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

**Filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico: estrutura da
comunidade bacteriana e monitoramento de cobre**

Carolinne Rosa de Carvalho

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

**Piracicaba
2017**

Carolinne Rosa de Carvalho
Bacharela em Ciências Biológicas

Filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico: estrutura da comunidade bacteriana e monitoramento de cobre

Orientador

Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

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

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Carvalho, Carolinne Rosa de

Filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico: estrutura da comunidade bacteriana e monitoramento de cobre / Carolinne Rosa de Carvalho. -- Piracicaba, 2017.

67 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Bactéria 2. Manejo agrícola 3. Agroecologia 4. Cobre foliar 5. Sequenciamento NGS I. Título

DEDICATÓRIA

À minha mãe Claudia por ser exemplo de força e mulher, e ao meu pai Osni (*in memoriam*) por enviar sinais de todos os lados sobre qual caminho tomar;

Aos meus avós Maria e Wagner, por terem mais fé em mim do que qualquer um já teve, e a minha avó Guiomar pelo suporte e por compartilhar sua saudade comigo;

Às minhas meninas, Stephanie, Ana Clara e Beatriz, por mostrarem que mesmo diferentes, estamos entre as mulheres que vão mudar o mundo, e por estarem ao meu lado mesmo que de longe, nada nos separa;

E por fim, à ciência brasileira, não por pretensão, mas por apoio à luta que estamos enfrentando contra o desmonte e o sucateamento da pesquisa no Brasil. Educação não é despesa, é investimento. É preciso deixar claro que um país que trabalha pelo seu povo, esse sim é um lugar rico com saúde e ensino de qualidade acessível a todos.

AGRADECIMENTOS

“Nunca reclamar, só agradecer, tudo o que vier eu fiz por merecer” – Supercombo

A todos os que fizeram parte desta jornada de alguma forma e apoiaram o desenvolvimento desta história, meus sinceros agradecimentos:

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, financiando minha pesquisa mesmo em tempos de crise na ciência e na educação, obrigada por ainda incentivarem a pesquisa no país;

A Profa. Dra. Elke Cardoso por ter confiado no meu trabalho desde o início, pelos ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, será sempre uma honra dizer que fui sua orientada;

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo por todo o suporte para o desenvolvimento do meu trabalho, em especial a Sônia por ter me acompanhado, sofrendo e comemorando, em todas as análises moleculares, e ao Armando por todas as ideias e ensinamentos que me ajudaram a começar isso tudo;

Ao Centro de Pesquisa “Mokiti Okada” pela parceria na pesquisa e por disponibilizarem a área experimental do projeto e toda ajuda para desenvolvê-lo, em especial Sérgio, Juliana, Wesley e Reinaldo;

Ao Laboratório de Instrumentação Nuclear do CENA, coordenado pelo Prof. Dr. Hudson Carvalho, por ter cedido o espaço e os equipamentos para as análises de XRF;

Ao grupo de pesquisa da Profa. Elke Cardoso, principalmente Maiele, Antonio e Arthur, por todas as conversas, discussões e risadas, desde o café até a hora do jantar vocês deixaram tudo mais leve durante o trabalho; e ao Ademir, no finalzinho, pela ajuda e profissionalismo;

Aos membros das famílias Rosa, Faria e Carvalho que de alguma maneira me apoiaram durante esta etapa;

Ao Guilherme, “diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer pra mim dividir um planeta e uma época com você”, obrigada por segurar minha mão e não soltar, e por ter tido coragem por mim e por nós dois;

Aos amigos Yasmin, Bruno, Juliana, Wallace, Jorge e Ana Paula por terem, sem saber talvez, amenizado as dificuldades emocionais que tive durante esses dois anos, foi muito bom dividir sorrisos com vocês, não trocaria por nada;

À República Purple House, Melisa, Michelle, Mariana, e todos os agregados que já passaram por essa residência, obrigada por serem morada mesmo até hoje, sempre serei grata por ter conhecido vocês;

E, por fim, aos velhos amigos de sempre que me conquistaram em Minas Gerais ou em São Paulo ou em Gold Coast, espalhados pelo mundo ou num universo paralelo (Gustavo Ladeira) e que mandaram suas energias positivas para que sempre desse certo, enfim, deu.

EPÍGRAFE

“It’s not about perfect. It’s about effort. And when you implement that effort to your life... Every single day, that’s where transformation happens. That’s how change occurs. Keep going. Remember why you started”

RuPaul

“Luchar por tus sueños no te garantiza que se harán realidad mañana, pero sin duda es el camino que te llevará al lugar donde tienes que estar”

Dulce Maria Espinosa Saviñón

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	15
2.1. CITRICULTURA.....	15
2.2. MANEJOS AGRÍCOLAS: CONVENCIONAL VS. ECOLÓGICO	16
2.3. A FILOSFERA E SUA COMPOSIÇÃO BACTERIANA	17
2.4. O COBRE FOLIAR APLICADO EM MANEJOS AGRÍCOLAS	19
2.5. HIPÓTESES	21
2.6. OBJETIVOS	22
2.6.1. Geral	22
2.6.2. Específicos.....	22
3. METODOLOGIA.....	23
3.1. ÁREA EXPERIMENTAL.....	23
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.3. MAPEAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DO COBRE NO TECIDO FOLIAR	26
3.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DA FILOSFERA	27
3.4.1. Isolamento de bactérias cultiváveis presentes na filosfera	27
3.4.2. Isolamento de bactérias cultiváveis tolerantes ao cobre presentes na filosfera	27
3.4.3. Extração de DNA total e dos isolados bacterianos cultivados	28
3.4.4. Determinação da estrutura da comunidade de bactérias totais por T-RFLP	28
3.4.5. Abundância bacteriana na filosfera por PCR em tempo real (qPCR)	29
3.4.6. Sequenciamento Illumina MiSeq 16S rRNA	30
3.4.7. Identificação dos isolados bacterianos totais e tolerantes ao cobre por sequenciamento Sanger 16S rDNA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. COMUNIDADE BACTERIANA TOTAL CULTIVÁVEL E NÃO CULTIVÁVEL NA FILOSFERA.....	33
4.2. PERFIL BACTERIANO EM FUNÇÃO TEMPORAL E DO MANEJO AGRÍCOLA	42
4.3. MONITORAMENTO EXPLORATÓRIO QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO DO COBRE NO TECIDO FOLIAR.....	47
5. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS	57
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico: estrutura da comunidade bacteriana e monitoramento de cobre

O manejo agrícola aplicado a um agrossistema pode determinar a qualidade e produtividade da área, além das interações biológicas que podem ser estabelecidas entre o cultivar e ecossistema local. A agricultura convencional é bastante reconhecida como um manejo eficiente e lucrativo. Por outro lado, a agroecologia tem ganhado visibilidade na agroindústria em reflexo do aumento na demanda por alternativas mais sustentáveis de produção. As diferenças entre ambos manejos podem refletir sobre a dinâmica microbiana, alterando a composição e estruturação das comunidades ali presentes. Os micro-organismos que habitam a superfície foliar da planta compõem o micro-ambiente denominado filosfera, descrito como um dos habitats colonizáveis mais extensos. Devido a sua alta exposição a variáveis ambientais, diversos fatores podem interferir na comunidade bacteriana e definir a filosfera. Desta forma, o principal objetivo nesse estudo foi avaliar como o manejo agrícola interfere na composição bacteriana na filosfera, analisando ainda em escala temporal sua estrutura e abundância. A área experimental amostrada foi cedida pelo Centro de Pesquisa “Mokiti Okada”, em Mogi Guaçu, São Paulo. As amostras foram coletadas de maneira representativa em diferentes linhas de tratamento, uma sob manejo convencional e outra sob manejo ecológico. Análises microbiológicas dependentes e independentes de cultivo permitiram identificar a comunidade bacteriana residente da filosfera de citros, a qual era compartilhada por ambos os manejos. Entretanto, análises de sequenciamento NGS (New Generation Sequencing) mostraram uma diferença significativa entre as comunidades bacterianas dos dois manejos, com o ecológico apresentando uma maior diversidade. Apesar do manejo ter se mostrado um importante fator na composição bacteriana, quando avaliado em função temporal, viu-se que as épocas de coleta interferem mais intensamente na estrutura das bactérias ($p=0,0001$), mostrando uma sobreposição dos diversos fatores ambientais que atuam sobre a filosfera. Os resultados ainda indicaram uma redução na abundância de bactérias, a qual pode estar relacionada com a aplicação extra de produtos cúpricos em ambas as áreas, em função do acometimento da “pinta preta” no pomar, o que instigou monitorar o cobre no tecido foliar. Quimicamente, micro-análises de XRF (X-Ray Fluorescence) mostraram que há uma maior concentração de cobre nas folhas provenientes da área convencional, o que é resultado das maiores quantidades do produto que são aplicadas nesse tratamento. Além disso, foi possível o isolamento de bactérias do gênero *Enterococcus* na filosfera, as quais apresentam mecanismos de tolerância ao cobre, demonstrando que os produtos cúpricos podem ter selecionado esses organismos. Logo, esse estudo apresentou uma importante perspectiva do efeito do manejo agrícola sobre a filosfera, contribuindo para a compreensão da dinâmica microbiana na agricultura.

Palavras-chave: Bactérias; Manejo agrícola; Agroecologia; Cobre foliar; Sequenciamento NGS

ABSTRACT

Phyllosphere of citros under conventional and ecological management: structure of bacterial community and copper monitoring approach

The agricultural management applied to a agrosystem is an important determinant for the quality and productivity of the crop yield, also for the biological interactions that can be established between the plants and the local ecosystem. Conventional agriculture has being well known as an efficient and lucrative crop management. On the other hand, agroecology has gaining visibility in the agroindustry due to increasing demand for a more sustainable production alternative. The differences between both approaches can reflect on the microbial dynamic, affecting the composition and structure of these communities. Microorganisms inhabiting the foliar surface correspond to a microenvironment called phyllosphere, which is described as one of the most extensive habitats. Due to its constant exposition to environmental variables, several factors can influence on the bacterial community and modulate the phyllosphere. Thus, the main purpose of this study was to evaluate how the agricultural management can impact on the phyllospheric bacteria, also considering a temporal effect on structure and abundance of these organisms. The experimental area was provided by “Mokiti Okada” Research Center, located at em Mogi-Guaçu, São Paulo. The samples were representatively collected from two treatment lines, one under convencional management, and the other under ecological management. Afterwards, culture-dependent and independent microbiological analysis allowed to identify the resident bacterial community in citros phyllosphere, which was greatly shared bewteen both treatments. However, NSG (New Generation Sequencing) analysis demonstrated a significative difference between the bacterial community under conventional and ecological management, where the second one demonstrated a higher diversity, which can be related to the different approaches applied. Although the agricultural method have demonstrated an important factor on bacterial composition, when temporally evaluated, it was observed a more intense interference on the bacterial structure by the time of sampling ($p=0,0001$), representing a possible overlap of environmental factors on the phyllosphere. The data also indicate a decrease in the abundance of bacteria that might be resulted from the extra use of cupric products, related to the impairment of “black spot” on the crop, what lead to a copper monitoring in the foliar tissue. Chemically, XRF micro-analysis (X-Ray Fluorescence) demonstrated that there is a higher concentration of copper on the leaves from the conventional area, which is resulted of the higher application of its products by this method. Moreover, a search for copper-tolerant microorganisms was conducted, and it was possible to isolate *Enterococcus* bacteria, which have copper tolerance mechanisms. This result implicate that the use of cupric products may have selected these microorganisms on citros phyllosphere. Therefore, this study presented an important perspective of how the agricultural management can influence the phyllosfere, which can contribute to undertand about the microbial dynamic and its roles on the agriculture.

Keywords: Bacteria; Agricultural management; Agroecology; Foliar copper; New Generation Sequencing

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A filosfera é definida como a região superficial da planta habitada pela comunidade microbiana, sendo considerada um dos maiores ambientes colonizados por micro-organismos, comportando até 10^{26} células na área total (Lindow and Brandl, 2003; Farré-Armengol *et al.*, 2016). Representado em maior parte pelo tecido foliar, esse microambiente está sujeito à constante variabilidade ambiental e nutricional, sendo considerado um ambiente hostil e oligotrófico (Dias *et al.*, 2012; Allard *et al.*, 2016). Comunidades bacterianas associadas às folhas podem promover benefícios fisiológicos e ecológicos, diminuindo sua susceptibilidade a estresses e ataques de patógenos; produzindo hormônios de crescimento para a planta; e participando de ciclos biogeoquímicos (Peñuelas e Terradas, 2014). Assim, ao destacar a funcionalidade das comunidades bacterianas para o benefício da planta, entendemos que compreender a composição desses organismos não apenas auxilia nos estudos taxonômicos sobre microbioma filosférico, mas também auxilia esclarecer como essas atividades podem ser aplicadas na área agrícola para uma otimização da produção a partir de um serviço ecológico.

Fatores como distância geográfica, sazonalidade, fase de desenvolvimento e características genéticas têm demonstrado influências significativas na composição das comunidades microbianas da filosfera (Finkel *et al.*, 2011; Reisberg *et al.*, 2013; Lambais, Lucheta e Crowley, 2014). Na literatura encontram-se poucos trabalhos avaliando a possível interferência do manejo agrícola na composição e distribuição de bactérias e outros micro-organismos na região da superfície foliar (Perazzolli *et al.*, 2014; Pagadala *et al.*, 2015; Ottesen *et al.*, 2016). Entretanto, não foram encontradas referências que comparem como a comunidade bacteriana da filosfera se comporta sob dois manejos distintos, como convencional e agroecológico, em experimentos instalados em campo, o que torna mais significativa a realização deste estudo.

De acordo com Srivastava (2012), um manejo adequado englobaria a preservação dos recursos da área de produção, a interação da demanda do produto, sendo este comercialmente competitivo, e ainda tendo a necessidade de ser “sustentável”. Em (Begon, Townsend and Harper, 2006), encontramos “sustentável” como o conceito de práticas que podem se repetir a longo prazo, com suas consequências podendo ser medidas e trabalhadas antecipadamente. As práticas da agricultura convencional são bastante eficientes quanto à quantidade de alimento produzido por área de cultivo, fazendo uso principalmente de insumos químicos sintéticos para melhorar a qualidade do solo e eliminar pragas, além de ser um

cultivo intensivo com uso de maquinário e aplicação da engenharia genética (Gliessman, 2009; Leakey, 2014). Contudo, apesar de seus benefícios, as práticas convencionais não são consideradas ecologicamente favoráveis, podendo apresentar danos como perda de fertilidade do solo e da diversidade biológica, questões que podem alterar as características do agroecossistema a longo prazo (Gliessman, 2009; Geertsema *et al.*, 2016)

Como forma alternativa de manejo, a agroecologia surgiu em resposta ao manejo convencional estabelecido previamente, englobando as agriculturas orgânica, natural, biológica, dentre outras (Aquino e Assis, 2005). Esses tipos de manejos derivam do conceito de equilíbrio entre os fatores ambientais, visando obter uma produtividade a longo prazo com práticas mais seguras para o ambiente, deixando de lado a ideia de produzir apenas com foco no retorno lucrativo, e substituindo-o por uma otimização do agroecossistema como um todo (Altieri, 2013). O manejo ecológico é uma das vertentes alternativas que se baseia nas premissas agroecológicas, as quais envolvem práticas como cobertura verde, ciclagem de nutrientes, exploração de serviços ecossistêmicos e controle biológico, para promover uma produção mais natural e viável para o ecossistema (Mazzoncini *et al.*, 2010; Oelofse *et al.*, 2011). Entretanto, no manejo ecológico vemos uma maior maleabilidade quanto ao uso de insumos químicos na produção, não havendo registros limitando sua aplicação, como acontece na agricultura orgânica (Aquino e Assis, 2005).

