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

Espécie do hospedeiro, micro-habitat e época do ano modulam a estrutura das comunidades de micro-organismos diazotróficos na floresta Amazônica

Endrews Delbaje

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

Piracicaba
2018

Andrews Delbaje
Biólogo

Espécie do hospedeiro, micro-habitat e época do ano modulam a estrutura das
comunidades de micro-organismos diazotróficos na floresta Amazônica

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

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

Piracicaba
2018

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

Delbaje, Endrews

Espécie do hospedeiro, micro-habitat e época do ano modulam a estrutura das comunidades de micro-organismos diazotróficos na floresta Amazônica / Endrews Delbaje - - Piracicaba, 2018.

85 p.

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

1. Micro-organismos diazotróficos 2. Floresta Amazônica 3. Fixação biológica do nitrogênio 4. Filosfera 5. Rizosfera 6. Serapilheira I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, por todo o suporte e amor;

À minha namorada Naydja Maimone, pelo amor, carinho e companheirismo;

Ao prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação, oportunidade e confiança oferecida a mim para realizar este trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e fundação CAPES, pelas bolsas de estudos;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola (ESALQ/USP), pela oportunidade;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (ESALQ/USP), Alice Cassetari, André Alves, Bianca Machado, Julio Fornazier, Nivanda Ruiz, Silvia Barrera, e Wladimir Rosignol pelos dias de trabalho compartilhados e descontração;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

EPIGRAFE

“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved”.

Charles Darwin

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Hipóteses	10
1.2. Objetivos	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Fixação biológica do nitrogênio por diazotróficos assimbióticos	13
2.1. Ecologia funcional dos diazotróficos	14
2.1.1. Funcionalidade dos diazotróficos em florestas tropicais	16
2.2. A diversidade dos diazotróficos	17
2.3. Estruturação do microbioma da floresta em relação aos seus nichos	19
2.3.1. Filosfera	19
2.3.2. Serapilheira	21
2.3.3. Rizosfera	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Local da amostragem	25
3.2. Amostragem	25
3.3. Desalojamento dos micro-organismos da filofera e serapilheira	27
3.4. Extração de DNA	27
3.5. Sequenciamento do gene <i>nifH</i>	27
3.6. Sequenciamento do gene rRNA 16S	28
3.6.1. Processamento das sequências do gene rRNA 16S	29
3.6.2. Análise das sequências de bactérias diazotróficas inferidas da reconstrução de metagenomas obtidos a partir de sequências do gene rRNA 16S	29
3.7. Processamento e análises das sequências de <i>nifH</i>	30
3.8. Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Análises das comunidades de bactérias com base em sequências do gene rRNA 16S	33
4.1.1. Diversidade de UTOs capturadas de bactérias totais	33
4.1.2. Diversidade de UTOs de bactérias diazotróficas inferidas da reconstrução de metagenomas a partir de sequências do gene rRNA 16S	34

4.1.3.	Estrutura das comunidades diazotróficas inferidas da reconstrução de metagenomas a partir de sequências do gene rRNA 16S-----	35
4.2.	Análises das comunidades de bactérias com base em sequências do gene <i>nifH</i>-----	44
4.2.1.	Diversidade de UTOs dos micro-organismos diazotróficos -----	44
4.2.2.	Estrutura das comunidades de micro-organismos diazotróficos com base no gene <i>nifH</i> -----	47
4.2.3.	Comparação entre os resultados obtidos para os dados de <i>nifH</i> e rRNA 16S -----	61
5.	DISCUSSÃO -----	67
6.	CONCLUSÕES -----	73
REFERÊNCIAS	-----	75

RESUMO

Espécie do hospedeiro, micro-habitat e época do ano modulam a estrutura das comunidades de micro-organismos diazotróficos na floresta Amazônica

É crescente o reconhecimento da importância de micro-organismos diazotróficos assimbióticos em florestas tropicais. Nos últimos anos, tem sido demonstrado que suas contribuições para o ganho de nitrogênio em ecossistemas naturais podem ser até maiores do que as contribuições dos sistemas simbióticos. No entanto, a diversidade e os mecanismos que determinam a estruturação das comunidades de diazotróficos assimbióticos são pouco conhecidos. Para compreender melhor a diversidade e a estruturação de suas comunidades na Floresta Amazônica, os diazotróficos assimbióticos da filosfera, serapilheira e rizosfera de nove espécies arbóreas em três épocas distintas foram avaliados utilizando-se sequenciamento em larga escala dos genes rRNA 16S e *nifH*. Os resultados mostraram que cada micro-habitat seleciona comunidades diazotróficas distintas, as quais variam também com a época do ano. As comunidades de diazotróficos também mostraram ser dependentes dos táxons das árvores, com o maior efeito seletivo na filosfera. Para todas as condições estudadas, as comunidades diazotróficas apresentaram altos índices de diversidade e riqueza, com os maiores índices de Shannon e Chao1 na Serapilheira (9,57 e 5222, respectivamente), em relação a filosfera (7,4 e 3145, respectivamente) e a rizosfera (8,65 e 2868, respectivamente). A maior proporção de bactérias diazotróficas em relação a comunidade total de bactérias, com base na abundância de sequências do gene rRNA 16S, foi observada na filosfera (23%), em relação a serapilheira (20%) e rizosfera (18%). De uma maneira geral, essa proporção relativa não foi afetada pela época de amostragem, muito embora as estruturas das comunidades tenham variado, sugerindo existência de redundância funcional para FBN. Os três micro-habitats mostraram dominância do filo Proteobacteria, com frequências aproximadas a 81% na filosfera, 93% na rizosfera e 82% na serapilheira. O filo Cyanobacteria apresentou frequências relevantes na filosfera e serapilheira, com aproximadamente 17% e 5%, respectivamente. Firmicutes mostrou frequências, na serapilheira e rizosfera, de aproximadamente 12% e 5%, respectivamente. Estes resultados mostram que os micro-organismos diazotróficos assimbióticos associados com as árvores podem ter um importante papel na entrada do nitrogênio em florestas tropicais e que a estrutura de tais comunidades é determinada pelo seu micro-habitat, hospedeiro e época do ano.

