detecção de cianobactérias, porém estes trabalhos se restringem quase que exclusivamente a contagem de cianobactérias produtoras de microcistina e outras toxinas em ambientes aquáticos (AL TEBRINEH et al., 2010; BRIAND et al., 2008; KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003; SCHÖBER; KURMAYER, 2006; SCHÖBER et al., 2006; SIPARI et al., 2010; VAITOMAA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2007).

Lindow e Leveau (2002) afirmaram que as bactérias são de longe os colonizadores mais numerosos das folhas, podendo ser colonizadas por até 10⁷ células/cm² de superfície da folha. Neste estudo a quantificação (Figura 28) mostrou que o número de cópias de RNAr 16S por cm² de folha é maior para a espécie *M. neesii* (6 x 10⁶ cópias de RNAr 16S por cm² de folha) o que corrobora com os achados em relação a riqueza, ou seja, abundância numérica, e baixa variedade

de espécies. Seguido das espécies: *E. edulis* Picinguaba (4×10^6 cópias de RNAr 16S por cm^2 de folha), *E. edulis* Sta. Virgínia (4×10^5 cópias de RNAr 16S por cm^2 de folha), *G. opposita* Sta. Virgínia (4×10^5 cópias de RNAr 16S por cm^2 de folha). Para *G. opposita* e *G. gardneriana* em Picinguaba, os valores foram menores, com 3×10^6 cópias por cm^2 de folha, o que é congruente com os baixos valores dos índice de diversidade e riqueza, sendo espécies de plantas colonizadas por uma quantidade menor de cianobactérias e estas por sua vez não apresentam abundância numérica na colonização.

Figura 28 – Quantificação por PCR tempo real das amostras de folhas das espécies de plantas: *M. neesii*, *G. opposita*, *E. edulis* em Santa Virgínia (barra rosa) e *G. gardneriana*, *G. opposita* e *E. edulis* em Picinguaba (barra vermelha)

Os dados obtidos nesta pesquisa mostraram a grande diversidade encontrada na filosfera, e o quanto ainda permanece inacessado. Este estudo mostrou que a diversidade dos grupos de microrganismos está diretamente relacionada com as características da planta, tornando ainda maior a diversidade que pode ser encontrada em um ambiente como a Mata Atlântica. Esses estudos são importantes e urgentes, visto que restam poucas áreas preservadas e muitas relações micro-organismos/planta precisam ser desvendadas. As cianobactérias desempenham um papel essencial nestes processos e merecem uma atenção especial dentre de todas essas inter-relações.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados obtidos com este trabalho, pode-se inferir:

- Verificou-se diferenças na comunidade de cianobactérias que colonizam as espécies de plantas estudadas, constatando que as sequências do gene de RNAr 16S se agruparam de acordo com as espécies de planta, indicando que a localização geográfica não foi o fator relevante na colonização da filosfera pelas cianobactérias.
- Em relação às ordens de cianobactérias, houve um predomínio de sequências afiliadas a Nostocales, principalmente em *G. gardneriana* e *E. edulis* em Picinguaba e em *M. neesii* em Santa Virgínia.
- Considerando a afiliação das sequências a gêneros, o mais abundante foi o gênero *Synechococcus*, pertencente à ordem Synechococcales, dominando notoriamente a filosfera de *M. neesii* em Santa Virgínia.
- As espécies de plantas selecionadas para o estudo apresentam características fisiológicas e ecológicas peculiares que pode torná-las ímpares quanto a colonização por micro-organismos.
- Com as técnicas de análises independentes de cultivo empregadas neste trabalho, foi possível acessar 10 gêneros de cianobactérias e muitas sequências do gene de RNAr 16S tiveram alta similaridade com cianobactérias não cultivadas mostrando que ainda existe uma grande diversidade a ser descoberta neste hábitat.
- Não foi observado um padrão quanto à riqueza e diversidade, sendo que as variações foram distribuídas entre as diferentes espécies e localidades.
- Os resultados obtidos com os índices de riqueza e diversidade corroboram com a quantificação de cópias por cm² de folha (PCR em tempo real), sendo que *M. neesii* mostrou ser a espécie com maior número de cópias. Para as demais espécies a quantificação também foi congruente com os dados de riqueza e diversidade.
- Há uma predominância de gêneros com linhagens capazes de fixar N₂, que é um indicativo de que elas possivelmente são fonte de nitrogênio para a microbiota da filosfera e/ou para a planta hospedeira, além de serem importantes para o sucesso da colonização do ambiente e para a competição com outros micro-organismos.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A.B.; TORRES, P.A.; BUCHER, E.H. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. **Journal of Tropical Ecology**, New York, v. 21, p. 103-107, 2005.
- AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 1322-1334, 2008.
- AL-TEBRINEH, J.; MIHALI, T. K.; POMATI, F.; NEILAN, B.A. Detection of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in Environmental water blooms by Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, n. 23, p. 7836-7842, 2010.
- ALBERTANO, P.; KOVÁČIK, L. Is the genus *Leptolyngbya* a homogeneous taxon? **Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p. 37-51, 1994.
- ALVARENGA, D.O. **Caracterização polifásica de cianobactérias da filosfera de *Avicennia schaueriana***. 2011. 105 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1: Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 38, p. 291-302, 1985.
- ANDREOTE, F. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ARAÚJO, L.L.A. **Complexidade da acumulação de elementos químicos por árvores nativas da Mata Atlântica**. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- ARAYA, R.; TANI, K.; TAKAGI, T.; YAMAGUCHI, N.; NASU, M. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 111-119, 2003.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, Los Angeles, v. 2, p. 69-92, 2009.
- ASARI, N.; ISHIHARA, R.; NAKAJIMA, Y.; KIMURA, M.; ASAKAWA, S. Cyanobacterial communities of rice straw left on the soil surface of a paddy field. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 605-612, 2008.

ASHELFORD, K.E.; CHUZHANOVA, N.A.; FRY, J.C.; JONES, A.J.; WEIGHTMAN, A.J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 7724–7736, 2005.

BALDOTO, L.E.B.; OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 918-931, 2008.

BARTHLOTT, W.; MUTKE, J.; RAFIQPOOR, M.D.; KIER, G.; KREFT, H. Global centres of vascular plant diversity. **Nova Acta Leopoldina**, Leipzig, v. 92, p. 61-83, 2005.

BELKIN, S.; QVIT-RAZ, N. Life on a leaf: bacterial epiphytes of a salt-excreting desert tree. In: SECKBACH, J.; GRUBE, M. (Ed.). **Symbioses and stress: joint ventures in biology, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology**. Dordrecht: Springer, 2010. v. 17, p. 393-406.

BENTLEY, B.L. Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 74, n. 2, p. 234-241, 1987.

BERGMAN, B.; GALLON, J.R.; RAI, A.N.; STAL, L.J. N-fixation by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 19, p. 139-185, 1997.

BLANK, C.E.; SÁNCHEZ-BARACALDO, P. Timing of morphological and ecological innovations on the cyanobacteria – a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. **Geobiology**, Malden, v. 8, p. 1-23, 2010.

BLUM, H.; BEIER, H. GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in Polyacrilamide Gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOLD, H.D.; WYNE, M.J. **Introduction to the algae, structure and reproduction**. 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985. 720 p.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W.F. Ribosomal RNA homologies and evolution of the filamentous blue-green bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 10, p. 283-291, 1978.

BRIAND, E.; YÉPRÉMIAN, C.; HUMBERT, J.; QUIBLIER, C. Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 10, n. 12, p. 3337-3348, 2008.

BROCK, T.D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. **Science**, Washington, n. 179, p. 480-483, 1973.

BROWN, M.V.; SCHWALBACH, M.S.; HEWSON, I.; FUHRMAN, J.A. Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 7, n. 9, p. 1466–1479, 2005.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 219-252, 1992.

CASAMATTA, D.A.; GOMEZ, S.R.; JOHANSEN, J.R. *Rexia erecta* gen. nov. et sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 561, p. 13-26, 2006.