Estas práticas têm crescido nas últimas décadas concomitantemente com a demanda por alimentos mais saudáveis e uma menor contaminação do ambiente pelos insumos químicos utilizados na agricultura convencional. Dentro deste conceito o Brasil encontra-se entre os dez países com maior extensão de terra dedicadas à agricultura sustentável, de acordo com o levantamento da Federação Internacional de Agricultura Orgânica (IFOAM) (2014). Baseando-se nesses princípios da agroecologia, a Fundação “Mokiti Okada” desenvolve projetos visando práticas que favoreçam as propriedades naturais do ambiente e do desenvolvimento animal e vegetal, sem fins lucrativos, alcançando objetivos ambientais, culturais e educacionais. O grupo é altamente reconhecido dentre as entidades de produção agroecológica, tendo desenvolvido projetos em agricultura e pecuária sustentáveis por todo o país. Dentre suas atividades no setor de pesquisa em manejo de solo e planta, o grupo do Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO) apresenta o projeto de pesquisa sobre a cultura de citros, cujo título é “Transição tecnológica na conversão do cultivo convencional de citros para o sistema orgânico: Contribuições de alguns atributos físico-hídrico e microbiológicos”. Este estudo envolve a transição do cultivo convencional para um modelo mais sustentável (agricultura ecológica) em área de citros, visando reduzir e substituir gradualmente o uso de

práticas agrícolas convencionais por opções agroecológicas. Com as alterações a serem feitas no sistema de manejo nas culturas de citros, diversas características químicas, físicas e biológicas entre as áreas provavelmente se encontram alteradas. Desta forma, buscar e avaliar comunidades biológicas influenciadas pelos manejos dentro do agroecossistema é uma forma eficaz de demonstrar se as diferenças entre eles afetam os organismos associados às culturas, auxiliando ainda nos estudos que visam comparar manejos agrícolas e avaliando qual aplicação se mostra mais ecologicamente viável.

Além das alterações na diversidade bacteriana total, o uso de determinados produtos fitossanitários nos manejos pode favorecer o crescimento de organismos adaptados a eles. Os produtos à base de cobre são bem aceitos tanto pela citricultura convencional quanto agroecológica para a eliminação de micro-organismos patogênicos que afetam as culturas, apresentando baixa toxicidade para a planta quando aplicados em baixas concentrações (Schutte *et al.*, 2012; Mackie *et al.*, 2013). Na área experimental de citros, esses produtos são comumente utilizados, atuando de maneira eficiente contra a doença "pinta-preta", um dos principais problemas que acometem esta produção. Na literatura há relatos de que, em altas concentrações e/ou constantes aplicações, o cobre pode alterar os grupos de micro-organismos presentes na filosfera, quali e quantitativamente (Martins *et al.*, 2012; Varanda, 2016).

Resultados prévios de análise química da área de cultivo de citros, ainda demonstram que existe uma diferença significativa na concentração de cobre entre plantas sob tratamento convencional e orgânico em transição (ecológico) (Homma, 2017). Ainda que este uso na citricultura seja comum, pouca informação sobre seus impactos relacionados à filosfera é conhecida. Desta forma, a avaliação da distribuição de cobre no tecido foliar por meio de uma análise química pode auxiliar no monitoramento exploratório do micronutriente. Ainda, concomitantemente com a avaliação microbiológica de bactérias tolerantes à presença do cobre, a influência do uso desse produto sobre a filosfera poderá ser compreendida com base nesses parâmetros.

2. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

2.1. Citricultura

A citricultura é considerada uma das principais culturas agrícolas mundiais, tanto em termos de área quanto de produtividade, tendo origem na Ásia e se propagado fortemente pelo mundo, com destaque para as regiões subtropicais aonde tem significativa expressão econômica (Castro, Kluge e Sestari, 2008; Srivastava, 2012). Com ampla distribuição geográfica e característica mesofítica, os ambientes de umidade relativamente baixa são adequados para a produção de citros e, além disso, solos arenosos e levemente ácidos podem apresentar uma qualidade superior dos frutos produzidos, mostrando uma adaptação favorável da planta a essas condições (Castro, Kluge e Sestari, 2008).

O Ministério da Agricultura considera o cultivo de citros um dos setores mais organizados e competitivos na indústria brasileira, sendo o Brasil um dos maiores exportadores de seu produto para locais como Estados Unidos, Europa e Canadá (Andrade, Ferreira e Martinelli, 2016). De acordo com os últimos dados emitidos pela EMBRAPA (2017), o Brasil produz 24,99 t/ha de laranja, com o Estado de São Paulo sendo responsável por 80% da produção do fruto e 98% do suco. Além de suco, a laranja pode ser convertida em outros produtos que podem ser aproveitados, como óleos essenciais, líquidos aromáticos e ainda possui um bagaço altamente energético, o qual é usado na alimentação de ruminantes (MAPA, 2016).

O acometimento de pragas e doenças nos pomares de citros tem se intensificado nos últimos anos no Brasil, alarmando a produção nas lavouras, o que levou a necessidade de investir nas correções fitossanitárias (Andrade, Ferreira e Martinelli, 2014). Entretanto, uma estimativa de que pelo menos 60% dos custos de produção é direcionada ao controle de pragas, afetando o custo-benefício da comercialização e exportação de citros (Barbosa *et al.*, 2014). As enfermidades cancro cítrico, clorose variegada, morte súbita, “pinta preta” são as principais responsáveis pelas perdas nas regiões dos Estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Paraná (Barbosa *et al.*, 2014). O outro importante problema para a cultura do citros é o inseto psílídio (*Diaphorina citri*), o qual é vetor da bactéria causadora de HLB ou “greening”, a principal doença que afeta a citricultura (Shen *et al.*, 2013). *Candidatus Liberibacter* é uma Proteobacteria que desenvolve doença sistêmica na planta, atingindo todos os órgãos e, conseqüentemente, levando à eliminação da árvore contaminada e, em alguns casos de todo o pomar (Shen *et al.*, 2013).

2.2. Manejos agrícolas: convencional vs. ecológico

Um agroecossistema é nada mais que um sistema ecológico transformado pelo ser humano para o exercício de práticas agrícolas, as quais buscam ser adequadas e eficientes, a partir de uma otimização de seus pontos altos e baixos (Paulus, Muller e Barcellos, 2000). Os três principais parâmetros responsáveis pela fertilidade do solo e, portanto, pela produtividade agrícola, são os físicos, químicos e biológicos (Mazzoncini *et al.*, 2010). Isto implica em trabalhar em cima desses parâmetros para a implementação de práticas que considerem os efeitos a longo prazo no sistema, visando assim uma área fértil, produtiva e de qualidade.

De forma contrastante, a agricultura convencional tem como seus principais objetivos a maximização da produção e dos lucros, fazendo uso de práticas como o cultivo intensivo do solo, uso de fertilizantes químicos, aplicação de pesticidas, monocultura, irrigação e manipulação genética das cultivares (Gliessman, 2009; Mazzoncini *et al.*, 2010; De Ponti, Rijk e Van Ittersum, 2012). Entretanto, apesar de sua eficiência a curto prazo, o manejo convencional pode causar danos ecológicos de alto impacto para a área de produção, como a perda de fertilidade e erosão do solo; alteração na disponibilidade de nutrientes com a redução da matéria orgânica; e a contaminação de corpos d'água por meio da lixiviação de compostos sintéticos (Gliessman, 2009; Ponisio *et al.*, 2014). Além disso, as práticas de monocultura e o uso excessivo de pesticidas podem afetar diretamente a diversidade genética e funcional no ecossistema, selecionando espécies de crescimento rápido e resistentes aos produtos químicos aplicados (Aquino e Assis, 2005; Krauss, Gallenberger e Steffan-Dewenter, 2011).

Em vista dos eventuais problemas desencadeados pelo manejo convencional, alternativas mais sustentáveis que procuram fazer uso de métodos que equilibram o funcionamento do ecossistema têm sido desenvolvidas. A agroecologia descreve uma ciência transdisciplinar, a qual incorpora a influência do sistema agrícola sobre as complexas interações ambientais, junto a fatores políticos e socioeconômicos (Aquino e Assis, 2005; Altieri, 2013; ONU, 2017). Tendo assim, uma visão mais ampla dos parâmetros afetados pela agricultura e podendo se desenvolver como uma alternativa sustentável e moderna (Aquino e Assis, 2005).

Conforme já afirmado previamente, a agricultura sustentável envolveria a redução de efeitos negativos e da liberação de compostos tóxicos, a manutenção da fertilidade do solo, o uso consciente de recursos hídricos, a conservação da biodiversidade, entre outras características, substituindo a química sintética por atividades biológicas (Gliessman, 2009).

A transição desta metodologia convencional para o manejo mais sustentável tem se tornado gradualmente relevante nos agrossistemas, com o objetivo de recuperar as perdas causadas pela agricultura intensiva e conservar o ambiente para usos agrícolas futuros (Krauss, Gallenberger e Steffan-Dewenter, 2011).

Do ponto de vista econômico, avaliações atualizadas sugerem que a produção agroecológica pode superar a aplicação de um manejo convencional, em questões de saúde e às vezes até em produtividade (Altieri, 2013; Homma, 2017). A ONU (2017) apresenta em seu relatório atual a realidade da agroecologia, em que esta, quando adequadamente implementada e em conjunto com um sistema de distribuição de alimentos correto, é capaz de suprir a demanda global para alimentar a população humana. Apesar de poucos trabalhos na literatura demonstrarem o sucesso deste tipo de produção em relação à agricultura convencional, a forma mais pertinente em avaliar essas diferenças seria pela redução de gastos gerados no uso de agroquímicos e outras tecnologias convencionais em relação à saúde humana, à economia e ao meio ambiente, e não apenas baseado em retorno lucrativo.

2.3. A filosfera e sua composição bacteriana

Em toda a superfície da planta encontram-se associados micro-organismos, os quais podem interagir com a mesma nos mais diferentes níveis (Vorholt, 2012). Cada órgão da planta colonizada compõem um "microambiente", com suas propriedades e condições (Allard *et al.*, 2016). Na região aérea, composta por folhas, flores e frutos, tem-se a chamada filosfera, a qual representa um dos maiores ambientes colonizáveis por micro-organismos em questão de área disponível (Redford *et al.*, 2010; Thapa *et al.*, 2017). Entretanto, diferente do que é visto na rizosfera (superfície da raiz), por exemplo, sua exposição direta e constante às variações de temperatura, umidade e radiação ultravioleta, tornam a filosfera uma região adversa a diversos grupos microbianos, comportando apenas aqueles que se adaptam bem a essas rápidas alterações (Vorholt, 2012). Além disso, há uma baixa disponibilidade de nutrientes e água nesta região, tendo um acúmulo de substratos em regiões estratégicas do tecido foliar, como na nervura central e na base de elementos como tricomas e estômatos (Cordier *et al.*, 2012).

Os micro-organismos associados à planta podem ser classificados como endofíticos, colonizando o interior da folha, entre as células vegetais na região apoplástica; e epifíticos, estando aderidos à face externa da folha (Ding, Palmer e Melcher, 2013). A diversidade microbiana na filosfera compreende em sua maioria bactérias, as quais representam em média

10^8 organismos presentes por cm^2 , seguidos por fungos, cianobactérias e ainda com alguns registros de arqueias (Redford *et al.*, 2010; Rigonato *et al.*, 2012). Micro-organismos que são costumeiramente encontrados em um determinado ambiente, como no caso da filosfera, são descritos na literatura como componentes do *core* microbiano, ou seja, residente ubíquos que estão presentes em alta frequência e podem estar co-evolutivamente relacionados com o hospedeiro (Andreote, Gumiere e Durrer, 2014). Dentre os filos bacterianos presentes na filosfera, Proteobacteria são amplamente predominantes, sendo as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria as mais abundantes (Kim *et al.*, 2012; Vorholt, 2012). Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes também se encontram entre os filos mais encontrados em estudos sobre diversidade bacteriana nas mais diferentes culturas (Andreote, Gumiere e Durrer, 2014).

Estas bactérias podem se relacionar à planta de forma positiva ou negativa, a partir de interações simbióticas ou patogênicas (Andreote, Gumiere e Durrer, 2014). Essa associação entre planta e micro-organismo mostra-se de grande relevância para funcionamento e *fitness* da planta, tendo efeitos sobre o fenótipo e adaptação evolutiva da mesma (Kembel e Mueller, 2014). Dentre as funções dos simbiontes na filosfera tem-se, a defesa da planta, evitando a colonização de patógenos em nichos previamente ocupados e a produção de compostos antimicrobianos; a fixação e ciclagem de nutrientes, como nitrogênio e carbono por bactérias diazotróficas; e a produção de compostos orgânicos voláteis e hormônios importantes para “comunicação” com outros organismos e crescimento da planta, respectivamente; biorremediação, metabolizando poluentes orgânicos e alguns pesticidas; além de poderem atuar ainda, no biocontrole e como biofertilizantes na agricultura (Peñuelas *et al.*, 2012; Perazzolli *et al.*, 2014).

A composição e a riqueza das comunidades bacterianas presentes na filosfera têm sido alvo de investigação, com diversos fatores ambientais, genéticos e fisiológicos sendo apontados como importantes *drivers* ou “moduladores” da estruturação dessas comunidades. A princípio, as comunidades bacterianas que compõem a filosfera provém de transmissão vertical, contida na própria semente, sendo transportadas por insetos, ou ainda migrando pelo ar e pela água (Kinkel, 1997; Allard *et al.*, 2016). Com o desenvolvimento da planta, outros fatores podem atuar modificando a estruturação dessas comunidades. Os principais fatores discutidos são com relação à espécie de planta hospedeira e às variações de tempo e espaço, sendo comumente ditos como os mais fortemente influentes sobre os micro-organismos nesta região (Redford *et al.*, 2010; Rastogi *et al.*, 2012; Vorholt, 2012). Comunidades microbianas que se desenvolvem no mesmo ambiente podem apresentar uma diferente composição

filosférica, assim como plantas da mesma espécie, mas com genótipos diferentes, podem selecionar diferentes micro-organismos (Kembel e Mueller, 2014; Lambais, Lucheta e Crowley, 2014). A composição fitoquímica, a produção de compostos químicos, a exposição à radiação UV, e os manejos agrícolas também podem influenciar a comunidade bacteriana, de acordo com a literatura (Ottesen *et al.*, 2009; Finkel *et al.*, 2011; Farré-Armengol *et al.*, 2016). Além disso, a avaliação da dinâmica da microbiota em relação às variáveis de espaço e tempo tem colaborado fortemente para a compreensão da ecologia microbiana na filosfera (Kinkel, 1997). Variações temporais, como ciclos e sazonalidade demonstram participar da modelagem da microbiota em sua composição e abundância (Kinkel, 1997; Finkel *et al.*, 2011; Rastogi *et al.*, 2012). Plantas anuais e perenes apresentam ciclos de vida diferentes, respondendo ao longo do tempo com alterações morfofisiológicas as quais criam micro-habitats distintos para as comunidades bacterianas, sendo mais um fator de seleção importante para a composição da filosfera (Jackson e Denney, 2011; Allard *et al.*, 2016).