Palavras-chave: Micro-organismos diazotróficos; Floresta Amazônica; Fixação biológica do nitrogênio; Filosfera; Rizosfera; Serapilheira

ABSTRACT

Host species, microhabitat and time of the year modulate the community structure of diazotrophic microorganisms in the Amazon rainforest

There is increasing recognition of the importance of assimbiotic diazotrophic microorganisms in tropical forests. In recent years, it has been shown that their contributions to the nitrogen inputs can be even higher than the contributions of symbiotic systems in natural ecosystems. However, the diversity and the mechanisms driving the assembling of the communities of assimbiotic diazotrophs in tropical forests are poorly understood. To better understand the diversity and assembling of the diazotrophs communities in the Amazon forest, the assimbiotic diazotrophs in the phyllosphere, litter and rhizosphere from nine tree species in three distinct times of year were evaluated using large-scale sequencing of 16S rRNA and nifH genes. The results showed that each microhabitat selected distinct diazotrophic communities, which were also affected by the time of year. The structure of the communities of putative diazotrophs were also dependent on the tree taxa, with greater selection effect on the phyllosphere. For all conditions studied, the communities of putative diazotrophs showed high diversity indexes and OTU richness, with the highest Shannon and Chao1 indexes detected for the litter (9.57 and 5222, respectively), as compared to phyllosphere (7.4 and 3145, respectively) and rhizosphere (8.65 and 2868, respectively). The highest proportion of diazotrophic bacteria in relation to the total bacteria, based on the abundance of sequences of 16S rRNA genes, was observed in the phyllosphere (23%), as compared to litter (20%) and rhizosphere (18%). Overall, the relative abundance of diazotrophic bacteria in the bacterial community was not affected by the sampling time, even though the community structures varied, suggesting the occurrence of functional redundancy for BNF. In the three microhabitats, dominance of the phylum Proteobacteria, with frequencies of approximately 81% in the phyllosphere, 93% in the rhizosphere and 82% in the litter, was observed. Cyanobacteria showed significantly higher frequencies in the phyllosphere and litter, approximately 17% and 5%, respectively, as compared to rhizosphere. Firmicutes also showed high frequencies in the litter and rhizosphere, approximately 12 % and 5%, respectively. These results showed that the assimbiotic putative diazotrophic microorganisms associated with trees may play an important role in the input of nitrogen in tropical forests and that the structure of their communities is determined by the microhabitat, host taxon and time of year.

Keywords: Diazotrophic bacteria; Amazon rainforest; Biological nitrogen fixation; Phyllosphere; Rhizosphere; Litter

1. INTRODUÇÃO

As plantas e os micro-organismos co-evoluíram por milhões de anos, estabelecendo relações de cooperação e essenciais para a sobrevivência no ambiente (Hayat *et al.*, 2010; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Tal interação tem sido foco de diversos estudos, devido à importância em se compreender o potencial do papel dos microrganismos na ecologia das plantas e seus papéis nos ciclos biogeoquímicos.

Dentre os principais grupos de micro-organismos de importância ecológica estão os diazotróficos, grupo composto por procariontes dos domínios Bacteria e Archaea, capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia através de um processo chamado fixação biológica do nitrogênio (FBN). A FBN é uma das principais fontes de entrada de nitrogênio nos ecossistemas, e pode contribuir globalmente com 44 teragramas de N por ano (Pajares & Bohannan, 2016; Vitousek *et al.*, 2013).

Os diazotróficos podem ser simbióticos ou assimbióticos e estão presentes em diversos ambientes, como superfície de plantas e trato digestivo de animais (Gray & Smith, 2005). Em florestas tropicais, em especial, os diazotróficos podem se associar simbioticamente com leguminosas ou fungos (formando líquens) ou viver assimbioticamente nas superfícies de plantas, na serapilheira ou no solo, contribuindo com quantidades apreciáveis de N (Reed *et al.*, 2011). Florestas tropicais são responsáveis por 70% do N fixado, embora ocupem somente 12% da superfície terrestre (Townsend *et al.*, 2011).

A quantidade de N proveniente da FBN pode variar entre os ecossistemas e também dentro deles, além de ser suscetível aos efeitos da sazonalidade. As características físicas e químicas do ambiente são determinantes para a FBN e podem apresentar alto grau de variabilidade espacial. Todos esses fatores podem contribuir para a determinação da estruturação das comunidades de diazotróficos, com diferentes grupos microbianos sendo favorecidos em função das condições ambientais de cada micro-habitat da floresta (e.g. filosfera, serapilheira, rizosfera, dermosfera, etc) em diferentes épocas do ano (Reed; Cleveland; Townsend, 2011).

Com o uso de sequenciamento em larga escala, é possível fazer o estudo da estrutura das comunidades bacterianas de organismos cultiváveis e não-cultiváveis de um determinado micro-habitat de uma floresta. A detecção no ambiente de genes indicadores permite também inferir a funcionalidade dessas comunidades. Para a FBN, o principal gene indicador é o *nifH*, o qual codifica uma Fe-proteína do complexo enzimático nitrogenase, chamada nitrogenase redutase, responsável pela redução do N_2 a NH_3 . Esse gene é amplamente utilizado e tem sido

considerado um confiável indicador molecular, devido ao seu alto grau de conservação em diazotróficos (Zehr *et al.*, 2003).

Diversos estudos em florestas tropicais já foram realizados utilizando o gene *nifH* como indicador. Em uma floresta tropical da Costa Rica foi observada a predominância dos gêneros *Heliobacterium* (Firmicutes), *Gluconacetobacter*, *Methylobacterium*, *Azospirillum* e *Zymomonas* (Alphaproteobacteria) (Reed *et al.*, 2010). Já em solos da Floresta Amazônica, observou-se a predominância de membros das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria (Mirza *et al.*, 2014).