CASTARDO, J.C. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcólico bruto da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos.** 2007. 137 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CASTENHOLZ, R.W. Oxygenic photosynthetic bacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 473-600.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. p. 1710-1799.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistics Association**, New York, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHAZDON, R.L.; PEARCY, R.W.; LEE, D.W.; FETCHER, N. Photosynthetic responses of tropical forest plants to contrasting light environments. In: MULKEY, S.S.; CHAZDON, R.L.; SMITH, A.P. (Ed.). **Tropical forest plant ecophysiology**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 5-55.

CLARK, D.B.; CLARK, D.A.; READ, J.M. Edaphic variation and the mesoscale distribution of tree species in a neotropical rain forest. **Journal of Ecology**, Malden, v. 86, p. 101-112, 1998.

CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, Canberra, v. 18, p. 117-143, 1993.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **Primer 6.0**: user manual/tutorial. Plymouth: Primer-E, 2006. 190 p.

CLARKE, K.R.; GREEN, R.H. Statistical design and analysis for a biological effects study. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf Luhe, v. 46, p. 213-226, 1988.

COELHO, F. B. R., DAL BELO, C. A., LOLIS, S. F., SANTOS, M. G., Levantamento Etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* MART. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**. 2004. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

COUTINHO, L.M. O conceito de mata atlântica. In: LOPES, M.I.M.S.; KIRIZAWA, M.; MELO, M.M.R.F. (Ed.). **Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba: a antiga estação da rocha do alto da serra**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2009. p. 99-104.

DOJANI, E.; LAKATOS, M.; RASCHER, U.; WANEK, W.; LUTTGE, U.; BUDEL, B. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Kusterdingen, v. 202, n. 7, p. 521-529, 2007.

DRUMMOND, A.J.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S.; THIERER, T.; WILSON, A. **Geneious v5.1**. 2010. Disponível em: <<http://www.geneious.com>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

DULLA, G.; MARCO, M.; QUINONES, B.; LINDOW, S. A closer look at *Pseudomonas syringae* as a leaf colonist. **ASM News**, Washington, v. 71, n. 10, p. 469-472, 2005.

ECHEVESTE, P.; AGUSTÍ, S.; DACHS, J. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 158, p. 299-307, 2010.

FANTINI, A. C.; GURIES, R.; RIBEIRO, R.J. Produção de palmito (*Euterpe edulis* – Martius – Arecaceae) na floresta ombrófila densa: potencial, problemas e soluções. **Sellowia**, Itajaí, v. 49-52, p. 256-280, 2000.

FARRELY, V.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Effect of Genome size and rrran gene copy number on PCR Amplification of 16S rRNA Genes from a Mixture of Bacterial species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2798-2801, 1995.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbial Reviews**, Washington, v. 56, p. 340-373, 1992.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, Berlin, v. 39, p. 783-791, 1985.

FILGUEIRAS, T.S. A floração dos bambus e seu impacto ecológico. **Eugeniana**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 1-8, 1988.

- FILGUEIRAS, T.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil. **The Journal of the American Bamboo Society**, New York, v. 18, n. 1, p. 7-18, 2004.
- FIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microorganismos e agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 69-96.
- FIORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 43, n. 4, p. 789-798, 2007.
- FRANÇA, E.J. **A biomonitoração da Mata Atlântica na conservação da biodiversidade: espécies arbóreas nativas acumuladoras de elementos**. 2006. 380 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- FRANKE, C.R.; ROCHA, P.L.B.; KLEIN, W.; GOMES, S.L. (Ed.). **Mata atlântica e biodiversidade**. Salvador: Edufba, 2005. 461 p.
- FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, p. 112-125, 1999.
- FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a costa rican premontane rain forest. **Oecologia**, New York, v. 17, p. 9-18, 1998.
- FRITZ-SHERIDAN, R.P.; PORTÉCOP, J. Nitrogen fixation on the tropical volcano, La Soufriere (Guadeloupe): a survey of nitrogen fixation by blue-green algal microepiphytes and lichen endophytes. **Biotropica**, Washington, v. 19, n. 3, p. 194-199, 1987.
- FURNKRANZ, M.; WANEK, W.; RICHTER, A.; ABELL, G.; RASCHE, F. Nitrogen Fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. **The ISME Journal**, London, v. 2, p. 561-570, 2008.
- FURUKAWA, K.; NODA, N.; TSUNEDA, S.; SAITO, T.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 102, n. 2, p. 90-96, 2006.
- GALLON, J.R. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. **New Phytologist**, Malden, v. 122, p. 571-609, 1992.
- GARCIA-PITCHEL, F.; PRUFERT-BEBOUT, L.; MUYZER, G. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3284-3291, 1996.