2.4. O cobre foliar aplicado em manejos agrícolas

A manutenção do equilíbrio nutricional e fisiológico das plantas é essencial para seu desenvolvimento e resistência a estresses ambientais. Um balanço nutricional adequado pode tornar a planta menos susceptível ao ataque de patógenos, ou ainda ajudá-la a se recuperar de um ataque (Elmer e Datnoff, 2014). Quando bem nutridas as plantas tendem a produzir compostos mais complexos, dando origem a proteínas e polissacarídeos como por exemplo a celulose. Estes compostos são dificilmente utilizados como fonte de energia e carbono por parasitas, tornando assim a planta menos susceptível aos seus ataques (Paulus, Muller e Barcellos, 2000). Além disso, com a aplicação correta do manejo, o próprio sistema de defesa da planta consegue recuperá-la de algum distúrbio que possa ocorrer, suportando um determinado nível de ataque (Lambais, Lucheta e Crowley, 2014).

Em casos em que o sistema de defesa da planta não consegue se recuperar de um estresse sozinho, a aplicação de produtos fitossanitários como forma de remediar ou suplementar o cultivar se torna necessária (Srivastava, 2012). Elementos inorgânicos essenciais podem ser aplicados como forma de estimular mecanismos fisiológicos de defesa através de sua participação em rotas metabólicas (Elmer e Datnoff, 2014). Micronutrientes, como cobre, zinco e manganês, em baixas concentrações, podem atuar nas vias de produção de fenol e lignina, os quais apresentam potencial inibitório para o desenvolvimento de doenças nas folhas (Elmer e Datnoff, 2014). Desta forma, há um incentivo para o uso de

produtos contendo micronutrientes como adubo foliar para suplementação, como ocorre com a "calda bordalesa", composta por sulfato de cobre e cal hidratada, comumente usada para controle de patógenos e que também pode atuar na nutrição da planta, influenciando a produção de compostos nitrogenados que podem servir como fonte de energia para fungos e outros micro-organismos (Paulus, Muller e Barcellos, 2000; Elmer e Datnoff, 2014). Apesar de serem mais explorados pela agricultura convencional, alguns produtos são permitidos para a agricultura ecológica, porém apenas como medidas de remediação com as devidas orientações sobre como utilizar esses insumos químicos de forma que não prejudiquem ou causem danos às plantas, em geral em baixas concentrações (Altieri, 2013).

Atualmente, os principais produtos fitossanitários são à base de cobre, sendo utilizados especialmente como fungicidas e bactericidas no controle de diversas doenças do campo (Richard *et al.*, 2017). O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para organismos vivos e, quando em concentrações baixas, atua em diversos processos metabólicos, agindo principalmente como cofator enzimático (Altimira *et al.*, 2012; Behlau *et al.*, 2012). A capacidade redox do cobre permite que ele se altere entre duas formas, Cu (I) e Cu (II), que podem interagir com moléculas importantes de diversos processos enzimáticos por meio de reações de oxirredução (Ladomersky e Petris, 2015). Essa capacidade está fortemente relacionada ao alto potencial inibitório apresentado pelo cobre, afetando o crescimento de micro-organismos por diferentes mecanismos (Stirling *et al.*, 1999; Ottesen *et al.*, 2015). O cobre pode causar danos na parede celular, rompendo a membrana plasmática, causando assim o efluxo de componentes celulares importantes (Grass, Rensing e Solioz, 2011; Li *et al.*, 2014). Além de efeitos celulares, ainda pode desencadear a formação de espécies reativas de oxigênio e interagir com a molécula de DNA, degradando-a instantaneamente (Grass, Rensing e Solioz, 2011).

Na citricultura comumente faz-se uso dos produtos cúpricos, visando combater doenças causadas por micro-organismos, por meio da inibição tóxica de seu crescimento na superfície foliar (Ottesen *et al.*, 2015). Recentemente ainda foi descoberta a atuação do cobre com células do sistema imune, sendo utilizado pelo próprio sistema como "arsenal" de defesa contra patógenos (Fu, Chang e Giedroc, 2014; Ladomersky e Petris, 2015). Na área experimental do projeto citros do CPMO cedida para a execução deste trabalho, o uso de cobre tem enfoque no combate de duas doenças especificamente. A principal é "pinta preta" (do inglês "*black spot*"), a qual é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* e aflige as culturas de citros, sendo de difícil erradicação após sua infecção (Schutte *et al.*, 2012). Outras

enfermidades como verrugose, melanose, podridão foliar e macha alternaria também podem ser tratadas pelo uso dos produtos de cobre.

Alguns trabalhos têm demonstrado efeitos do uso desses produtos cúpricos sobre as comunidades microbianas residentes da filosfera de diversos cultivares. Na viticultura, o uso desses produtos demonstrou afetar a riqueza e a abundância microbiana a níveis significativos (Martins *et al.*, 2012). Organismos fototróficos podem ser alterados morfo-funcionalmente na presença de altas concentrações de cobre, interferindo na sua capacidade fotossintética (Massieux *et al.*, 2004).

Consequentemente, outro efeito que pode ocorrer devido às aplicações frequentes de cobre seria a seleção de linhagens tolerantes a este elemento, definindo grupos metabólicos na região da filosfera (Berg, Tom-Petersen e Nybroe, 2005). A adaptação de micro-organismos a metais pesados pode ocorrer por diversas vias genéticas, como plasmídios e mutações, e por vias celulares com a ativação de bombas de efluxo de Cu-ATPase e sistemas de transporte múltiplos (Grillo-Puertas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Migocka, 2015). Os mecanismos desenvolvidos pelas células se ligam ao cobre livre, responsável pelas reações oxidativas, e o compartimentalizam para reduzir seus efeitos tóxicos (Migocka, 2015). Em algumas espécies de arqueia e bactérias, a tolerância a metais pesados pode ainda estar relacionada com a presença de fosfato inorgânico, o qual atua como quelante reduzindo a concentração intracelular de metais pesados (Grillo-Puertas *et al.*, 2014).

2.5. Hipóteses

I- A comunidade bacteriana total da filosfera na linha de tratamento com manejo ecológico se encontra significativamente mais diversa e abundante do que aquela encontrada no convencional;

II- A comunidade bacteriana tende a ser favorecida em épocas sazonais mais chuvosas, se encontrando mais diversa;

III- Há uma maior presença de bactérias tolerantes ao cobre no tratamento convencional, com as plantas apresentando uma maior concentração do micronutriente.

2.6. Objetivos

2.6.1. Geral

Identificar se o tipo de manejo aplicado na cultura de citros pode interferir no perfil da comunidade bacteriana total da filosfera, em um curso sazonal, avaliando ainda a presença de bactérias tolerantes ao cobre resultantes dos diferentes tratamentos.

2.6.2. Específicos

- Isolar e identificar bactérias cultiváveis da filosfera de ambos os tratamentos;
- Isolar e identificar bactérias tolerantes ao cobre cultiváveis em meio de cultura com um gradiente de concentração de sulfato de cobre a partir de folhas de ambos tratamentos;
- Determinar alterações no perfil da estrutura da comunidade bacteriana da filosfera por meio de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), devido aos manejos (ecológico e convencional);
- Determinar alterações no perfil da estrutura da comunidade bacteriana da filosfera por meio de T-RFLP, devido a alterações sazonais como o período de chuva e seca;
- Avaliar a abundância de genes ribossomais da comunidade de bactérias (16S rRNA) por meio de PCR em tempo real (*qPCR*) afetados pela alteração de manejo;
- Avaliar a abundância de genes ribossomais da comunidade de bactérias (16S rRNA) por meio de PCR em tempo real (*qPCR*) causados por alteração sazonal;
- Caracterizar a comunidade bacteriana da filosfera de citros dos manejos convencional e ecológico, por meio do sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA através de Illumina MiSeq;
- Realizar análise da composição de nutrientes presentes no tecido foliar por meio de micro-análise de fluorescência de raio-X (μ -XRF);
- Realizar mapeamento espaço-temporal do cobre no tecido foliar por meio de μ -XRF;
- Correlacionar a composição química da filosfera com a composição da comunidade microbiana, tipo de manejo e sazonalidade.

3. METODOLOGIA

3.1. Área Experimental

A área experimental deste estudo se localiza na quadra 20 do pomar cítrico da Fazenda Santo Antônio do Lageado (22°08'49,4"S e 47°10'47,6"W), município de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, implantado no ano de 2007 (Figura 1). O pomar é dividido em dois tratamentos distintos, sendo um sob manejo convencional (CO) e o outro sob manejo ecológico (EC) com 2,25 hectares cada uma. Ambos os tratamentos foram mantidos e avaliados pelo Centro de Pesquisa “Mokiti Okada” (CPMO) – Fundação Mokiti Okada (Ipeúna, São Paulo). O solo da área é do tipo latossolo vermelho de textura franco-areno-argilosa. O clima da região é considerado do tipo Cwa, ou seja, subtropical com invernos secos e verões chuvosos – característico do Estado de São Paulo (Koeppen e Geiger, 1928). A espécie de citros em cultivo é classificada como, laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) variedade Westin sobre porta enxerto limoeiro Cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck) e sub-enxertado em campo com citrumeleiro Swingle (*Citrus paradisi* MACF x *Poncirus trifoliata* (L.) RAF).

A Tabela 1 caracteriza as atividades e estratégias utilizadas em cada um dos sistemas de manejo. É importante ressaltar que a área ecológica foi previamente destinada a uma produção orgânica, entretanto em seu último ano de avaliação (dezembro/2016), devido a problemas desenvolvidos pelo aumento da doença “pinta preta” nas duas áreas de avaliação, optou-se por utilizar doses de cobre além dos 6 kg/ha/ano permitidos para orgânico. As produções orgânicas no Brasil são determinadas pela Normativa 46 (MAPA, 2011) necessitando ser rigorosamente seguida, visto que qualquer aplicação além do que foi estabelecido não se enquadra na denominação “orgânico”, requerendo assim uma nova classificação para este tratamento - no caso, optamos por denominá-lo de manejo ecológico.

Tabela 1. Estimativa de insumos e práticas culturais utilizados nos tratamentos convencional (CO) e ecológico (EC) (Disponibilizados pelo CPMO em 2016)

Insumos / Operações	CO	EC
Adubações de solo e foliares*		
Cloreto de Potássio (60% K ₂ O)	200 a 300 kg.ha ⁻¹	Reduzir 25% por ano e substituir por K ₂ SO ₄
Nitrato de Calcio + B; 15,5% N, 19% Ca, 0,3% B	1000 a 1200 kg.ha ⁻¹	Reduzir 25% por ano
Fertilizantes foliares (N, P, K + micronutrientes)	15 a 20 L.ha ⁻¹	Reduzir 25% por ano
Bokashi (3% N; 1% P; 1% K)	--	500 a 800 kg.ano ⁻¹
Adubação Foliar ¹	--	Plantio anual
Controle fitossanitário**		
Inseticidas e acaricidas	Químicos: 14 a 16 X.ano ⁻¹ (Recomendados para citros)	Opções de alta seletividade ² e introdução do controle biológico
Fungicidas		Opções de menor agressividade ³ aos FMAs e introdução de controle biológico
Controle de vegetação espontânea***		
Herbicidas químicos nas linhas de citros.	3 a 4 X.ano ⁻¹	Substituição pela roçadeira de linha
Roço mecânico nas entrelinhas	5 X.ano ⁻¹	Manter

* Quantidades calculadas para laranjas (*in natura*) a produtividades de 30 a 40 t.ha⁻¹; ** Frequência estimada pelo histórico de aplicação da propriedade; *** Frequência estimada pelo histórico de aplicação e roçagem da propriedade.

¹Feijão de porco (*Canavalia ensiforme*) na linha e Desmódio (*Desmodium ovafolium* cv Itabela) na entrelinha; ² Classificação: 1- não seletivo; 2- baixa seletividade; 3- moderada seletividade; 4- boa seletividade e; 5- alta seletividade pelo Sistema AGROFIT (MAPA, 2017). Classificação específica quanto a seletividade e ácaros predadores (Gravena, 2005).; ³ Classificação: 1-baixo impacto; 2- médio impacto e; 3- alto impacto, baseado em testes em placas de Petri para fungos filamentosos e ensaios com vasos em casa de vegetação para FMA

Na Tabela 2 está resumido quais produtos foram aplicados em ambos os tratamentos durante as épocas estabelecidas de coleta, setembro/2016 e dezembro 2016, indicando o composto-ativo presente em cada um deles e a quantidade aplicada em cada tratamento. Esses valores de aplicação foram fornecidos pelo próprio CPMO, com as características emitidas nas bulas de cada produto.

Tabela 2. Produtos fitossanitários utilizados nas épocas de coletas das amostras de folha para análises químicas e microbiológicas, disponibilizados pela CMPO (2017)

Tipo de Produto	Composto-ativo	Seca (Set/2016)		Chuva (Dez/2016)	
		CO	EC	CO	EC
Fungicida	Oxicloreto de cobre	7,2 Kg	3,6 Kg	--	--
	Hidróxido de cobre	--	--	2 Kg	2 Kg
	Estrobilurina	0,3 L	--	--	--
Inseticida	Piretroide +	0,2 L	--	--	--
	Antranilamida				
	Neonicotinoides	--	--	0,24 Kg	--
Acaricida	Abamectina	1L	--	1L	--
Adubação Foliar	Fertilizantes foliar +	1L	--	1L	1L
	surfactante				
Outros	Óleo	1L	--	--	--

-- não houve aplicação do produto em questão.