Entender como as comunidades diazotróficas se relacionam com as espécies vegetais em ambientes naturais pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de conservação e manejo de ecossistemas (Reed *et al.*, 2010).

Frente às questões levantadas, este projeto tem por objetivos determinar a diversidade e estrutura das comunidades de diazotróficos presentes na filosfera, rizosfera e serapilheira de diferentes espécies arbóreas da Amazônia em diferentes épocas do ano.

1.1. Hipóteses

- a) A estrutura das comunidades de diazotróficos determinadas com base em predição de função a partir do gene rRNA 16S é similar aquela determinada com base na sequência do gene *nifH*.
- b) As estruturas das comunidades de diazotróficos variam com o micro-habitat (filosfera, serapilheira e rizosfera).
- c) As estruturas de comunidades de diazotróficos na filosfera, serapilheira e rizosfera de espécies arbóreas da floresta Amazônica são dependentes do táxon vegetal.
- d) As estruturas das comunidades de diazotróficos variam com a época de amostragem.

1.2. Objetivos

- a) Caracterizar a diversidade e estrutura das comunidades de bactérias diazotróficas na filosfera, serapilheira e rizosfera de diferentes espécies arbóreas da floresta Amazônica, usando predição de função com base no gene do rRNA 16S e sequenciamento do gene *nifH*, e comparar os métodos de determinação da estrutura das comunidades de diazotróficos;
- b) Determinar se as estruturas das comunidades de diazotróficas são dependentes do microhabitat e do táxon vegetal na Floresta Amazônica, e se variam com a época de amostragem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fixação biológica do nitrogênio por diazotróficos assimióticos

Diazotróficos são os micro-organismos capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) para NH_3 , através de um complexo enzimático chamado nitrogenase. O complexo enzimático é produto da expressão do *cluster* de genes *nif*, presente exclusivamente em organismos procariontes. Os diazotróficos integram um grupo filogeneticamente diverso, envolvendo organismos pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria (Reed; Cleveland; Townsend, 2011). Os diazotróficos conhecidos podem ser heterotróficos ou autotróficos, com representantes fotossintetizantes, litotróficos e metanogênicos (Raymond *et al.*, 2004).

As bactérias diazotróficas terrestres podem ser divididas em dois grupos: simbióticas, que colonizam células vegetais e induzem a produção de nódulos nas raízes de leguminosas; e assimióticas, presentes nas superfícies das plantas (epifíticas), solo, serapilheira, rizosfera, corpos aquáticos e outros sítios (Gray & Smith, 2005). A associação de bactérias simbióticas, como *Rhizobium* e *Brazyrhizobium*, com leguminosas é a simbiose mais estudada, devido à sua importância para a agricultura. No entanto, a FBN assimiótica tem adquirido crescente reconhecimento nos últimos anos, graças a diversos estudos que demonstram que sua contribuição para o aporte de N nos ecossistemas naturais pode ser significativa (Reed; Cleveland; Townsend, 2011).

Micro-organismos diazotróficos assimióticos podem ser abundantes em alguns ecossistemas terrestres, com relevante atuação no ciclo do N em seus habitats, como já observado em superfície de plantas (dermosfera e filosfera), serapilheira e solo (DeLuca *et al.*, 2008). As contribuições para os aportes de N podem ser expressivas principalmente em florestas tropicais. De acordo com estudos recentes, a FBN promovida por bactérias diazotróficas assimióticas em florestas tropicais pode representar uma contribuição maior do que a FBN promovida por bactérias nodulantes (Tabela 1; Reed; Cleveland; Townsend, 2011; Cleveland *et al.*, 1999; Cusack *et al.*, 2009). Adicionalmente, embora árvores leguminosas possam ser abundantes em florestas tropicais, vários estudos sugerem que a FBN simbiótica é drasticamente reduzida em florestas maduras sob solos ricos em N (Barron *et al.*, 2011).

A FBN assimiótica é altamente afetada pelas condições ambientais. Normalmente, as taxas de FBN são maiores em sítios com alta demanda ou ciclagem de N, como no caso de nichos com altos índices de decomposição de matéria orgânica, característico de biomas tropicais, e principalmente onde a relação C:N é elevada. Em tais situações, a importância da

FBN assimbiótica é crítica para o funcionamento do ecossistema, independente de representar ou não processo dominante de entrada de N (Hedin *et al.*, 2009).

Tabela 1. Fixação biológica de N₂ estimada para bactérias simbióticas e assimbióticas em diferentes biomas.

Bioma	Bactérias assimbióticas	Amostras	Bactérias mutualísticas	Amostras
	(Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	(n)	(Kg N ha ⁻¹ ano ⁻¹)	(n)
Tundra úmida e alpina	0,4 - 3,0	7	1,0 - 4,9	3
Floresta boreal	0,3 - 3,8	14	0,3 - 6,6	2
Floresta temperada	0,01 - 12	38	1,0 - 160	17
Campos temperados	0,1 - 21	13	0,1 - 10	8
Savana tropical	3,0 - 30	3	3,0 - 90	6
Floresta tropical perenifolia	0,1 - 60	19	5,5 - 16	4
Várzea tropical	4,1 - 12	3	14 - 28,5	2
Floresta tropical decidual	3,3	1	7,5 - 30	3
Arbustal mediterrâneo	1,0	1	0,1 - 10	4
Deserto	0,01 - 13	15	0,7 - 29,5	3

Fonte: Reed; Cleveland; Townsend (2011)

2.1. Ecologia funcional dos diazotróficos

A FBN é um dos processos metabólicos mais energeticamente custoso (Simpson & Burris, 1984). Consome 16 moléculas de ATP por molécula de N₂ reduzida. A alta demanda de poder redutor e ATP pode explicar o requerimento de ambientes ricos em P (fósforo), observada para os diazotróficos (Vitousek *et al.*, 2002).