GENTRY, A.H. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. **Annals of Missouri Botanical Garden**, Lawrence, v. 75, n. 1, p. 1-34, 1988.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 995-1001, 1996.

GUEDES, M.L.S.; BATISTA, M.A.; RAMALHO, M.; FREITAS, H.M.B.; SILVA, E. M. Breve incursão sobre a biodiversidade da mata atlântica. In: FRANKE, C.R.; ROCHA, P.L.B.; KLEIN, W.; GOMES, S.L. (Ed.). **Mata atlântica e biodiversidade**. Salvador: Edufba, 2005. cap. 1, p. 39-92.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A.M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 2, p. 411-425, 2001.

HIROTA, M.M. Monitoring the Brazilian Atlantic Forest cover. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (Ed.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends and outlook**. Washington: Island Press, 2003. p. 60-65.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria): state in 2004. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 95-115, 2005.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

INSTITUTO FLORESTAL. **Localização das parcelas do Parque Estadual Serra do Mar**.

Disponível em:

<http://www.iflorestal.sp.gov.br/unidades_conservacao/informacoes.asp?cod=27>. Acessado em 31 ago. 2010.

JACKSON, C.R.; DENNEY, W.C. Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacteria community associated with leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*). **Microbial Ecology**, New York, v. 61, p. 113-122, 2011.

JANZEN, D.H. Why bamboos wait so long to flower. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, n. 7, p. 347-391, 1976.

JOHANSEN, J.R.; OLSEN, C.R.; LOWE, R.L.; FUČÍKOVÁ, K.; CASAMATTA, D.A. *Leptolyngbya* species from selected seep walls in the Great Smoky Mountains National Park. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 126, p. 21-36, 2008.

JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. **Composição florística, estrutura e funcionamento da floresta ombrófila densa dos núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, estado de São Paulo, Brasil**. Piracicaba: CENA, 2008. 429 p. (3º relatório do projeto temático Biota Gradiente Funcional).

JUHASZ, A.L.; NAIDU, R. bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a] pyrene. **International Biodeterioration and Biodegradation**, New York, v. 45, p. 57-88, 2000.

KARAMANOLI, K.; VOKOU, D.; MENKISSOGLU, U.; CONSTANTINIDOU, H.I. Bacterial colonization of phyllosphere of Mediterranean aromatic plants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 2035-2048, 2000.

KARAMANOLI, K.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; BOSABALIDIS, A.M.; VOKOU, D.; CONSTANTINIDOU, H.A. Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. **Chemoecology**, Switzerland, v. 15, p. 59-67, 2005.

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 161-177, 2003.

_____. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? **Limnology and Oceanography: methods**, Waco, v.2, p. 114-125, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide-sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 16, p. 111-120, 1980.

KOMÁREK, J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 639, p. 245-259, 2010.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4. Nostocales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 82, p. 247-345, 1989.

_____. Cyanoprokaryota - 1. Teil/ 1nd Part: Chroococcales. In: ETTL, H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1**. Jena: Gustav Fischer, 1999. p. 548.

_____. Cyanoprokaryota - 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: BUDEL, B., KRIENITZ, L., GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2**. Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. p. 1-759.

KURMAYER, R.; KUTZENBERGER, T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6723-6730, 2003.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LEITÃO-FILHO, H.F. Diversity of arboreal species in Atlantic Rainforest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, p. 91-96, 1994.

LEVEAU, J.H.; LINDOW, S.E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3446-3453, 2001.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 13, p. 238-243, 2002.

LORENZI, A.S. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de Microcystis e genótipos potencialmente produtores de microcistinas**. 2008. 174 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MECHABER, W.L.; MARSHALL, D.B.; MECHABER, R.A.; JOBE, R.T.; CHEW, F.S. Mapping leaf surface landscapes. **Proceedings of the National of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 4600-4603, 1996.

MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 369- 374, 2000.

MILLER, W.G.; BRANDL, M.T.; QUINONES, B.; LINDOW, S.E. Biological Sensor for Sucrose Availability: Relative Sensitivities of Various Reporter Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 1308-1317, 2001.

MONIER, J.M.; LINDOW, S.E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. **Proceedings of the National of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15977–15982, 2003.

_____. Spatial organization of dual-species bacterial aggregates on leaf surface **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5484–5493, 2005.

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p.127–141, 1998.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 693-697, 1997.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 3327-3332, 1997.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades bacterianas na filosfera e suas relações com a espécie vegetal e compostos orgânicos voláteis**. 2010. 109 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, Washington, v. 32, p. 793-810, 2000.

OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**, Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 149-194.

OREN, A. Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy / International Journal of Systematic Bacteriology / International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 10-15, 2011.

OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCR-generated artifact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 248, p. 183-187, 2005.

PADGURSCHI, M. C. G. **Composição e estrutura de um trecho de Floresta Ombrófila Densa Montana com taquaras na Mata Atlântica**. 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PAVAN, F.R.; SATO, D.N.; HIGUCHI, C.T.; SANTOS, A.C.B.; VILEGAS, W.; LEITE, C.Q.F. In vitro anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian “Cerrado” plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 204-206, 2009.

RAI, A.N.; BERGMAN, B. Creation of new nitrogen-fixing cyanobacterial associations. **Proceedings of the Royal Irish Academy**, Dublin, v. 102b, p. 65-68, 2002.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 167-177, 2000.

RASTOGI, G.; TECH, J.J.; COAKER, G.L.; LEVEAU, J.H.J. A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 127-132, 2010.

REIS, M.S.; FANTINI, A.C.; NODARI, R. O.; REIS, A.; GUERRA, M. P.; MANTOVANI, A. Management and conservation of natural populations in Atlantic rain forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4b, p. 894-902, 2000.

REYSENBACH, A. L.; GIVER, L. J.; WICHHAM, G. S.; PACE, N.R. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3417-3418, 1992.

RIGONATO, J. **Diversidade de Cianobactérias em Manguezais do estado de São Paulo**. 2010. 109 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Berks, v. 111, p. 1-61, 1979.

RUIZ, W.F.R. **Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica**. 2010. 108 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular and Biology Evolution**, Chicago, n. 4, p. 406-425, 1987.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 351 p.

SANDAU, E.; SANDAU, P.; PULZ, O. Heavy metal sorption by microalgae. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 16, p. 227-235, 1996.

SANTOS, M.; JUNIOR, P.C.P.F.; VAILATI, M.G.; PAULILO, M.T.S. Aspectos estruturais de folhas de indivíduos de *Guapira opposita* (VELL) REITZ (NYCTAGINACEAE) ocorrentes em restinga e na floresta ombrófila densa. **Revista de Botânica**, Florianópolis, n. 39, p. 59-78, 2010.

SANZ, J.L.; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 119-133, 2007.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Plano de manejo do Parque Estadual Serra do Mar**. São Paulo, 2006. Disponível em <<http://www.iflorestal.sp.gov.br>> Acesso em: 31 ago. 2010.

SCHLOSS, P.D; WESTCOTT S.L; RYABIN, T; HALL, J.R; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B; LESNIEWSKI, R.A; OAKLEY, B.B; PARKS, D.H; ROBINSON C.J.; SAHL, J.W; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHMIDT, R.; LONGHI'WAGNER, H.M. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 71-128, 2009.

SCHOBER, E.; KURMAYER, R. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 42, p. 412-417, 2006.

SCHOBER, E.; WERNDL, M.; LAAKSO, K.; KORSCHINECK, I.; SIVONEN, K.; KURMAYER, R. Interlaboratory comparison of Taq Nuclease Assays for the quantification of the toxic cyanobacteria *Microcystis sp.* **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 122-128, 2006.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, New York, v. 215, n. 2, p. 229-238, 2002.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, p. 688, 1949.