3.2. Delineamento Experimental

O delineamento para a coleta de amostras foi baseado nas linhas centrais de avaliação previamente estabelecidas. Cada linha apresentava 125 espécimes de citros, os quais foram agrupados em conjuntos de cinco árvores formando pontos de referência. Quatro desses pontos foram usados para coleta de folhas, totalizando 20 árvores amostradas em cada linha de avaliação (Figura 1). Em cada árvore foram coletadas aproximadamente 40 folhas de aparência saudável para avaliações químicas e microbiológicas a serem executadas. As folhas foram cortadas a uma altura média de aproximadamente dois metros do solo, buscando maior representatividade, sendo estas diretamente dispensadas dentro de sacos plásticos esterilizados sem contato ou contaminação manual. Posteriormente, os sacos contendo as amostras foram encaminhados para o laboratório sendo mantidos à temperatura ambiente para análises em tempo curto e a -80 °C para análises posteriores a longo prazo. As coletas foram realizadas na época mais seca (setembro/2016) e na mais chuvosa (entre dezembro/2016 e janeiro/2017) para avaliar ainda uma possível variação sazonal entre os tratamentos. Com a finalidade de demonstrar a distribuição espacial e temporal do cobre, foram coletadas cinco folhas de cada grupo amostral para um mapeamento do elemento-traço, nos dias próximos à aplicação dos tratamentos fitossanitários e após quinze dias da primeira coleta.

Figura 1. Área experimental (em cima) de citros disponibilizada pelo CPMO para este estudo, a qual se localiza na Fazenda Santo Antônio do Lageado, no município de Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo (Imagem: Google, 2017). A baixo tem-se o delineamento experimental em linhas de avaliação em azul representando o tratamento ecológico, e em vermelho o tratamento convencional

3.3. Mapeamento da distribuição do cobre no tecido foliar

Para a construção de mapas de distribuição de cobre foram coletadas folhas dentro dos grupos determinados em cada linha de avaliação, de forma que representassem ambos os tratamentos. Visando uma demonstração temporal do movimento dos nutrientes no tecido foliar, as coletas foram realizadas baseando-se na aplicação dos produtos cúpricos, como descrito anteriormente. As amostras foram armazenadas em estufa a 50°C por 72h para secagem. A análise foi realizada a partir da técnica de microanálise por fluorescência de raio-X (XRF), a qual permite a investigação de uma área da amostra em nanoescala, sem a necessidade da destruição completa da integridade da amostra. As folhas foram analisadas através do aparelho Orbis PC μ -XRF system, localizado no Laboratório de Instrumentação Nuclear do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA/USP) disponibilizado pelo Prof. Dr. Hudson Wallace Pereira de Carvalho. As análises foram realizadas com um feixe de raio-X de 1mm de espessura, nas configurações de 30 Kv de tensão por uma corrente 300 μ A em uma matriz de 64:50 (sem filtro e com vácuo), com cada ponto tendo período de leitura por dois segundos. As imagens de distribuição de cobre e

de outros elementos foram geradas a partir do software EDAX Spectral Processing Utilities, obtendo-se a leitura de fótons de raio-X emitidos por ponto irradiado da amostra. A partir destas imagens, foram gerados os mapas pelo software gráfico OriginPro® 2017.

3.4. Análises microbiológicas da filosfera

3.4.1. Isolamento de bactérias cultiváveis presentes na filosfera

Primeiramente, as folhas foram agitadas a 150 rpm em 50 mL de solução salina a 0.9% por 1h30min para desprender do tecido foliar todas as partículas presentes na superfície, incluindo os micro-organismos. A mesma solução com as folhas passou pelo processo de sonicação por 20 min a 22,5 kHz em um aparelho ultrassônico celular, o qual preserva a estrutura celular, removendo o que está aderido à superfície, evitando o desalojamento de organismos endofíticos (Lambais, Lucheta e Crowley, 2014). Foram preparadas suspensões para cada tratamento. A partir destas suspensões foram feitas diluições seriadas nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-5} em solução salina, em que 100 μ L das diluições foram plaqueadas em meio TSB (*Tryptone Soy Broth*) 5% acrescido de Ágar a 1,5%. As placas foram feitas em duplicatas e incubadas a 30 °C durante 5 dias para a contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) por grama de tecido foliar, com os valores sendo analisados por teste T-independente ($p < 0,05$), através do software estatístico R 3.4.1 2017.

3.4.2. Isolamento de bactérias cultiváveis tolerantes ao cobre presentes na filosfera

Para isolar as bactérias tolerantes ao cobre foi necessário inicialmente fazer uma indução à tolerância em meio líquido, permitindo assim selecionar os organismos-alvo. Primeiramente foram preparadas diferentes concentrações de cobre em caldo nutriente, de acordo com Rathi e Nandabalan (2017). Em 100 mL deste meio eram adicionadas as seguintes concentrações 0 (controle), 50, 100 e 200 μ g/mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Costa *et al.*, 2012), das suspensões preparadas para cada tratamento. O processo de indução foi realizado por 15 dias em que foram mantidas em agitação a 120 rpm em temperatura de 30 °C, sendo que as primeiras suspensões foram feitas com as folhas no caldo nutriente. Após o período de 5 dias, 3 mL dessa suspensão eram transferidos para o novo meio com a mesma concentração de sulfato de cobre. Finalizado o período de indução, as soluções finais foram diluídas em

solução salina para as concentrações de 10^{-1} até 10^{-9} em meio sólido contendo os mesmos ingredientes do caldo nutriente e nas concentrações de sulfato de cobre correspondentes. As placas foram feitas em triplicatas e incubadas a 30 °C por 48h para a contagem de UFC/g de tecido foliar, com os valores encontrados sendo analisados por ANOVA, com Tukey a 5%.

3.4.3. Extração de DNA total e dos isolados bacterianos cultivados

A extração de DNA microbiano foi realizada a partir de uma solução com folhas preparadas como descrito no item 3.4.1, até o processo de sonicação. Em seguida, as suspensões obtidas foram transportadas para falcons de 50 mL e centrifugadas por 30 min a 14000 rpm em temperatura de 4 °C. No caso das bactérias isoladas em meio de cultivo, estas foram colhidas da própria cultura com um palito autoclavado e dispostas em microtubos de 2 µL contendo solução salina a 0,9%, sendo centrifugadas a 4 °C por cinco minutos a 14000 rpm para concentração do material microbiano. O pellet resultante em ambos os procedimentos foi ressuspensionado em microtubos de 2 µL para posterior extração de DNA e armazenado a -20 °C até seu processamento.

As amostras foram submetidas ao método convencional para extração orgânica, em que primeiramente faz-se a lise celular por agitação com “beads” de vidro, seguida da remoção de componentes restantes por centrifugação. Nesta técnica utilizam-se solventes orgânicos, como a mistura de 1:1 de fenol clorofórmio para a remoção de estruturas proteicas da solução. Após a precipitação dos solventes, o DNA foi separado por centrifugação a 16.000 rpm por 10 minutos em 4 °C e posteriormente recuperado com etanol a 70%. O resultado das extrações é avaliado pelo método de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1x (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), com aplicação de 5µL do produto do DNA extraído misturado a 1µL de corante gel “loading buffer” para aumentar a densidade da amostra com corante fluorescente GelRed™.

3.4.4. Determinação da estrutura da comunidade de bactérias totais por T-RFLP

Para avaliar o perfil da comunidade bacteriana na região da filosfera, o método de *fingerprinting* utilizado foi o T-RFLP. Semelhante à metodologia de PCR, o DNA extraído foi submetido ao processo de amplificação com os *primers* específicos para região ribossômica 16S rRNA para bactéria. Para a determinação de bactérias totais presentes na

filosfera foram utilizados os *primers* FAM-8FM (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'). A solução preparada para PCR era composta de uma mistura contendo 2 µl da suspensão de DNA, 3,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 20 pmol dos *primers*, PCR *buffer* 1X, 2,5 unidade de Taq DNA polimerase e 10 mg/mL de BSA (Albumina de Soro Bovino), sendo o volume completado com água miliQ autoclavada para 50 µl. Para o processo de amplificação em si, a termociclagem apresentava as seguintes condições, 95°C por 4 minutos; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C 45 segundos; finalizando a 72°C por 10 minutos (Durrer *et al.*, 2017).

Ao fim da amplificação, as amostras foram purificadas, o que consiste na adição de 200µl de isopropanol no volume total do produto de PCR (50µl), seguido de um período de 2h de incubação em temperatura ambiente. Posteriormente, o produto foi centrifugado a 4.500 rpm durante 1h e 30 minutos, descartado e seguido da adição de 250 µl de etanol absoluto para mais um processo de centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as placas ressuspensas em 50uL de água autoclavada e tendo o produto final quantificado em gel de agarose 1,5%.

Em seguida, aproximadamente 200 ng do produto amplificado e purificado foi utilizado no processo de clivagem com o uso de enzima *HhaI* para bactérias, sendo lida duas vezes em sequenciador automático ABI Prism 3500 (Applied Biosystems) com a matriz azul e o marcador de tamanho de fragmentos 600pb.

As diferenças apresentadas pelas comunidades bacterianas entre os manejos convencional e ecológico, e ainda entre as épocas de seca e chuva amostradas, foram exploradas por meio da análise de coordenadas principais (PCoA) e suas similaridades foram avaliadas por meio do teste de ANOSIM através do software PAST 2.17 (Paleontological Statistics).

3.4.5. Abundância bacteriana na filosfera por PCR em tempo real (*qPCR*)

A execução da reação de amplificação em tempo real (*qPCR*) é realizada com o uso de StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e nas reações de amplificação foi utilizado o marcador fluorescente Syber® Select Master Mix (Applied Biosystems®). Os *primers* usados para essa reação foram P1 (5' -CCTACGGGAGCGAGCAG- 3') e P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTTGG-3') para bactérias, com a quantificação dos genes 16S sendo realizada a partir de um ciclo de desnaturação inicial equivalente a 95°C por três minutos, seguido de 35 ciclos intercalando entre trinta segundos a 94°C, trinta segundos a 55°C e trinta

segundos a 72°C, sendo finalizada com uma extensão a 72°C por quarenta e cinco segundos (Mosoni *et al.*, 2007).

Para a quantificação, curvas padrões são obtidas realizando amplificações com o número de cópias conhecidas do DNA molde adicionado novas reações. Desta maneira, os dados da amplificação do DNA extraídos das amostras de filosfera dos dois tratamentos foram interpolados na curva padrão para determinar o número de cópias do gene de interesse. As amostras ainda foram quantificadas por fluorimetria usando o fluorômetro Qubit (Invitrogen™), o qual informa a quantidade de DNA presente a partir 1 µg de amostra em ng/µL. Esses valores obtidos são utilizados para determinar a abundância bacteriana total juntamente com os dados determinados pela curva de qPCR para bactéria, tendo-se, por fim, os resultados finais apresentados em número de cópias na amostra/ng de DNA.

Os dados gerados foram correlacionados ao perfil bacteriano obtido para os tratamentos e época do ano, no intuito de determinar se a abundância de bactérias na filosfera de citros se modifica com relação a esses fatores. Os dados obtidos foram analisados a partir de ANOVA, com Teste de Tukey a 5%.

3.4.6. Sequenciamento Illumina MiSeq 16S rRNA

Em triplicata, as amostras de DNA extraídas previamente a partir da filosfera de cada área foram utilizadas para o sequenciamento do tipo *paired-end* no sistema Illumina MiSeq. Após a extração, as amostras foram purificadas com o uso do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, visando eliminar resquícios de impurezas nas amostras. O resultado da purificação foi analisado em gel de agarose a 1% com a presença de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™) em 2 µL para determinar o tamanho do amplicon obtido. As amostras purificadas foram encaminhadas ao Laboratório de Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia (ESALQ/USP) para o processamento final das amostras e o sequenciamento no aparelho MiSeq (Illumina) com kit V2 (2 X 250 pb).

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa QIIME™ 1.9.1 para análises de DNA microbiano, para atribuir a identidade taxonômica das chamadas unidades taxonômicas operacionais (UTO) e determinar a estrutura filogenética e diversidade bacteriana (Caporaso *et al.*, 2010). Os amplicons *foward* e *reverse* gerados para cada amostra foram montados utilizando o comando "*multiple_join_paired_ends.py*". Em seguida, os arquivos foram compilados em um único arquivo *fasta*, sendo processados pela função "*multiple_split_libraries_fasta.py*", de acordo com as especificidades do pacote. O processo

de "clusterização" de sequências para a formação de UTOs foi realizado com o algoritmo SUMACLUSt, o qual permite agrupar as mesmas com alta acurácia, estabilidade e herdabilidade (Jackson *et al.*, 2016). O arquivo gerado foi comparado com um banco de referência, cruzando as informações contidas em ambos a partir do script "*pick_rep_set.py*", permitindo a afiliação taxonômica às UTOs formadas. O banco de dados Silva (128) (Yilmaz *et al.*, 2014) foi utilizado como referência no QIIME (*parallel_assign_taxonomy.py*) usando o algoritmo UCLUST. A partir dos arquivos "*seqs_otus.txt*" e "*tax_assignment.txt*" foram utilizados para a construção da tabela de UTOs em formato BIOM. Devido à compatibilidade da região ribossomal 16S de bactérias com cloroplastos e mitocôndrias, foi necessário utilizar um filtro (*filter_taxa_from_otu_table.py*) para eliminar as sequências compatíveis entre eles.

A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada a partir do comando "*core_diversity.py*", o qual permitiu medir α diversidade a partir dos índices de *phylogenetic distance* Chao e números de UTOs encontrados. O comando ainda gerou uma matriz de distância Unifrac, a partir da qual foi analisada a β diversidade. Posteriormente, a matriz de distância foi submetida a uma análise de coordenadas (PCoA) utilizando-se o software PAST 2.17.

3.4.7. Identificação dos isolados bacterianos totais e tolerantes ao cobre por sequenciamento Sanger 16S rDNA

A partir dos isolados bacterianos obtidos foi realizada a extração de DNA, como descrito anteriormente, para identificação por sequenciamento Sanger de primeira geração. O DNA extraído foi amplificado pela seguinte reação de PCR, com os *primers* universais para o gene 16S rRNA 27f e 1492r (Lebeis, 2017). A solução preparada era composta de uma mistura contendo 1 μ L da suspensão de DNA dos isolados, 7.5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 20 pmol dos *primers*, PCR buffer 1X e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase, sendo o volume completado com água miliQ para 50 μ L. O processo de amplificação apresentava as seguintes condições, 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; finalizando a 72°C por 10 minutos. Após a extração, as amostras foram purificadas com o uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, visando eliminar resquícios de impurezas nas amostras. O resultado da purificação foi analisado em gel de agarose a 1% com a presença de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™) em 2 μ L para determinar o tamanho do amplicon obtido, o qual define a quantidade do produto de DNA a ser utilizada nos passos seguintes. Após a purificação, foram realizadas reações de PCR

usando os *primers* para 16S rRNA usando o kit de sequenciamento *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing*. A solução de PCR consiste em 3µl do DNA extraído, PCR *buffer* 1x, 1µl da solução de *BigDye* v3.1, 0,5µM *primer* 1492r ou 027f, completando com água miliQ para 10 µl. As condições da reação de sequenciamento foram estabelecidas de acordo com o protocolo do kit *BigDye*: 95°C por 1 minuto; 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos; finalizando a 10°C por 10 minutos. As amostras foram dispostas em placas de 96 poços e seladas com adesivo resistente para evitar evaporação.