Para a síntese do complexo nitrogenase, enzima responsável pela FBN, pode ser necessária a expressão de até 20 genes (Zehr *et al.*, 2003). Os principais genes são os denominados genes *nif*, organizados em 7 ou 8 operons. Para a síntese do cofator Fe-Mo da nitrogenase, seis genes são necessários (*nifH*, *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifQ* e *nifV*) e dois tem como função mobilizar Fe e S para a nitrogenase (*nifU* e *nifS*) (Martinez, 2006). O produto de *nifA*, a proteína NifA, é o ativador da transcrição dos operons *nif*, exceto para o *nifL*, que está envolvido na repressão dos genes *nif* (Dixon; Khan, 2004). Os genes *nifF* e *nifJ* codificam proteínas transportadoras específicas envolvidas na síntese. Os genes *nifH*, *nifD* e *nifK* estão

envolvidos na síntese de subunidades da nitrogenase e por isso o operon *nifHDK* é considerado um bom marcador molecular para presença de micro-organismos diazotróficos (Zehr *et al.*, 2003).

O complexo nitrogenase pode ocorrer em diversas formas alternativas entre os diferentes diazotróficos. Fatores ambientais (e.g., disponibilidade de Mo, O₂ e luz) e genéticos são determinantes para definir o tipo de nitrogenase mais abundante no ambiente. Todas as proteínas do complexo nitrogenase requerem Fe (ferro) e algumas Mo (molibdênio) ou V (vanádio). A Mo-nitrogenase é a mais eficiente na FBN e sua frequência no ambiente tende a ser alta quando existe Mo disponível (Reed; Cleveland; Townsend, 2011).

O O₂ tem efeito inibitório na atuação da nitrogenase, ainda assim, diazotróficos assimbióticos são diversos na forma que utilizam o O₂ e podem ser anaeróbios obrigatórios, facultativos, ou aeróbios obrigatórios. Para lidar com os efeitos tóxicos do O₂, bactérias diazotróficas adotam algumas estratégias para se proteger contra o excesso de O₂, como compartimentalização celular (e.g., heterocistos de cianobactérias), altas taxas respiratórias, produção de polissacarídeos extracelulares, indução da produção de leghemoglobina em nódulos, dentre outras (Reed; Cleveland; Townsend, 2011).

A detecção de alta abundância e diversidade de diazotróficos em um habitat não necessariamente indica alta atividade de FBN. A FBN é facultativa e depende da necessidade do organismo (Zehr *et al.*, 2003). O alto custo energético para produzir e utilizar a nitrogenase faz com que os diazotróficos priorizem fontes alternativas de nitrogênio, e fixem o N₂ somente quando necessário. Ainda assim, existe uma forte associação entre a abundância de genes *nifH* e a atividade de FBN em vários habitats (Zehr *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que a perda de genes não utilizados confere alto ganho adaptativo (Koskineniemi *et al.*, 2012; Hottes *et al.*, 2013). Portanto, linhagens que detêm genes funcionais para a FBN exercem a atividade e o fazem com ganho adaptativo associado, do contrário, haveria grande pressão seletiva para a perda do cluster genético que codifica o complexo nitrogenase.

A planta tem ganho adaptativo ao selecionar micro-organismos pela função. No geral, uma comunidade microbiana diversa possui maior resiliência frente as flutuações ambientais e seus fatores regulatórios. Devido a essa relação, é assumido por diversos autores que a alta diversidade de comunidades diazotróficas epifíticas e outras promotoras de crescimento é resultado de uma relação adaptativa simbiótica com as plantas (Schlaeppli *et al.*, 2015; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). Os microbiomas vegetais podem possuir uma comunidade altamente diversas (Baldrian, 2017), mas a redundância funcional pode ser elevada (Lambais *et al.*, 2016).

Cada vez mais, tem sido observado que as associações de micro-organismo com as plantas são altamente benéficas. Sua importância é comparável a importância do microbioma humano para o desenvolvimento, comportamento e saúde do homem (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). Essa relação é conciliada à teoria do holobionte, que tem o microbioma como uma extensão do organismo hospedeiro. Neste cenário, existiriam adaptações, adquiridas ao longo do processo evolutivo das plantas, direcionadas à manutenção e melhor aproveitamento dos produtos do microbioma e defesa contra patógenos. Nessa hipótese, a influência do genótipo da planta sobre os processos dos micro-organismos é de relevância fundamental e um caráter adaptativo e, do ponto de vista funcional, representa seu fenótipo estendido (Dawkins, 1982). No entanto, esta visão tem sido criticada recentemente (Douglas & Werren, 2016) e o modelo definitivo da relação entre micro-organismo e plantas ainda está por ser definido.

2.1.1. Funcionalidade dos diazotróficos em florestas tropicais

Vários estudos têm sido feitos para caracterizar os diazotróficos em ecossistemas naturais, pois a FBN é capaz de regular a produtividade de diversos ecossistemas (Philippot *et al.*, 2013). Em geral, esses estudos buscam compreender como a função se relaciona com a dinâmica produtiva do ecossistema, e como os genótipos diazotróficos são distribuídos frente a seleção do habitat e outros fatores (Zehr *et al.*, 2003). No entanto, pouco se conhece acerca da diversidade e estruturação das comunidades de diazotróficos em florestas tropicais, mesmo sendo esses ambientes importantes para manutenção do funcionamento da biosfera.

Florestas tropicais são caracterizados pela heterogeneidade espacial de fatores abióticos em pequena escala, os quais podem interferir na dinâmica das comunidades diazotróficas (Reed *et al.*, 2011). A distribuição e atividade dos diazotróficos em solos tropicais é principalmente regulada pela umidade, relação C/N e disponibilidade de P e Mo (Barron *et al.*, 2008).