SINGLETON, D.R.; FORLONG, M.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4374-4376, 2001.

SIPARI, H.; RANTALA-YLINEN, A.; JOKELA, J.; OKSANEN, I.; SIVONEN, K. Development of a chip assay and qPCR for detecting microcystin synthetase gene E expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 12, p. 3797-3805, 2010.

SMITH, V.H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. **Science**, Washington, v. 221, p. 669-671, 1983.

SODERSTROM, T.R.; CALDERÓN, C.E. A commentary on bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Biotropica**, Washington, v. 11, n. 3, p. 161-172, 1979.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STAL, L.J.; MOEZALAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 179-211, 1997.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225-274, 1977.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58 p. (Documentos, 93).

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A. Regeneração de uma floresta tropical montana após corte e queima (São Paulo-Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 59, n. 2, p. 239-250, 1999.

_____. Gap-phase regeneration in a tropical montane forest: the effects of gap structure and bamboo species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v.148, n. 2, p. 149-155, 2000.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; WIT, R.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo dry valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5157-5169, 2003.

Ter BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference manual and canocodraw for windows user's guide**: software for canonical community ordination (version 4.5). Ithaca: Microcomputer Power, 2002. 500 p.

THIEL, T.; WOLK, C.P. Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 156, p. 369-74, 1983.

TINGRE, S.G.; RUBIN, E.M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 805-814, 2005.

VAITOMAA, J.; RANTALA, A.; HALINEN, K.; ROUHIAINEN, L.; TALLBERG, P.; MOKELKE, L.; SIVONEN, K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7289-7297, 2003.

VELOSO, H.P.; GÓES FILHO, L. **Fitogeografia brasileira**: classificação fisionômico-ecológica da vegetação neotropical. Salvador: IBGE, 1982. 80 p. (Projeto RADAMBRASIL).

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 112 p. (Projeto RADAMBRASIL).

VON WINTZINGERODE, F.V.; GOBEL, U.B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 213-229, 1997.

WASHINGTON, H.G. Diversity, biotic and similarity indices: a review with special reference to aquatic ecosystem. **Water Research**, Oxford, v. 18, p. 653-694, 1984.

WATERBURY, J.B. The cyanobacteria: isolation, purification and identification. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2006. v. 4, p. 1074-1098.

WHITMORE, T.C. A review of some aspects of tropical rain forest seedling ecology with suggestions for further enquiry. In: SWAINE, M.D. (Ed.). **The ecology of tropical forest tree seedlings**. Paris: UNESCO; Parthenon, 1996. chap. 1, p. 3-39.

WHITTAKER, R.H. Evolution and measurement of species diversity. **Taxon**, Vienna, v. 21, n. 2/3, p. 213-251, 1972.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to cyanobacteria. In: _____. **The ecology of cyanobacteria**. Their diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 1-11.

WILMOTTE, A. The molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994, p. 1-25.

WILMOTTE, A.; STAM, W.R.; DEMOULIN, V. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. III. DNA-DNA hybridization studies and taxonomic conclusions. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 87, p. 1-18, 1997.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

YADAV, R.K.P.; HALLEY, J.M.; KARAMANOLI, K.; CONSTANTINIDOU, H.I.; VOKOU, D. Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative features and testing of distribution models. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 63-77, 2004.

YAMAZAKI, S.; NOMATA, J.; FUJITA, Y. Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 142, p. 911-922, 2006.

YANG, H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 7, p. 3889-3894, 2001.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; HOSODA, N.; HIROISHI, S. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 266, p. 49-53, 2007.

ZEHR, J.P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 162-172, 2011.

ZHANG, S.; MA, K.; CHEN, L. 2003. Response of photosynthetic plasticity of *Paeonia suffruticosa* to changed light environments. **Environmental and Experimental Botany**, Beijing, v. 49, n. 2, p. 121-133, 2003.

ZWIELEHNER, J.; HANDSCHUR, M.; MICHAELSEN, A.; IREZ, S.; DEMEL, M.; DENNER, E.B.M.; HASLBERGER, A.G. DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce. **Molecular Nutrition & Food Research**, Malden, v. 52, n. 5, p. 614–623, 2008.