Finalizada a reação de sequenciamento, fez-se o processo de precipitação das sequências nas amostras com o uso de EDTA e acetato de sódio 3M, adicionado posteriormente de álcool 100% e centrifugado por 45min a 4.000 rpm em uma temperatura de 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet residual foi lavado com 150 µl de etanol 70%, seguido de mais uma centrifugação por 15min a 4.000 rpm em 4° C. O sobrenadante foi novamente descartado e a placa foi completamente seca no escuro, sendo então encaminhada para sequenciamento. As sequências obtidas foram alinhadas e identificadas a espécies bacterianas correspondentes usando o algoritmo BLAST no banco de dados de referência do NCBI BLASTn 16s rRNA (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por fim, as árvores filogenéticas foram executadas pelo software MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), utilizando o método de *Neighbour-joining Tree* para a construção das árvores filogenéticas (Andreote, 2007). As distâncias evolutivas entre as espécies foram calculadas pelo método *Kimura 2-parameter*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comunidade bacteriana total cultivável e não cultivável na filosfera

A comunidade bacteriana da filosfera representa a maior parte dos organismos colonizadores deste hábitat, considerando mutualistas e patógenos (Lambais, Lucheta e Crowley, 2014). Esse alto nível de colonização desta região a torna um importante nicho microbiano tanto para o ambiente quanto para a agricultura, já que os organismos associados à planta podem interferir no *fitness* do hospedeiro e, conseqüentemente, na qualidade do cultivar (Whipps *et al.*, 2008; Laforest-Lapointe, Messier e Kembel, 2016).

As técnicas clássicas de cultivo *in vitro* permitem avaliar os micro-organismos cultiváveis presentes no ambiente, destacando grupos importantes a serem avaliados que podem ser usados em ensaios futuros. A tabela 3 abaixo descreve morfologicamente as UFCs (unidades formadoras de colônia), de acordo com Sobral (2003), obtidas a partir da filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico, as quais foram selecionadas e isoladas posteriormente para identificação de bactérias cultiváveis. Os isolados apresentaram diferentes características, destacando-se sua forma de crescimento e coloração como principais indicadores de divergência entre eles. Na figura 2 são mostradas algumas das colônias cultivadas a partir da filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico. No total, foram obtidos oito isolados bacterianos, com nenhum destes se mostrando exclusivo de algum dos tratamentos.

Figura 2. Isolados bacterianos da filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico. A e B- Cultivo total de bactérias; C a F- Colônias isoladas e posteriormente sequenciadas

Tabela 3. Características morfológicas dos isolados bacterianos de filosfera sob manejo convencional e ecológico

Isolado	Forma	Coloração	Tamanho	Aspecto	Borda	Opacidade
C1	Circular	Laranja	Variado	Cremoso Liso	Regular	Opaca
C2	Circular	Amarela	Pequeno	Cremoso	Regular	Translúcida
C3	Circular	Branca	Variado	Cremoso Liso	Irregular	Opaca
C4	Circular	Rosa	Variado	Seco Liso	Irregular Halo de cor diferente	Opaca
C5	Irregular	Branca	Variado	Liso	Irregular Halo da mesma cor	Opaca
C6	Circular	Amarela	Pequeno	Cremoso Liso	Regular	Opaca
C7	Irregular	Amarela	Pequeno	Seco Liso	Irregular	Opaca
C8	Irregular	Branca	Variado	Seco Liso	Irregular Halo da mesma cor	Translúcida

A contagem das UFCs foi realizada em triplicata para cada tratamento, o que permitiu obter a variação dos valores encontrados. A tabela 4 abaixo mostra em log a média dos valores de UFCs bacterianas obtidas a partir da filosfera para ambos os manejos. A abundância relativa da comunidade bacteriana cultivável total mostra uma similaridade quantitativa entre os organismos cultiváveis, não tendo diferença estatisticamente significativas entre os valores ($p=0,634$). Esse resultado pode ser devido às limitações apresentadas pelas técnicas de cultivos que selecionam apenas os organismos capazes de crescer *in vitro* e com as condições determinadas no ensaio.

Tabela 4. Contagem de UFC total por grama de tecido foliar em log10 obtidas a partir da filosfera de citros sob manejo convencional (CO) e ecológico (EC)

Manejo Aplicado	Log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tecido foliar
CO	4,08
EC	3,97

Posteriormente, os isolados foram sequenciados a partir de amostras de DNA extraído utilizando-se *primers* universais de 16S ribossomal para bactéria e identificados dentro de árvores filogenéticas de acordo com suas características taxonômicas. As sequências obtidas foram alinhadas e filtradas para a eliminação de quimeras, sendo identificadas de acordo com a similaridade encontrada no *BlastN* search. Os isolados se agruparam nos seguintes gêneros, *Sphingomonas* (PB1), *Citrobacter* (PB3), *Micrococcus* (PB6), *Pantoea* (PB7) e *Bacillus* (PB4, PB5 e PB8), com altos valores de bootstraps (figura 3), os quais são comumente encontrados na filosfera de diversas culturas agrícolas (Martins *et al.*, 2013; Reisberg *et al.*, 2013; Venkatachalam *et al.*, 2016).

Figura 3. Filogenia de isolados bacterianos encontrados na filosfera de citros sob ambos manejos convencional e ecológico, separados em diferentes gêneros, demonstrando sua relação com demais sequências do banco de dados NCBI. A filogenia é baseada no agrupamento de sequências por similaridade por *neighbour-joining* utilizando a sequência parcial do gene 16S rDNA. Os valores de *bootstrap* apresentados nas árvores foram realizados com 1000 subamostragens nos grupos de sequências. A sequência do gene 16S rDNA de *Anabaena oscillarioides* foi usada como grupo externo para enraizamento.

Como pode ser observado na figura 3, três dos oito isolados foram identificados como *Bacillus*, tornando este o gênero dominante dentre as colônias cultiváveis. Espécies do gênero *Bacillus* são altamente reconhecidas pelo seu potencial em induzir o sistema de defesa da planta e em atenuar diversos micro-organismos patogênicos, como por exemplo o gênero *Xanthomonas* responsável pelo desenvolvimento do cancro cítrico (Huang *et al.*, 2012). Além disso, *Bacillus* pode produzir hormônios como o ácido indol-acético (AIA), o qual é responsável por estimular o crescimento vegetal (Venkatachalam *et al.*, 2016). Em consequência desta interação positiva com a planta, o uso de linhagens de *Bacillus* como inoculante biológico, sendo alternativa a agroquímicos, é comumente incentivado na agricultura sustentável, sendo este considerado um importante organismo para a agroindústria (Huang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Apesar da importância em aplicar as técnicas de cultivo, apenas aproximadamente 10% da comunidade bacteriana total pode ser avaliada por meio dessa metodologia, restringindo o acesso a comunidade real presente em determinado ambiente (Müller e Ruppel, 2014). Assim, buscando estender as análises microbiológicas, tem-se recorrido às metodologias moleculares independentes de cultivo em conjunto com a tecnologia dos softwares de análise de dados, os quais vêm constantemente crescendo dentre os estudos filogenéticos da área (Jackson *et al.*, 2016). Neste trabalho, utilizamos de técnicas NGS (*New Generation Sequencing*) para investigar os principais grupos de bactérias que compõem a filosfera do manejo convencional e ecológico, respectivamente, comparando a diversidade bacteriana presente em ambos. No total foram encontradas 1.250 UTOs (unidades taxonômicas operacionais) com similaridade de 97% para clusterização das amostras avaliadas dos dois manejos, com uma média de 280,67 UTOs encontrados no manejo convencional e 359,67 no manejo ecológico. Na figura 4, está representada a distribuição a nível de filo dos grupos bacterianos presentes na filosfera sob manejo convencional e ecológico em triplicata. É possível observar aqui uma distinção entre os tratamentos, com as amostras elucidando uma diversidade bacteriana nas áreas.

Figura 4. Distribuição bacteriana a nível de filo das amostras de filosfera sob manejo convencional (CO) e ecológico (EC) em triplicata

Os filos dominantes em ambos tratamentos são Proteobacteria (83,7%), Bacteroidetes (11,4%), Actinobacteria (2,3%) e Firmicutes (0,6%), respectivamente. Estes grupos bacterianos são considerados na literatura como parte do microbioma residente sendo frequentemente descritos compondo o micro-ambiente criado no tecido foliar (Bodenhausen *et al.*, 2014; Truchado *et al.*, 2017). No carpoplano de citros, ou seja, na superfície dos frutos, já foi registrada a presença preponderante de Proteobacteria, com dominância representada por *Methylobacterium* e *Sphingomonas*, Actinobacteria e Bacteroidetes, mostrando que há uma relação desses organismos com a espécie hospedeira (Gomba, Chidamba e Korsten, 2017). Em Jo *et al.* (2015), foram comparadas as comunidades bacterianas presentes no filoplano de quatro espécimes de frutas, damasco, cereja, pêssgo e ameixa. Neste estudo, mesmo em diferentes abundâncias, foi descrita a presença desses mesmos grupos como dominantes da superfície foliar nos quatro cultivares, o que mostra que estes podem ser os principais habitantes da superfície de muitas espécies da filosfera de frutíferas.

Figura 5. Distribuição bacteriana a nível de classe das amostras de filosfera sob manejo convencional (CO) e ecológico (EC) em triplicata

Dentro de Proteobacteria, temos a presença das quatro principais classes que compõem o grupo, sendo as Alphaproteobacteria (78,2%) as mais abundantes em ambos os tratamentos (Fig 5). Em seguida, encontra-se a classe Cytophagia (10,7%) representando o filo Bacteroidetes. Ainda na figura 5 é possível observar uma discrepância na distribuição de Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Actinobacteria entre os tratamentos. A primeira classe citada se sobressai nas amostras do manejo convencional, refletindo a abundância das ordens Enterobacteriales e Pseudomonadales, enquanto as duas outras são mais presentes dentro do manejo ecológico, representando Burkholderiales e Micrococcales,

respectivamente. Apesar de se apresentarem quantitativamente distintos nos tratamentos, todos esses grupos podem ser observados em ambos. Isto implica na hipótese de que a comunidade bacteriana compartilhada pela filosfera de citros sob dois tratamentos pode ser parte da microbiota residente, a qual é selecionada pela própria espécie hospedeira (Griffin e Carson, 2015). Num estudo sobre a aplicação de diferentes fertilizantes orgânicos e sintéticos em tomates foi também demonstrada a persistência de espécies comuns na filosfera, indicando o hospedeiro como apto a manter suas comunidades microbianas, independentemente do insumo aplicado (Allard *et al.*, 2016).

Correlacionando os isolados apresentados anteriormente, vemos também a presença dos gêneros *Sphingomonas* (8,8%) e *Bacillus* (0,2%). Ambos são importantes auxiliares na defesa da planta com a produção de compostos antimicrobianos contra patógenos do hospedeiro, e outros possíveis competidores (Bodenhause *et al.*, 2014), sendo encontrados em uma abundância relativa considerável em ambos os tratamentos. Os demais isolados não foram detectados em grande abundância, entretanto os grupos que os representam são demonstrados pelas figuras 4 e 5.

A funcionalidade das comunidades bacterianas com a filosfera pode auxiliar no entendimento de fatores que determinam quais micro-organismos se associam à planta. A dominância do grupo Alphaproteobacteria, por exemplo, se dá pela presença de bactérias metilotróficas, os quais metabolizam metanol (CH_3OH) ou metano (CH_4) e outras moléculas orgânicas liberadas pela planta como fonte de carbono e energia (Jo *et al.*, 2015; del Rocío Bustillos-Cristales *et al.*, 2017). Representadas pelo gênero *Methylobacterium* (64,1%), esses micro-organismos estão envolvidos na produção de fitohormônios, estimulação da defesa sistêmica da planta hospedeira e fixação de nitrogênio (del Rocío Bustillos-Cristales *et al.*, 2017). Os papéis exercidos por eles são exemplos que reforçam a necessidade de manter a microbiota residente da planta e estimular seu crescimento e interação saudável com a mesma, aderindo assim aos serviços ecossistêmicos promovidos por eles dentro do manejo agrícola aplicado.

Comparando as áreas de manejo em parâmetros ecológicos, apesar de apresentarem grupos taxonômicos importantes compartilhados por ambos tratamentos, a abundância relativa parece variar entre eles. Apesar do pouco efeito sobre a composição bacteriana, em nosso estudo a aplicação dos diferentes manejos pode ter levado a variações na alfa diversidade, com a área ecológica tendo a capacidade de conter comunidades mais complexas. A observação da figura 4 indica uma composição mais distinta de espécies de bactérias na filosfera sob manejo ecológico, como uma distribuição maior dos grupos neste tratamento.

Esta observação pode ser confirmada a partir da análise de uma curva de rarefação, a qual é representada abaixo (fig. 6). A curva permite avaliar a diversidade α , ou seja, local de cada tratamento. Os dados apresentados demonstram uma maior diversidade filogenética na área ecológica entre as sequências de cada amostra, sendo sua curva sempre relativamente superior àquela encontrada para as amostras da área convencional.

Figura 6. Curva de rarefação representando a diversidade α da filosfera sob manejo convencional (vermelho) e ecológico (azul), em função da diversidade filogenética encontrada (PD_whole_tree)

Uma comunidade microbiana mais complexa permite uma influência maior da microbiota bacteriana sobre as propriedades das superfícies foliar e no desenvolvimento da planta, assim como, pode ser relacionada com a produtividade agrícola de um cultivar (Andreote, Gumiere e Durrer, 2014). Quanto maior a alfa diversidade em um determinado ambiente, mais nichos são ocupados e se tornam indisponíveis a organismos invasores e patogênicos. van Elsas *et al.* (2012) demonstraram uma correlação negativa entre a diversidade microbiana no solo e a sobrevivência de um micro-organismo invasor, a qual pode ser explicada com relação a competitividade entre estes e as comunidades residentes por nicho e recursos disponíveis. Esse mesmo conceito pode ser aplicado à filosfera, em que a resistência a colonização por patógenos pode ser alcançada a partir do favorecimento das comunidades residentes. Correlacionando aos resultados obtidos aqui, esses conceitos

induzem ainda a acreditar que a área ecológica estaria menos susceptível a ataque de patógenos do que os cultivares sob manejo convencional.

Além de comparar pontualmente dentro de cada tratamento, foi possível ainda avaliar a similaridade entre a composição da estrutura da comunidade bacteriana da filosfera sob cada manejo. A análise de coordenadas (PCoA) na figura 7 explica a dissimilaridade entre a diversidade bacteriana, pela variabilidade espacial dos dados apresentados em 73,2% pelo eixo 1. Apesar do número reduzido de amostras para essa análise, vê-se uma evidente separação das comunidades, o que permite dizer que a filosfera bacteriana é diferente sob cada manejo, em termos de diversidade.