Os altos níveis de precipitação das florestas tropicais levam a altas taxas de desnitrificação (Austin *et al.*, 2002) e lixiviação de N (Stock & Lewis, 1986). Essa característica pode induzir o aumento das taxas de FBN, devido à maior demanda pelo ecossistema. O aumento da umidade também está relacionado a alta disponibilidade energética (na forma de C disponível) (Cleveland *et al.*, 2006), que aumentam a demanda de N em sítios específicos e favorecem a FBN assimbiótica (Hedin *et al.*, 2009). Além disso, a temperatura média desses habitats é próxima da ótima para atividade de FBN (Pajares & Bohannan, 2016).

Em diversas florestas tropicais, o P se encontra associado a minerais e matéria orgânica de solos encharcados e sua liberação requer a ação de fosfatases extracelulares, cuja síntese requer grandes quantidades de N. A capacidade de adquirir nitrogênio o suficiente para a manutenção de alta atividade de fosfatase extracelular permite lidar com a limitação de fósforo em ecossistemas tropicais. O alto custo energético da FBN demanda alta disponibilidade de P, que pode ser suprido pela atividade de fosfatases sobre a matéria orgânica do solo (Houlton *et al.*, 2008).

As variações temporais das características físico-químicas também causam efeitos relevantes sobre a FBN. Estudos sobre a variação sazonal da FBN assimbiótica em vários ecossistemas mostraram variação notória entre estações do ano, variando de 0,26 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ na seca a 5,48 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ no período chuvoso (Reed *et al.*, 2007). Além disso, as características químicas do substrato podem também afetar a FBN. Como exemplo, foi detectado que o declínio da relação N:P em serapilheira de florestas tropicais leva ao aumento das taxas de FBN (Reed *et al.*, 2007).

Quando uma comunidade de diazotróficos está bem estabelecida em um habitat o nitrogênio passa a não ser o fator mais limitante à produtividade do ecossistema (i.e. biomassa), e outros fatores, como a disponibilidade de P, Fe ou Mo, podem ser mais importantes (Vitousek *et al.*, 1999). Paradoxalmente, a FBN em ambientes tropicais não aparenta sofrer regulação negativa, devido seu acúmulo em relação a outros nutrientes (Hedin *et al.*, 2009). O modelo proposto para solucionar a aparente incongruência, proposto por Hedin e colegas (2009), assume que nichos com alta demanda de FBN (e.g. filosfeia e serapilheira) são capazes de manter altas taxas de fixação e forneceriam nitrogênio a outros sítios de baixa demanda (e.g. solo). Nessa dinâmica, os micro-organismos assimbióticos possuem protagonismo no acúmulo de N na floresta, pois exerceriam a fixação principalmente na serapilheira – que é naturalmente pobre em nitrogênio, devido relação C:N – e na filosfera – que sustenta condições oligotróficas – que manteriam maior demanda pela FBN que o solo potencialmente saturado em nitrogênio (Hedin *et al.*, 2009).

2.2. A diversidade dos diazotróficos

Com a análise de genes marcadores envolvidos na FBN, é possível estimar a diversidade de diazotróficos e determinar a estrutura de suas comunidades. O principal gene utilizado nessa abordagem é *nifH* (Raymond *et al.*, 2004), que codifica a nitrogenase redutase,

indispensável na síntese do complexo nitrogenase (Temme *et al.*, 2012), e conservada entre os diazotróficos, permitindo fazer reconstruções filogenéticas acuradas (Zehr *et al.*, 2003).

Usando o gene *nifH* como marcador em uma floresta tropical da Costa Rica, observou-se na serapilheira a predominância dos gêneros *Heliobacterium* (Firmicutes), *Gluconacetobacter*, *Methylobacterium*, *Azospirillum* e *Zymomonas* (Alphaproteobacteria) (Reed *et al.*, 2010). Já em solos da Floresta Amazônica, membros das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria, e diazotróficos metanogênicos do domínio Archaea foram mais predominantes (Mirza *et al.*, 2014).

A distinção dos diferentes tipos de nitrogenases pode ser importante na inferência de padrões de diversidade. O agrupamento filogenético, com base em sequências conhecidas de *nifH*, distingue cinco grupos básicos denominados *clusters* I-V. Os *clusters* são definidos com base no tipo de enzima codificada pelo gene *nifH*. O *cluster* I representa espécies microbianas em que o gene *nifH* codifica Mo-nitrogenase e algumas nitrogenases contendo vanádio (V); o *cluster* II representa micro-organismos filogeneticamente distantes entre si, mas contendo Mo-nitrogenase, e é característico por conter representantes estritamente anaeróbios; o *cluster* III representa espécies microbianas contendo nitrogenases independentes de Mo, mas com Fe ou V como cofatores; os *clusters* IV e V representam micro-organismos que possuem genes parálogos ao *nifH* incluindo genes para a síntese de bacterioclorofila e seus homólogos presentes em cloroplastos, os quais não codificam nitrogenases (Gaby & Buckley, 2015).

Cada *cluster* de diazotróficos abrange grupos filogenéticos característicos. Diazotróficos do filo Proteobacteria se encontram majoritariamente representados no *cluster* I, em conjunto com Cyanobacteria. De uma maneira geral, o *cluster* I é o mais representado e congrega cerca de 59% das sequências de *nifH* conhecidas, incluindo principalmente bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. A razão de sua dominância pode ser explicada, em parte, por congregar bactérias de águas ricas em oxigênio e solos aráveis, que são os habitats mais amostrados até o presente. *Cluster* II representa um grupo minoritário, com algumas Proteobacteria, Firmicutes e Archaea. *Cluster* III contém anaeróbios estritos de diversos filos, incluindo arqueas metanogênicas, clostrídios, espiroquetas e Deltaproteobacteria redutoras de sulfato (Zehr *et al.*, 2003; Gaby & Buckley, 2015).

A transferência horizontal dos genes *nif*, possivelmente, tem papel importante na diversificação dos diazotróficos no ambiente. Quando o habitat seleciona em favor da atividade da FBN, procariotos que possuem genes *nif* tem também maior *fitness*. Estudos de genômica comparativa de Li e colegas (2014) avaliaram a funcionalidade do cluster dos genes *nif* e concluíram que se trata de uma unidade funcional de fixação de N, capaz de exercer a

função com baixa dependência de outras regiões genômicas, propício a transferência horizontal entre linhagens. No mesmo estudo, em corroboração a essa conclusão, elementos de transposição próximos a região do cluster *nif* foram detectados, o que poderia favorecer sua mobilidade.

2.3. Estruturação do microbioma da floresta em relação aos seus nichos

Florestas tropicais possuem grande heterogeneidade espacial, em virtude dos inúmeros micro-habitats em diferentes estratos. Deste arranjo espacial, vários nichos podem ser definidos, com base em diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas (Baldrian, 2017). Três dos mais importantes nichos em florestas tropicais são: filosfera, serapilheira e rizosfera.

2.3.1. Filosfera

A filosfera é o ambiente formado pela superfície externa das plantas, que inclui caule, folhas, flores e frutos. Em um sentido mais estrito, a filosfera é representada pela superfície das folhas. Assim, a filosfera representa um habitat relevante nos ecossistemas terrestres, perfazendo globalmente aproximadamente $4 \times 10^8 \text{ km}^2$ de superfície total (Morris *et al.*, 2002). Amplamente colonizada por micro-organismos, principalmente bactérias, com baixa abundância de arqueias, a filosfera pode conter 10^6 a 10^7 células bacterianas cm^{-2} (Lindow *et al.* 2003). O sequenciamento de amplicons do gene rRNA 16S tem demonstrado grande riqueza de espécies bacterianas na filosfera, principalmente em florestas tropicais (Lambais *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012).

A filosfera pode representar um ambiente hostil para colonização microbiana. Suas limitações nutricionais e estresses bióticos e abióticos constantes impõe restrições, moldam os padrões de competição e interação entre os micro-organismos. A filosfera está exposta a diversos fatores bióticos e abióticos que variam em curto período de tempo. Sofre rápidas e frequentes flutuações de temperatura e umidade relativa, além da alternância constante da disponibilidade de água provenientes da chuva e orvalho (Vorholt, 2012). É considerado um ambiente oligotrófico, pois os compostos orgânicos são escassos e distribuídos de forma heterogênea na superfície das folhas (Remus-emsermann *et al.*, 2010). Adicionalmente, a alta incidência de radiação UV na filosfera pode também causar limitações ao crescimento microbiano (Jacobs *et al.*, 2005). Os requisitos adaptativos deste ambiente são amplamente

diferentes de outros nichos da planta, como a rizosfera e endosfera, que pode selecionar populações microbianas diferenciadas (Lindow *et al.* 2003).

Em escala microscópica, a alta irregularidade das folhas pode também afetar a estruturação das comunidades microbianas. A presença de ceras na superfície das folhas pode influenciar a absorção e movimentação da água, controlando os recursos nutricionais disponíveis (Knoll *et al.*, 1998; Remus-emsermann *et al.*, 2012). Alterações nas características da cutícula de uma espécie ou variedade de planta podem interferir negativamente na capacidade da planta como hospedeira (Marcell *et al.*, 2002). Normalmente, a distribuição dos micro-organismos na superfície das folhas não é aleatória, e as comunidades são organizadas em agregados microbianos (biofilmes) (Chang *et al.*, 2007). Os agregados microbianos localizam-se preferencialmente nas depressões entre as células da superfície foliar e próximos aos tricomas, em função da maior disponibilidade de carbono (Vorholt, 2012).

Fontes de carbono nas folhas são escassas e limitantes ao crescimento microbiano epifítico (Wilson *et al.*, 1994). Açúcares são disponibilizados via lixiviação das folhas e são heterogeneamente distribuídos (Mercier *et al.*, 2000). O metanol, sub-produto da degradação de pectina durante a expansão da parede celular, também é apontado como uma fonte potencial de carbono para alguns grupos de micro-organismos, assim como vários compostos orgânicos voláteis e, além disso, bactérias metilotróficas são reconhecidamente habitantes comuns da filosfera de várias espécies de plantas (Müller *et al.*, 2016; Vacher *et al.*, 2016). A fotossíntese anóxica, realizada por vários grupos de bactérias, também tem sido sugerida como fonte potencial de carbono nesse ambiente (Atamna-Ismaeel *et al.*, 2012).

As condições ambientais extremas da filosfera oferecem uma gama de pressões seletivas que podem afetar a estruturação das comunidades bacterianas epifíticas. Diversos fatores já foram avaliados como condicionadores das comunidades microbianas na filosfera, dentre eles a presença de diferentes micro-organismos e compostos associados, fertilização, idade foliar, época de amostragem e fluxo de radiação (Vorholt, 2012). Muitas das características desse micro-habitat são dependentes do genótipo vegetal. Na Mata Atlântica, avaliando as comunidades de bactérias na filosfera de várias espécies de árvores, uma relação altamente significativa entre a estrutura de comunidades de bactérias e os táxons vegetais foi observada, ao nível de espécie, gênero e ordem (Lambais *et al.*, 2014).

2.3.2. Serapilheira

A serapilheira é majoritariamente composta por biopolímeros recalcitrantes, representados por polissacarídeos e polifenóis presentes em folhas, ramos e outras partes das plantas (Štursová *et al.*, 2012). É um ambiente rico em carbono e dinâmico. Sua decomposição tem importante papel no ciclo do carbono e na ciclagem global de nutrientes (Talbot *et al.*, 2011). Por consequência, a degradação enzimática promovida pelos micro-organismos é essencial para a síntese de substâncias húmicas e para a disponibilização de N no solo, entre outros nutrientes (Purahong *et al.*, 2016).