Figura 7. Análise de coordenadas (weighted_unifrac) das amostras de filosfera bacteriana sob manejo convencional (vermelho) e ecológico (azul)

Em Laforest-Lapointe *et al.* (2017) foi avaliado como a estrutura da comunidade bacteriana associada à planta afeta a produtividade de 19 diferentes espécies de árvores na região de Montreal, Canadá. Neste trabalho pôde ser demonstrado que a composição bacteriana pode não ter muita influência, entretanto, a diversidade é fortemente correlacionada de forma positiva com a produtividade da planta. Essa correlação pode se dar devido ao efeito dos micro-organismos sobre o fenótipo e fisiologia da planta hospedeira (Andreote e Silva, 2017). Concomitantemente, a aplicação de fundamentos da agroecologia no manejo torna a

área mais natural, propiciando a manutenção e reestabelecimento da diversidade (Andreote e Silva, 2017). Além disso, já foi demonstrado que no solo, a estimulação das atividades microbianas, proposta pela agricultura alternativa à convencional, melhora a qualidade do solo e, conseqüentemente, melhora a produção da área de cultivo (Hartmann *et al.*, 2015). Esta conclusão permite inferir que, em nosso estudo, a área ecológica de citros poderia ter sua produtividade otimizada em função da diversidade bacteriana da filosfera, já que essa se mostrou maior sob este tratamento do que na área convencional.

A partir da análise desses resultados, vemos então que a primeira hipótese proposta para este trabalho de que a linha de tratamento sob manejo ecológico é colonizada por um grupo bacteriano significativamente mais diverso na filosfera do que aquela sob manejo convencional, se mostra afirmativa. Além disso, é pertinente ainda indicar o manejo agrícola como um *driver* das comunidades bacterianas na filosfera, ou seja, um fator que interfere e modula a composição e abundância de bactérias na superfície foliar em citros, já que foi possível observar que o manejo ecológico caracteriza uma diversidade significativamente diferente do manejo convencional.

4.2. Perfil bacteriano em função temporal e do manejo agrícola

No estudo da filosfera, uma das maiores dificuldades está em determinar quais fatores afetam esse micro ecossistema e se algum deles é predominante no efeito sobre sua estruturação na superfície foliar. Por conta de sua alta exposição, a filosfera apresenta uma condição adversa em que apenas micro-organismos capazes de residir sob constantes variações ambientais e escassez nutricional são encontrados (Peñuelas *et al.*, 2012). Além disso, uma complexidade de fatores ambientais, genéticos, bioquímicos e fisiológicos pode modular a composição e atividade bacteriana nesse hábitat.

Compreender a dinâmica da colonização bacteriana na filosfera pode esclarecer o papel desses micro-organismos no ambiente, sua interação com a planta, e ainda a possibilidade de sua aplicação biotecnológica, principalmente em relação à produtividade e qualidade do cultivar (Copeland *et al.*, 2015; Ortega, 2016). Manejos agrícolas podem ter importantes efeitos sobre a composição microbiana, e esta difere entre a agricultura convencional e a orgânica (Ortega, 2016; Ottesen *et al.*, 2016). O grande interesse em avaliar os efeitos dos manejos nessas comunidades provém da necessidade de se entender quais as práticas mais adequadas para favorecer a produtividade, bem como seu efeito sobre o ecossistema e a qualidade do produto a ser consumido.

Na sessão anterior foi demonstrado, por meio de análises de sequenciamento, que a filosfera sob manejo ecológico se diferencia do convencional, tendo uma maior diversidade bacteriana. Assim também já foi demonstrado por outros pesquisadores que a diversidade bacteriana na filosfera de macieiras apresenta significativa diferença entre o manejo convencional e orgânico. Já que esses manejos divergem principalmente em relação aos produtos químicos aplicados, isso seria uma explicação para esclarecer um potencial efeito das atividades agrícolas (Ottesen *et al.*, 2009). As comunidades fúngicas residentes também já demonstraram alterações resultantes do manejo aplicado. Cordero-Bueso *et al.* (2011) comparam os efeitos do manejo convencional e orgânico nas comunidades fúngicas residentes na filosfera de vinhedos. Novamente encontrou-se uma maior diversidade e atividade microbiana na área orgânica, a qual apresenta uma menor quantidade de resíduos químicos de compostos fitossanitários nas folhas. Estes resultados favorecem a proposta agroecológica de reduzir o uso de compostos antimicrobianos. A partir desses resultados demonstrou-se a importância do manejo agrícola sobre a atividade e a composição bacteriana.

Entretanto, com tantos outros fatores ambientais podendo interferir na estruturação das comunidades microbianas presentes na filosfera, uma sobreposição de influências pode ocorrer, com alguns fatores sendo *drivers* mais consistentes do que outros. Dessa forma, a partir de análises de *fingerprint*, como T-RFLP, procurou-se observar como a estrutura bacteriana se comporta em relação a mais de um fator ambiental. Neste trabalho, a dinâmica da filosfera foi avaliada em relação ao manejo agrícola e às variações temporais das épocas de coleta, sendo demonstrado através de uma análise de coordenadas principais (Fig. 8).

Figura 8. Estrutura da comunidade bacteriana total na filosfera de citros sob manejo convencional (amarelo e rosa) e ecológico (azul claro e azul marinho) em diferentes épocas do ano (seca em quadrado, chuva em triângulo), através de uma análise de coordenadas principais (PCoA) pelo index de Bray-curtis

As análises do perfil bacteriano mostraram que o fator tempo, ainda mais do que o manejo agrícola, influencia a forma como as comunidades se estruturam, com o eixo 1 da PCoA explicando 48,6% da distribuição das amostras. Avaliando-se os dados por meio de uma Análise de Similaridade (ANOSIM), vemos que o valor de $R=0,61$, tendendo a uma dissimilaridade significativa com $p=0,0001$. As amostras representadas por quadrados são referentes à época da seca, quando se vê uma clara sobreposição dos manejos ($R=0,10$; $p=0,06$). Já aquelas representadas por triângulos expressam o perfil das bactérias na época de chuva e, apesar de não haver diferença significativa entre os manejos ($R=0,04$; $p=0,19$), as amostras demonstram maior variação em sua composição. Assim, pode-se inferir que a influência que o manejo agrícola demonstrou anteriormente neste trabalho sobre as comunidades filosféricas pode ser reduzida quando o fator tempo é avaliado

concomitantemente, com este predominando como principal modulador da estruturação bacteriana na área avaliada.

A sazonalidade está relacionada com alterações climáticas, disponibilidade de recursos e produtividade, com as épocas mais chuvosas estimulando as comunidades microbianas na filosfera (Peñuelas *et al.*, 2012). Flutuações temporais na composição bacteriana já foram registradas em função das fases de crescimento da planta, por questões sazonal e anual (Jackson e Denney, 2011). Em Pagadala *et al.* (2015) os efeitos espaço-temporais foram mais significativos sobre a estrutura bacteriana do que o manejo agrícola em si, entretanto eventos climáticos e algumas aplicações químicas podem ter ainda tido certa influência sobre ela. Outros trabalhos ainda mostraram o fator temporal reduzindo os efeitos inicialmente relacionados à localização geográfica e ao estágio de desenvolvimento da planta (Copeland *et al.*, 2015; Dees *et al.*, 2015). Desta forma, o fator temporal pode ser atribuído como um forte modulador microbiano na filosfera, com potencial para predominar sobre outros fatores que atuam na dinâmica dos micro-organismos nesse ambiente.

Além da estruturação microbiana, foi avaliado também a abundância de bactérias na filosfera por meio de *qPCR*, aonde pode-se observar as variações desses organismos em relação ao manejo e à época, quantitativamente.

Figura 9. Abundância bacteriana total na filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico em época seca e chuvosa, expressa em número de cópias por nanograma de DNA. * Para análise de variância (ANOVA), tem-se letras maiúscula comparando a época (chuva ou seca) dentro dos sistemas de manejo (CO e EC) e letras minúscula para as diferenças entre os manejos (CO ou EC) dentro de cada época (seca e chuva).

No gráfico de *qPCR* (Fig. 9) é possível observar na época de seca uma diferença significativa entre as amostras de cada área, com o ecológico apresentando uma maior abundância bacteriana total ($p=0,0009$). Entretanto, as amostras do período de chuva apresentaram uma abundância semelhante, com médias consideradas estatisticamente iguais ($p>0,05$). O manejo ecológico ainda mostrou uma grande perda na abundância bacteriana de uma época para a outra, o que pode ter alguma relação com as alterações feitas no manejo da área durante o período de chuva entre 2016 e 2017, devido ao alto índice da doença "pinta preta" que acometeu o pomar de citros na área experimental.

Relacionando essa informação com o perfil bacteriano da figura 8 temos assim a época seca com as comunidades estruturadas de forma similar, porém tendo uma maior abundância na área ecológica. Por outro lado, um perfil mais variável na época chuvosa, porém quantitativamente equivalentes. Devido aos estímulos químicos e fisiológico desencadeados durante as estações mais chuvosas, esperava-se que a abundância bacteriana fosse maior durante esse período, com a presença de grupos anteriormente em fase de dormência ou ainda pela migração através das chuvas e dos ventos. Entretanto, vê-se os

manejos se igualando quanto a abundância (Fig, 9), sendo encontrados valores de média menores do que na época de seca para a área ecológica. Como já esclarecido anteriormente, uma aplicação de produtos cúpricos foi realizada no final de 2016, excedendo as quantidades do elemento que eram previstas para o tipo de manejo aplicado. Desta forma, um dos fatores que possivelmente pode ser correlacionado à perda de abundância seria o excesso de cobre, o qual pode ter afetado as comunidades bacterianas residentes que não estariam adaptadas a doses extras dos produtos.

Neste caso, seria possível inferir que o manejo ecológico estaria previamente favorecendo a abundância bacteriana, entretanto aplicações de cobre foliar acumuladas semelhantes ao convencional, reduziram a presença desses micro-organismos na filosfera. Como a comunidade bacteriana na área convencional não se alterou, provavelmente as aplicações extras não interferiram sobre ela, mantendo-se constantes. Martins *et al.* (2012) e (2015), mostram o efeito de produtos cúpricos sobre comunidades fúngicas e bacterianas em folhas de uva, respectivamente. Nesses estudos foram demonstrados que um tratamento convencional com o uso de maior concentração dos biocidas à base de cobre reduziu as comunidades microbianas em quantidade e composição, o que indicou uma relação entre a presença do micronutriente com os efeitos negativos sobre os micro-organismos na filosfera.

Conclui-se, pois, que tanto o manejo quanto a época podem afetar a comunidade bacteriana na filosfera de citros. A estrutura do perfil bacteriano foi fortemente influenciada pela época, sobrepondo o efeito que o manejo agrícola tem sobre esses organismos, como demonstrado anteriormente. Já a abundância de bactérias parece ter se alterado em relação ao manejo, especificamente devido ao cobre foliar, já que os dados da área convencional não se alteraram da seca para chuva, e a abundância ecológica teve uma relevante redução. Outros fatores não avaliados neste estudo, como localização geográfica, hospedeiro, bioquímica da folha, podem também ter tido alguma influência nos resultados obtidos, entretanto os parâmetros analisados aqui podem contribuir com a investigação sobre a dinâmica bacteriana na área experimental.

4.3. Monitoramento exploratório químico e microbiológico do cobre no tecido foliar

Devido ao constante uso dos produtos cúpricos na agricultura e especificamente na área experimental avaliada neste trabalho, considerou-se pertinente explorar a presença do cobre na folha de citros de uma forma que demonstrasse sua distribuição e interação na filosfera. A Tabela 5 abaixo mostra um resumo dos produtos contendo cobre que foram

aplicados em ambos os tratamentos durante as épocas estabelecidas para coleta. Esses valores de aplicação foram fornecidos pelo próprio CPMO, com as proporções emitidas nas bulas de cada produto.

Tabela 5. Produtos à base de cobre utilizados na época de seca disponibilizados pela CMPO (2017) nas linhas de tratamento convencional (CO) e ecológico (EC)

Tipo de Produto	Composto-ativo	Seca (Set/2016)	
		CO	EC
Fungicida	Oxicloreto de cobre + cobre metálico (840+ 500 g/Kg)	7,2 Kg	3,6 Kg

Uma investigação sobre a distribuição de Cu no tecido foliar foi realizada através do mapeamento das folhas, o qual permitiu acompanhar temporalmente a presença o cobre nas folhas de citros. As coletas foram realizadas em função da aplicação do cobre na área, com uma coleta sendo realizado no dia seguinte após a aplicação e outra no período de quinze dias depois. O mapeamento por microanálise de fluorescência de raio-X permite pontuar milimetricamente, em uma determinada área, diferentes elementos em tecido íntegro e avaliar sua distribuição (Duran *et al.*, 2017). Neste estudo, a técnica também foi utilizada para avaliar como o cobre se distribui temporalmente na folha no período de 15 dias, em ambas as áreas de manejo (figura 10).

Figura 10. Mapeamento da distribuição de cobre (Cu) no tecido foliar de citros sob manejo convencional (A e B) e ecológico (C e D) no dia seguinte à aplicação de produtos cúpricos (dia 0) e quinze dias depois (dia 15)

Os mapas mostram que na área convencional o cobre estava em maior concentração do que no ecológico, tanto no dia 0 quanto no dia 15. Em Homma (2017) foi investigado o cobre foliar na mesma área experimental e este demonstrou maiores registros no convencional, corroborando com o mapeamento por μ -XRF, também revelando uma discrepância entre as duas áreas. Comparando-se as imagens resultantes do mapeamento nos dois tratamentos no dia 0 (figuras 10a e 10c), vê-se que o convencional dispõe de uma maior presença de cobre no tecido foliar do que o ecológico. Este resultado corrobora a expectativa de maior concentração de cobre nos locais que receberam maiores aplicações. Essa diferença ainda pode ser observada, após o período de 15 dias, visto que o cobre ainda apresenta uma predominância nas amostras provenientes da área convencional.

Temporalmente, dentro da mesma área, também é possível observar uma interessante diferença entre as amostras. O manejo convencional, representado nas figuras 10A e 10B, não apenas aparenta ter uma maior presença de cobre em ambas as épocas, como também o

elemento parece ser pouco translocado ou ainda ser acumulado no tecido foliar. Entretanto, nas amostras sob manejo ecológico (figuras 10C e 10D), que mostra apenas uma pequena presença de cobre na folha, há uma aparente redução de cobre no período de 15 dias após a aplicação do produto.

De acordo com a classificação de nutrientes quanto à mobilidade no floema, ou seja, da folha para os outros órgãos até a raiz, o cobre é descrito como intermediário ou condicionalmente móvel, tendo baixa taxa de redistribuição na planta (Fernández, Sotiropoulos e Brown, 2015). Desta forma, a movimentação do cobre no período de avaliação estabelecido pode ter sido muito baixa e lenta. Em conjunto com a mobilidade do elemento, ainda é importante considerar a formulação dos produtos aplicados nas áreas de tratamento em relação a persistência do produto. No manejo convencional foi aplicado óleo no mesmo período de aplicação dos produtos cúpricos (Tabela 2, seção 3.1), o qual é considerado um adjuvante para aumentar o efeito e penetração de produtos nas folhas de citros (Srivastava, 2012).