A composição da comunidade microbiana interfere na taxa de decomposição da serapilheira (Veen *et al.*, 2015). Fungos e bactérias são os principais decompositores. Bactérias consomem preferencialmente moléculas de baixa massa molecular, provenientes da decomposição inicial, feita principalmente pelos fungos (Štursová *et al.*, 2012).

As propriedades da serapilheira (como a razão C:N ou N:P) interferem na composição da comunidade microbiana, e são dependentes de características específicas das plantas (Urbanová *et al.*, 2015). Já foi observado que a comunidade microbiana da serapilheira é também afetada pelo táxon vegetal, podendo controlar a taxa de decomposição da mesma (Ayres *et al.*, 2009; Veen *et al.*, 2015) e determinar a estratégia ecológica da espécie vegetal (Cornwell *et al.*, 2008). Outros fatores, independentes do taxon vegetal, como o pH e temperatura, são importantes agentes moduladores das comunidades microbianas na serapilheira (Urbanová *et al.*, 2015).

Mudanças sazonais estão correlacionadas a mudanças da estrutura das comunidades de micro-organismos em geral. Chave *et al.* (2010) observaram que os níveis de deposição de serapilheira correlacionaram-se positivamente com o nível de pluviosidade, e, em condições favoráveis para a decomposição, como alta temperatura e umidade, foi observada menor influência da espécie vegetal nas taxas de decomposição (Veen *et al.*, 2015), sugerindo que em áreas mais quentes e úmidas, como em florestas tropicais, os efeitos da planta sobre as comunidades podem ser reduzidos.

2.3.3. Rizosfera

A rizosfera representa a região do solo sob influência da raiz. É um ambiente extremamente dinâmico e complexo, local de inúmeras interações ecológicas entre micro-organismos. A região rizosférica pode conter cerca de 10^{11} células microbianas por grama de

extrato rizosférico (Egamberdieva *et al.*, 2008) e mais de 30.000 espécies procarióticas (Mendes *et al.*, 2011). A enorme abundância e diversidade microbiana, e seus papéis na degradação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, torna a rizosfera um dos ambientes mais relevantes na funcionalidade de um ecossistema.

As plantas são beneficiadas consideravelmente com os micro-organismos presentes na rizosfera, que contribuem na redução de estresses bióticos e abióticos, com impactos na nutrição, crescimento e saúde (Berendsen *et al.*, 2012). Diversas bactérias já identificadas na rizosfera são promotoras de crescimento e contribuem com a disponibilização de nutrientes, por exemplo, através da FBN e solubilização de fósforos (Ahemad & Kibret, 2014).

A produtividade da biomassa vegetal é influenciada pelos micro-organismos presentes na rizosfera, e a riqueza de espécies microbianas é proposta como uma preditora da diversidade e produtividade vegetal (Wagg *et al.*, 2011). É sugerido que a diversidade microbiana é benéfica pois permite a modulação das funções desempenhadas pelos micro-organismos em resposta às flutuações das condições ambientais (Wagg *et al.*, 2011).

Tem sido observado que a presença de bactérias não-patogênicas na rizosfera pode contribuir com defesa da planta, através do antagonismo contra patógenos (Doornbos *et al.*, 2012). O principal mecanismo dessa interação é a antibiose (Lugtenberg & Kamilova, 2009), competição por elementos-traço, nutrientes, micro-sítios (Duffy, 2001), interferência da comunicação relacionada a virulência à planta (Chan *et al.*, 2011) e indução de resistência sistêmica (Effmert *et al.*, 2012).

Diversos compostos específicos produzidos pelos micro-organismos são benéficos às plantas. Entre os compostos produzidos na rizosfera, existem os compostos orgânicos voláteis, que já foram observados interferindo no crescimento vegetal e mediando mecanismos de comunicação entre planta e micro-organismo (Effmert *et al.*, 2011).

Em espécies arbóreas, as comunidades bacterianas presentes no solo rizosférico podem ter sua estrutura influenciada pelo táxon vegetal (Lambais *et al.*, 2014). A planta possui potenciais caracteres que podem agir na seleção e manutenção de grupos específicos de micro-organismos na rizosfera, que pode ser um caráter adaptativo influenciado pelo genótipo, como a liberação de nutrientes específicos e/ou moléculas sinalizadoras (Bais *et al.*, 2006). As raízes liberam compostos de baixo peso molecular (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos), açúcares polimerizados (mucilagem) e células mortas (Jones *et al.*, 2009), dentre outros compostos. A abundância de C na rizosfera aliado a alta concentração de micro-organismos, resulta em um ambiente altamente competitivo (Philippot *et al.*, 2013). Tem sido

observado que o conteúdo de C é um dos parâmetros mais importantes na estruturação de comunidades bacterianas na rizosfera (Fierer, 2017).

Além do carbono, o pH, disponibilidade de N e estado redox são fatores que influenciam significativamente a estruturação das comunidades microbiana na rizosfera (Fierer, 2017). Já foi observado que o pH no solo rizosférico pode variar até duas unidades, por efeito da liberação ou absorção de íons pelas raízes (Hinsinger *et al.*, 2009). Ácidos orgânicos, como succinato, citrato e malato, podem ser consumidos como fonte de carbono por bactérias colonizadoras especializadas, que apresentam vantagem competitiva sobre outras (Kamilova *et al.*, 2006). Outros metabólitos secundários como flavonoides, antimicrobianos e nematicidas também podem ser secretados, potencialmente interferindo na composição das comunidades (Oldroyd, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da amostragem

As amostras foram coletadas na Floresta Nacional do Tapajós, localizada no centro-leste da Amazônia ao sul da cidade de Santarém (2°45' a 4°10'S e 54°45' a 55°30'W), próximo a rodovia Santarém-Cuiabá BR-163. A fisionomia da floresta é classificada como Floresta Tropical Úmida Densa de Terra Firme, com alta produtividade, mesmo em períodos de baixa precipitação (Nepstad *et al.*, 2002). Os solos da região são caracterizados como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico, possuem baixa capacidade de troca de cátions, baixa saturação por bases e são ácidos (Nepstad *et al.*, 2002). A floresta tem característica semi-decídua, com vegetação densa, com altura média do dossel entre 35 e 40 m (Goulden *et al.*, 2004).