Além disso, o processo de absorção de nutrientes pela folha ocorre por meio de transporte passivo e ativo, por diferença de concentração ou de polaridade, através de poros na cutícula como estômatos e tricomas (Fernández, Sotiropoulos e Brown, 2015). Esse transporte depende de diversas características do ambiente que podem afetar a morfologia da planta, como umidade do ar, ciclo circadiano e exposição a raios UV (Srivastava, 2012). Folhas mais expostas ao sol apresentam uma cutícula mais grossa, com o objetivo de se proteger de ressecamento e outros danos, entretanto isso pode afetar a absorção dos nutrientes pelo tecido foliar (Srivastava, 2012). As amostras coletadas para este estudo se localizavam na porção mais externa do dossel em uma altura mediana da árvore, podendo então se enquadrar na morfologia descrita. Houve ausência de chuvas no período da coleta de amostras para o mapeamento exploratório, o que pode ter contribuído para a permanência do produto na folha (figura 11). A baixa taxa de mobilidade concomitante com o fato supracitado pode explicar o acúmulo de cobre nas amostras, em adição ao tempo seco e quente, que pode aumentar a velocidade de secagem dos produtos aplicados na folha, causando um acúmulo do produto na superfície foliar, principalmente quando em altas concentrações (Srivastava, 2012).

Figura 11. Relação gráfica da pluviosidade (mm) e temperatura (°C) da área experimental durante o período de coleta das amostras para o mapeamento

Esse depósito de cobre pode afetar negativamente o *fitness* da planta, afetando a superfície da folha, com o aparecimento de sintomas como clorose e deformações estruturais (Srivastava, 2012) porém as avaliações do CPMO não identificaram o desenvolvimento de nenhum distúrbio ligado ao excesso do micronutriente. Outra preocupação seria o seu efeito sobre as comunidades microbianas residentes na região da filosfera, as quais vivem em simbiose com a planta. Como discutido anteriormente, se afetadas, a "primeira barreira" de defesa da planta composta por esses micro-organismos pode ser reduzida, o que consequentemente abriria brechas para a colonização dos organismos patogênicos. Stirling *et al.* (1999) avaliaram o efeito dos fungicidas de cobre sobre a filosfera de abacate e mostraram uma oscilação na presença de patógenos e saprófitas em resposta ao cobre, sugerindo uma alteração na competitividade entre os micro-organismos com o produto em alta concentração. Homma (2017) apontou que o cobre foliar, proveniente da aplicação de fungicidas, estava presente na área convencional em quantidades excessivas a ponto de interagir negativamente com outros elementos e ainda afetar as comunidades microbianas tanto do solo quanto da planta.

A sessão anterior apontou uma possível relação do cobre com perda de abundância bacteriana no manejo ecológico, trazendo uma atenção para o elemento com relação à filosfera. Desta forma, uma análise microbiológica avaliando a interação do cobre com bactérias se mostra interessante do ponto de vista da tolerância desses organismos ao uso desse produto pela agricultura. Assim, foi investigado se bactérias tolerantes ao

micronutriente se encontram na filosfera de citros de ambos os manejos em nossa área experimental. Esses produtos cúpricos utilizados pela agricultura são caracterizados por um amplo espectro microbiano, podendo atuar sobre a microbiota residente e por uma formulação persistente para garantir a supressão de patógenos a longo prazo, dispensando aplicações constantes (Stinling *et al.*, 1999). A aplicação de diferentes conteúdos de cobre em cada linha de tratamento indicaria que bactérias com mecanismos de tolerância ao cobre podem estar colonizando o tecido foliar, estando presentes em função da concentração de cobre aplicado.

Para a realização desse experimento, o cultivo bacteriano foi realizado em caldo nutriente suplementado com sulfato de cobre em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$), com um período de indução à tolerância para selecionar as bactérias que fossem de fato tolerantes ao cobre (figura 12). As concentrações de 0, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de CuSO_4 , apesar de serem quantidades-traço, foram utilizadas para esse ensaio, demonstrando-se suficientes para esta investigação exploratória. Caso a presença do cobre fosse resultante de uma contaminação, a qual selecionaria organismos resistentes ao elemento, seria necessário testar concentrações mais elevadas. As colônias apresentaram um crescimento rápido de aproximadamente 24 horas, com as diluições de 10^{-3} e 10^{-5} , tornando-se tão numerosas que foi necessário fazer uma diluição seriada até 10^{-9} . Na tabela 6 está representada a quantificação das UFCs em ambos os tratamentos em $\log_{10}$.

Tabela 6. Contagem de UFCs tolerantes a cobre por grama de tecido foliar em $\log_{10}$ obtidas a partir da filosfera de citros sob manejo convencional (CO) e ecológico (EC)

CuSO₄ ($\mu\text{g/mL}$)	CO	EC
0	13,53bA	13,94aA
50	11,59aB	11,66aB
100	11,27aB	11,17aB
200	11,14aB	11,10aB

Letras minúsculas: comparação entre tratamentos; Letras maiúsculas: comparação entre doses

Os resultados obtidos com a contagem de UFCs tolerantes ao cobre mostraram que apenas os cultivos sem a adição de sulfato de cobre diferiram significativamente entre as doses ($p=0,0004$) e entre os manejos da área, com o ecológico apresentando uma abundância relativamente maior ($p=0,000155$). Apesar de uma semelhante abundância entre as UFCs obtidas na presença do cobre, bactérias de diferentes espécies foram encontradas entre elas

(figura 12). A partir da filosfera convencional foram obtidos dois isolados morfologicamente diferentes, inicialmente identificados como 1CT e 2CT, entretanto apenas um desses (1CT) é compartilhado pelos dois tratamentos, sendo 2CT exclusivamente proveniente da área convencional. Na tabela 7 foi feita uma caracterização morfológica dos isolados tolerantes ao cobre, da mesma maneira como fora feito para a comunidade bacteriana cultivável total.

Figura 12. Isolados bacterianos da filosfera de citros sob manejo convencional e ecológico, ditos tolerantes à presença do cobre em diferentes concentrações.

Tabela 7. Características morfológicas dos isolados bacterianos tolerantes na filosfera de citros

Isolados	Forma	Coloração	Tamanho	Aspecto	Borda	Opacidade
1CT	Circular	Branco	Pequeno	Cremoso Liso	Regular	Translúcido
2CT	Circular	Amarelado	Variado	Fosco Liso	Regular	Opaco

Na figura 13 está representada a árvore filogenética das amostras, a qual mostra que 1CT e 2CT são do mesmo gênero *Enterococcus*, porém altamente relacionadas a espécies diferentes, *E. italicus* (99%) e *E. rivorum* (68%), respectivamente. O isolamento de duas espécies a partir das amostras da área convencional pode estar relacionado à maior aplicação de cobre neste tratamento, o que permitiu o crescimento de mais de um organismo capaz de conviver na presença de maiores concentrações do micronutriente em questão.

Figura 13. Filogenia de isolados bacterianos tolerantes a cobre encontrados na filosfera de citros sob manejos convencional e ecológico, demonstrando sua relação com demais sequências do banco de dados NCBI. A filogenia é baseada no agrupamento de sequências por similaridade por *neighbour-joining* utilizando a sequência parcial do gene 16S rDNA. Os valores de *bootstrap* apresentados nas árvores foram realizados com 1000 subamostragens nos grupos de sequências. A sequência do gene 16S rDNA de *Anabaena oscillarioides* foi usada como grupo externo para enraizamento.

Enterococcus spp. é um representante da classe Bacilli, inserido no filo Firmicutes, um dos principais grupos encontrados pela análise de sequenciamento da comunidade bacteriana total, demonstrado anteriormente (Fig. 4). Presente nos mais diversos ambientes, incluindo o trato-gastrointestinal de mamíferos, o gênero *Enterococcus* é reconhecido como altamente resistente em ambientes com condições adversas de pH, temperatura e disponibilidade de água (Gilmore *et al.*, 2014). Comumente citados na literatura devido aos riscos que algumas espécies podem trazer à saúde humana, essas bactérias apresentam ainda alta resistência a diversos químicos usados para seu controle (Valenzuela *et al.*, 2013).

A presença de *Enterococcus* na filosfera de citros seria incomum, já que esses micro-organismos são frequentemente encontrados no sistema gastro-intestinal, como citado acima. Dessa forma, a transição deles para o ambiente dependeria de uma alta disponibilidade de nutrientes para uma adaptação e crescimento adequados (Gilmore *et al.*, 2014). Entretanto, como já descrito previamente, a filosfera é um habitat oligotrófico e bastante sujeito às variações ambientais, o que inibiria seu crescimento em fases iniciais de colonização. Esse fato explicaria a baixa abundância deste grupo na análise de sequenciamento bacteriano total,

porém sua predominância pode ser decorrente do processo de indução à tolerância ao cobre em caldo nutriente.

Devido à existência de diversas linhagens de Enterococci resistentes a antimicrobianos, outros produtos são usados pela indústria alimentícia como biocidas para sua eliminação, dentre eles produtos à base de cobre (Vanezuela *et al.*, 2013). Apesar desses produtos não terem relação com os mesmos utilizados na agricultura como adubo foliar, seu uso levantou estudos sobre a relação de cobre com as bactérias do gênero, os quais auxiliam no entendimento da sua presença nesta avaliação sobre micro-organismos tolerantes.

Os mecanismos de tolerância ao cobre desenvolvidos em bactérias gram-positivas como Enterococci corresponde a um sistema homeostático para regular o cobre intracelular necessário para o metabolismo (Banfield e Nealson, 1997). Uma bomba de efluxo Cu-ATPase controla a entrada e saída de cobre a partir da transcrição dos genes CopA e CopB, respectivamente (Banfield e Nealson, 1997; Migocka, 2015). Mutantes com baixa expressão de CopA são ditos resistentes ao cobre; por outro lado, mutações no gene CopB levam a uma hipersensibilidade ao micronutriente (Banfield e Nealson, 1997). Desta forma, pode-se entender como o gênero *Enterococcus* se adaptou ao processo de indução, sendo possível seu crescimento e dominância em todas as concentrações de cobre testadas neste ensaio.

Esse monitoramento exploratório apresentou dados que mostram que há uma diferença de cobre foliar entre as áreas sob manejo convencional e ecológico, com a micro-análise de XRF corroborando a hipótese de que este elemento se encontra em maior concentração na área convencional. Por uma visão microbiológica, foi encontrado mais de uma espécie tolerante ao cobre na área convencional, entretanto não houve diferença significativa entre a abundâncias dessas bactérias entre os tratamentos.

5. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS

Através de diversas abordagens microbiológicas foi demonstrado que o manejo agrícola é um importante fator determinante sobre a diversidade bacteriana na filosfera de citros. Os grupos bacterianos encontrados tanto por métodos dependentes como independentes de cultivo são comumente encontrados nesse micro-ambiente compondo a comunidade residente filosférica. Uma maior riqueza foi encontrada na área sob manejo ecológico permitindo inferir que este favorece a comunidade bacteriana, a qual se diferencia significativamente daquela sob manejo convencional. Além de as comunidades serem afetadas pelo tipo de manejo, o fator temporal também mostrou certo efeito sobre a dinâmica bacteriana, adicionando importantes informações para os estudos sobre o microbioma na filosfera. Essas conclusões destacam a importância em compreender a filofera e em explorá-la para benefício da produção e do ecossistema que interage com o agrossistema, mostrando que as práticas aplicadas podem atuar no sentido da otimização sustentável da produção agrícola.

Ainda neste estudo, foi apontada a influência do cobre foliar na comunidade bacteriana, possivelmente interferindo na abundância desses micro-organismos. Os resultados obtidos condizem com análises prévias executadas na área experimental. O monitoramento exploratório de cobre no tecido foliar se mostrou muito interessante, demonstrando quimicamente que o elemento está diferentemente distribuído entre os manejos, com a área convencional apresentando uma maior concentração de cobre depositado na folha, resultante não apenas das características móveis do elemento e das condições climáticas da área, mas das aplicações determinadas em cada manejo. As aplicações dos produtos cúpricos ainda demonstraram atuar sobre a comunidade bacteriana, com bactérias tolerantes ao cobre sendo isoladas a partir da filosfera de citros.

REFERÊNCIAS

- Allard, S. M. *et al.* (2016) ‘*Solanum lycopersicum* (tomato) hosts robust phyllosphere and rhizosphere bacterial communities when grown in soil amended with various organic and synthetic fertilizers’, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 573, pp. 555–563. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.157.
- Altieri (2013) *Agroecologia: A dinamica Productiva da agricultura sustentable*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Altimira, F. *et al.* (2012) ‘Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile’, *BMC Microbiology*, 12(1), p. 193. doi: 10.1186/1471-2180-12-193.
- Andrade, D. J. De, Ferreira, M. D. C. and Martinelli, N. M. (2014) ‘Aspectos da fitossanidade em citros’, pp. 245–247.
- Andreote, F. D. (2007) ‘Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas’, pp. 1–184. doi: 10.11606/T.11.2007.tde-28112007-101523.
- Andreote, F. D., Gumiere, T. and Durrer, A. (2014) ‘Exploring interactions of plant microbiomes’, *Scientia Agricola*, 71(6), pp. 528–539. doi: 10.1590/0103-9016-2014-0195.
- Andreote, F. D. and Pereira e Silva, M. de C. (2017) ‘Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture’, *Current Opinion in Microbiology*, 37, pp. 29–34. doi: 10.1016/j.mib.2017.03.011.
- Aquino, A. M. de and Assis, R. L. de (eds) (2005) *Agroecologia: Princípios e Técnicas para uma Agricultura Orgânica Sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. Available at: <https://books.google.com.br/books?id=zl51PgAACAAJ>.
- Banfield, J. F. and Nealson, K. H. (1997) *Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals*. Washington: Mineralogical Society of America.
- Barbosa, C. J. *et al.* (2014) *Pragas Quarentenárias A1 e A2 da Citricultura Baiana*. Bahia, EMBRAPA.
- Begon, M., Townsend, C. R. and Harper, J. L. (2006) *Ecology: From Individual to Ecosystems*. 4th edn. Blackwell Publising Ltd.
- Behlau, F. *et al.* (2012) ‘Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*’, *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), pp. 949–963. doi: 10.1007/s10658-012-9966-8.

- Berg, J., Tom-Petersen, A. and Nybroe, O. (2005) 'Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field', *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), pp. 146–151. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01650.x.
- Bodenhausen, N. *et al.* (2014) 'A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota', *PLoS Genetics*, 10(4). doi: 10.1371/journal.pgen.1004283.
- Caporaso, J. G. *et al.* (2010) 'correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 7(5), pp. 335–336. doi: 10.1038/nmeth0510-335.
- Castro, P. R. C., Kluge, R. A e Sestari, I. (2008) *Manual de Fisiologia Vegetal: fisiologia de cultivos*. Piracicaba, SP: Editora Agronômica Ceres, p. 864.
- Copeland, J. K. *et al.* (2015) 'Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), pp. 274–285. doi: 10.1094/MPMI-10-14-0331-FI.
- Cordero-Bueso, G. *et al.* (2011) 'Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 145(1), pp. 132–139. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040.
- Cordier, T. *et al.* (2012) 'Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: Genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*)', *Fungal Ecology*, 5(5), pp. 509–520. doi: 10.1016/j.funeco.2011.12.004.
- Dees, M. W. *et al.* (2015) 'Bacterial communities associated with surfaces of leafy greens: Shift in composition and decrease in richness over time', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), pp. 1530–1539. doi: 10.1128/AEM.03470-14.
- Dias, A. C. F. *et al.* (2012) 'Interspecific Variation of the Bacterial Community Structure in the Phyllosphere of', pp. 0–7.
- Ding, T., Palmer, M. W. and Melcher, U. (2013) 'Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria', *BMC Microbiology*. BMC Microbiology, 13(1), p. 1. doi: 10.1186/1471-2180-13-1.
- Duran, N. M. *et al.* (2017) 'X-ray Spectroscopy Uncovering the Effects of Cu Based Nanoparticle Concentration and Structure on *Phaseolus vulgaris* Germination and Seedling Development', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. acs.jafc.7b03014. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03014.

- Durrer, A. *et al.* (2017) 'The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation', *Applied Soil Ecology*. Elsevier B.V., 110, pp. 12–20. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.11.005.
- Elmer, W. H. and Datnoff, L. E. (2014) 'Mineral Nutrition and Suppression of Plant Disease', *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, (December), pp. 231–244. doi: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00251-5.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2016) *Citros*. Acessado em: < <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/citros> >
- van Elsas, J. D. *et al.* (2012) 'Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), pp. 1159–1164. doi: 10.1073/pnas.1109326109.
- Farré-Armengol, G. *et al.* (2016) 'Bidirectional Interaction between Phyllospheric Microbiotas and Plant Volatile Emissions', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 21(10), pp. 854–860. doi: 10.1016/j.tplants.2016.06.005.
- Fernández, V., Sotiropoulos, T. and Brown, P. (2015) *Adubação foliar: Fundamentos científicos e técnicas de campo*. São Paulo: Abisolo.
- Finkel, O. M. *et al.* (2011) 'Geographical location determines the population structure in phyllosphere microbial communities of a salt-excreting desert tree', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), pp. 7647–7655. doi: 10.1128/AEM.05565-11.
- Fu, Y., Chang, F. M. J. and Giedroc, D. P. (2014) 'Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface', *Accounts of Chemical Research*, 47(12), pp. 3605–3613. doi: 10.1021/ar500300n.
- Geertsema, W. *et al.* (2016) 'Actionable knowledge for ecological intensification of agriculture', *Frontiers in Ecology and the Environment*, 14(4), pp. 209–216. doi: 10.1002/fee.1258.
- Gilmore, M. S. *et al.* (2014) 'Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection', *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*.
- Gliessman, S. R. (2005) *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p.653.
- Gomba, A., Chidamba, L. and Korsten, L. (2017) 'Effect of postharvest practices including degreening on citrus carpoplane microbial biomes', *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), pp. 1057–1070. doi: 10.1111/jam.13396.

- Gravena, S. (2005) *Manejo ecológico de pragas dos citros: Manual prático.*, Jaboticabal: S. Gravena, p. 372.
- Grass, G., Rensing, C. and Solioz, M. (2011) 'Metallic copper as an antimicrobial surface', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), pp. 1541–1547. doi: 10.1128/AEM.02766-10.
- Griffin, E. A. and Carson, W. P. (2015) 'The Ecology and Natural History of Foliar Bacteria with a Focus on Tropical Forests and Agroecosystems', *Botanical Review*, 81(2), pp. 105–149. doi: 10.1007/s12229-015-9151-9.
- Grillo-Puertas, M. *et al.* (2014) 'Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*', *BMC Microbiology*, 14(1), p. 72. doi: 10.1186/1471-2180-14-72.
- Hartmann, M. *et al.* (2015) 'Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming', *The ISME Journal*, 9(5), pp. 1177–1194. doi: 10.1038/ismej.2014.210.
- Homma, S. K. (2017) *Do convencional ao orgânico: respostas de um manejo de transição em um pomar cítrico*. Universidade de São Paulo.
- Huang, T. P. *et al.* (2012) 'DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms', *PLoS ONE*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0042124.
- IFOAM - International Federation of Organic Agriculture Movements (2014). 'Consolidated Annual Report of IFOAM - Organics International'. Acessado em: <https://www.ifoam.bio/sites/default/files/ar2014_web.pdf>
- Jackson, C. R. and Denney, W. C. (2011) 'Annual and Seasonal Variation in the Phyllosphere Bacterial Community Associated with Leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*)', *Microbial Ecology*, 61(1), pp. 113–122. doi: 10.1007/s00248-010-9742-2.
- Jackson, M. A. *et al.* (2016) 'A heritability-based comparison of methods used to cluster 16S rRNA gene sequences into operational taxonomic units', *PeerJ*, 4, p. e2341. doi: 10.7717/peerj.2341.
- Jo, Y. *et al.* (2015) 'Bacterial communities in the phylloplane of *Prunus* species', *Journal of Basic Microbiology*, 55(4), pp. 504–508. doi: 10.1002/jobm.201400651.
- Kembel, S. W. and Mueller, R. C. (2014) 'Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities ¹', *Botany*, 92(4), pp. 303–311. doi: 10.1139/cjb-2013-0194.

- Kim, M. *et al.* (2012) 'Distinctive Phyllosphere Bacterial Communities in Tropical Trees', *Microbial Ecology*, 63(3), pp. 674–681. doi: 10.1007/s00248-011-9953-1.
- Kinkel, L. L. (1997) 'Microbial Population', pp. 1–15.
- Koeppen, W., Geiger, R. (1928) 'Klimate der Erde'. Gotha, Verlag Justus Perthes.
- Krauss, J., Gallenberger, I. and Steffan-Dewenter, I. (2011) 'Decreased functional diversity and biological pest control in conventional compared to organic crop fields', *PLoS ONE*, 6(5), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0019502.
- Ladomersky, E. and Petris, M. J. (2015) 'Copper tolerance and virulence in bacteria.', *Metallomics*. Royal Society of Chemistry, 7, pp. 957–964. doi: 10.1039/c4mt00327f.
- Laforest-Lapointe, I. *et al.* (2017) 'Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships', *Nature*. Nature Publishing Group, 546(7656), pp. 145–147. doi: 10.1038/nature22399.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C. and Kembel, S. W. (2016) 'Tree phyllosphere bacterial communities: exploring the magnitude of intra- and inter-individual variation among host species', *PeerJ*, 4, p. e2367. doi: 10.7717/peerj.2367.
- Lambais, M. R., Lucheta, A. R. and Crowley, D. E. (2014) 'Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent', *Microbial Ecology*, 68(3), pp. 567–574. doi: 10.1007/s00248-014-0433-2.
- Leakey, R. R. B. (2014) 'The Role of Trees in Agroecology and Sustainable Agriculture in the Tropics', *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), pp. 113–133. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045838.
- Lebeis, S. L. (2017) 'Plant Microbiome Identification and Characterization', *Current Protocols in Plant Biology*, 2(June), pp. 135–146. doi: 10.1002/cppb.20048.
- Li, J. *et al.* (2014) 'Initial Copper Stress Strengthens the Resistance of Soil Microorganisms to a Subsequent Copper Stress', *Microbial Ecology*, 67(4), pp. 931–941. doi: 10.1007/s00248-014-0391-8.
- Lindow, S. E. and Brandl, M. T. (2003) 'Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), pp. 1875–1883. doi: 10.1128/AEM.69.4.1875.
- Mackie, K. A. *et al.* (2013) 'Long-term copper application in an organic vineyard modifies spatial distribution of soil micro-organisms', *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd, 65, pp. 245–253. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.06.003.

- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2011). *Instrução Normativa n. 46 de 26 de Outubro de 2011*. Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, Brasil.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016). Acessado em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus> >, Brasil
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017). 'Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)', Brasil.
- Martins, A. P. L. and Reissmann, C. B. (2007) 'Laboratory Routine for Chemical and Analytical Procedures on Plant Tissues', *Scientia Agraria*, 8(1), pp. 1–17.
- Martins, G. *et al.* (2012) 'Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 158(2), pp. 93–100. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.013.
- Martins, G. *et al.* (2013) 'Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations', *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0073013.
- Martins, G. *et al.* (2014) 'Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape barriers during the ripening process', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 177, pp. 21-28. doi: 10.106/j.ijfoodmicro.2014.02.002
- Massieux, B. *et al.* (2004) 'Analysis of Structural and Physiological Profiles To Assess the Effects of Cu on Biofilm Microbial Communities Analysis of Structural and Physiological Profiles To Assess the Effects of Cu on Biofilm Microbial Communities', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), pp. 4512–4521. doi: 10.1128/AEM.70.8.4512.
- Mazzoncini, M. *et al.* (2010) 'Comparison of organic and conventional stockless arable systems: A multidisciplinary approach to soil quality evaluation', *Applied Soil Ecology*, 44(2), pp. 124–132. doi: 10.1016/j.apsoil.2009.11.001.
- Migocka, M. (2015) 'Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems', *IUBMB Life*, 67(10), pp. 737–745. doi: 10.1002/iub.1437.
- Mosoni, P. *et al.* (2007) 'Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: Effect of a yeast additive', *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), pp. 2676–2685. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03517.x.

- Müller, T. and Ruppel, S. (2014) 'Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology', *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), pp. 2–17. doi: 10.1111/1574-6941.12198.
- Oelofse, M. *et al.* (2011) 'Organic farm conventionalisation and farmer practices in China, Brazil and Egypt', *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4), pp. 689–698. doi: 10.1007/s13593-011-0043-z.
- ONU – Organização das Nações Unidas, Comitê de Direitos Humanos. *Effects of pesticides on the right to food*. Janeiro de 2017. Report of the Special Rapporteur on the right to food.
- Ottesen, A. R. *et al.* (2009) 'Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop.', *Journal of food protection*, 72(11), pp. 2321–2325. doi: 10.4315/0362-028X-72.11.2321.
- Ottesen, A. R. *et al.* (2015) 'The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), pp. 1116–1125. doi: 10.1002/jsfa.7010.
- Ottesen, A. R. *et al.* (2016) 'Using a control to better understand phyllosphere microbiota', *PLoS ONE*, 11(9), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0163482.
- Pagadala, S. *et al.* (2015) 'Assessment of region, farming system, irrigation source and sampling time as food safety risk factors for tomatoes', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 196, pp. 98–108. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.005.
- Paulus, G., Muller, A. M. and Barcellos, L. A. R. (2000) *Agroecologia Aplicada: Práticas e Métodos para uma Agricultura de Base Ecológica*. Porto Alegre: EMATER.
- Peñuelas, J. *et al.* (2012) 'Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest', *Plant Biology*, 14(4), pp. 565–575. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00532.x.
- Peñuelas, J. and Terradas, J. (2014) 'The foliar microbiome', *Trends in Plant Science*, 19(5), pp. 278–280. doi: 10.1016/j.tplants.2013.12.007.
- Perazzolli, M. *et al.* (2014) 'Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), pp. 3585–3596. doi: 10.1128/AEM.00415-14.
- Ponisio, L. C. *et al.* (2014) 'Diversification practices reduce organic to conventional yield gap', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1799), pp. 20141396–20141396. doi: 10.1098/rspb.2014.1396.

- De Ponti, T., Rijk, B. and Van Ittersum, M. K. (2012) 'The crop yield gap between organic and conventional agriculture', *Agricultural Systems*. Elsevier Ltd, 108, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.agsy.2011.12.004.
- Rastogi, G. *et al.* (2012) 'Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce', *The ISME Journal*. Nature Publishing Group, 6(10), pp. 1812–1822. doi: 10.1038/ismej.2012.32.
- Rathi, M. and Nandabalan, Y. K. (2017) 'Copper-tolerant rhizosphere bacteria—characterization and assessment of plant growth promoting factors', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 24(10), pp. 9723–9733. doi: 10.1007/s11356-017-8624-2.
- Redford, A. J. *et al.* (2010) 'The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves', *Environmental Microbiology*, 12(11), pp. 2885–2893. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x.
- Reisberg, E. E. *et al.* (2013) 'Distinct phyllosphere bacterial communities on Arabidopsis wax mutant leaves', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0078613.
- Rigonato, J. *et al.* (2012) 'Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest', *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2), pp. 312–322. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01299.x.
- del Rocío Bustillos-Cristales, M. *et al.* (2017) 'Culturable Facultative Methylophilic Bacteria from the Cactus *Neobuxbaumia macrocephala* Possess the Locus *xoxF* and Consume Methanol in the Presence of Ce^{3+} and Ca^{2+} , *Microbes and environments*, 32(3), pp. 244–251. doi: 10.1264/jsme2.ME17070.
- Schutte, G. C. *et al.* (2012) 'Assessment of retention and persistence of copper fungicides on orange fruit and leaves using fluorometry and copper residue analyses', *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 42, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.cropro.2012.04.015.
- Shen, W. *et al.* (2013) 'Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and Candidatus Liberibacter Ct values in citrus trees infected with Huanglongbing', *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), pp. 727–742. doi: 10.1007/s10658-013-0283-7.
- Sobral, J. K. (2003) 'A comunidade bacteriana edofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta, p. 174. Available at: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-24052004-154815/.../julia.pdf.
- Srivastava, A. K. (ed.) (2012) *Advances in Citrus Nutrition*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-007-4171-3.

- Thapa, S. *et al.* (2017) 'Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice', *Microbiological Research*. Elsevier, 204(July), pp. 55–64. doi: 10.1016/j.micres.2017.07.007.
- Truchado, P. *et al.* (2017) 'Impact of solar radiation exposure on phyllosphere bacterial community of red-pigmented baby leaf lettuce', *Food Microbiology*, 66, pp. 77–85. doi: 10.1016/j.fm.2017.03.018.
- Valenzuela, A. S. *et al.* (2013) 'Biocide and Copper Tolerance in Enterococci from Different Sources', *Journal of Food Protection*, 76(10), pp. 1806–1809. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-124.
- Venkatachalam, S. *et al.* (2016) 'Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere', *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 18(4), pp. 627–637. doi: 10.1111/plb.12441.
- Vorholt, J. A. (2012) 'Microbial life in the phyllosphere', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 10(12), pp. 828–840. doi: 10.1038/nrmicro2910.
- Wang, X. *et al.* (2014) 'The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 108, pp. 258–264. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.050.
- Whipps, J. M. *et al.* (2008) 'Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype', *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), pp. 1744–1755. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x.
- Yilmaz, P. *et al.* (2014) 'The SILVA and "all-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks', *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. 643–648. doi: 10.1093/nar/gkt1209.