O clima é caracterizado por uma estação chuvosa entre os meses de dezembro e julho e uma estação seca, que se estende de agosto a novembro. A temperatura média anual é de 25°C, oscilando entre a mínima de 21°C e a máxima de 30,6°C. No dossel florestal as temperaturas variam pouco, as máximas e mínimas diárias oscilam entre 24 e 32°C e 20 e 25°C, respectivamente (da Rocha *et al.*, 2004, Goulden *et al.*, 2004).

3.2. Amostragem

As amostragens foram realizadas em três períodos do ano (14 a 24 de julho de 2015, 9 a 19 de fevereiro de 2016 e 13 a 23 de julho 2016), sob condições climatológicas diferenciadas (Figura 1). As amostras de folhas, serapilheira e solo rizosférico foram coletadas de nove espécies vegetais arbóreas, de 6 a 14 indivíduos por espécie, totalizando 90 árvores amostradas (Tabela 1). As amostras de folhas foram coletadas de ramos de diferentes pontos do dossel, de acordo com as características estruturais de cada espécie, com auxílio de podão e tesoura de poda, devidamente desinfestados entre as amostragens. A serapilheira foi coletada com o auxílio de uma moldura de 25x25 cm, a qual foi lançada ao acaso sob a projeção da copa da árvore de interesse e a serapilheira contida em sua área interna coletada e armazenada em gelo. As amostras indeformadas de solo foram coletadas no mesmo local de onde foi coletada a serapilheira, com auxílio de anéis metálicos de 50 cm³, na camada 0-10 cm. Com um instrumento cortante, o excesso de terra de ambas as faces do anel foi eliminado. Após a coleta, os anéis foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos sob temperatura ambiente. Sub-amostras de solo foram transferidas para tubos plásticos esterilizados e armazenadas a -20 °C até o processamento para extração de DNA.

Tabela 2. Relação de espécies amostradas

Espécie	Família	Nome Popular	Número de Indivíduos
<i>Amphirrhox surinamensis</i>	Violaceae	Tajá oedae	10
<i>Aparisthium cordatum</i>	Euphorbiaceae	Marmeleiro	10
<i>Chamaecrista xinguensis</i>	Fabaceae	Coração de negro	10
<i>Coussarea racemosa</i>	Rubiaceae	Caferana	10
<i>Erismia uncinatum</i>	Vochysiaceae	Quarubarana	6
<i>Manilkra ahuberi</i>	Sapotaceae	Maçaranduba	14
<i>Miconia lepidota</i>	Melastomataceae	Tinteiro sulcado	10
<i>Protium apiculatum</i>	Burseraceae	Breu grande, Pijobá	10
<i>Rinorea passoura</i>	Violaceae	Canela de garça	10

Figura 1. Precipitação total, insolação total e temperatura máxima média na região das amostragens. As amostras foram coletadas nos períodos: (a) 14 a 24 de julho de 2015, (b) 9 a 19 de fevereiro de 2016 e (c) 13 a 23 de julho de 2016. Dados obtidos do posto meteorológico BELTERRA - PA (OMM: 82246), Latitude: -2,63°, Longitude: -54,95° e Altitude: 175,74m (INMET, 2017).

3.3. Desalojamento dos micro-organismos da filosfera e serapilheira

Sob condições assépticas, e dependendo da área foliar de cada espécie vegetal, entre 5 e 10 folhas de cada árvore foram utilizadas para o desalojamento da comunidade microbiana da filosfera. Para serapilheira, sub-amostras de aproximadamente 10 g foram colocadas em um becker contendo 500 mL de solução tampão fostato esterilizada (pH 7) e sonicadas por 10 minutos a 22,5 kHz, utilizando-se um homogeneizador de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Coleparmer Instrument Company, Illinois, USA). A suspensão bacteriana foi filtrada à vácuo através de uma membrana com porosidade 0,22 µm e diâmetro de 47 mm. Os filtros foram armazenados em tubos plásticos esterilizados e mantidos a -20°C até a extração de DNA.

3.4. Extração de DNA

O DNA total do solo foi extraído utilizando-se 0,25 g de cada amostra e o kit Power Soil DNA (MoBioLaboratories, Carlsbad, EUA), conforme instruções do fabricante. O DNA total da filosfera e serapilheira foi extraído das células microbianas retidas em membranas filtrantes, utilizando-se o kit Fast DNA (MP Biomedicals, Solon, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1X TAE-1,0%, depois de corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil). As imagens dos géis foram obtidas por meio de um escaner à laser (Typhoon, GE Healthcare, São Paulo) e analisadas pelo programa ImageQuant TL (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por fluorimetria utilizando-se um fluorímetro “Qubit®” (Life Technologies, São Paulo, Brasil).

3.5. Sequenciamento do gene *nifH*

Para o sequenciamento do gene *nifH*, foram utilizadas duas placas 360-plex, em MiSeq-Illumina, e o sequenciamento foi do tipo paired-end. Para o sequenciamento um fragmento do gene *nifH* foi amplificado a partir do DNA total, utilizando-se iniciadores com adaptadores. Adicionalmente, os iniciadores *reverse* usados para cada amostra receberam uma tag composta por 12 bases, para posterior identificação da origem de cada uma das sequências obtidas no sequenciamento multiplex (Caporaso *et al.*, 2010, 2012).

Os iniciadores utilizados nas amplificações foram: IGK3 (5’-

GCIWTHTAYGGIAARGGIGGIATHGGIAA-3') e DVV (5'-ATIGCRAAICCCICCRCAIACIACRTC-3') (onde I= inosina, R=A ou G, W=A ou T, Y=C ou T, H=A ou C ou T). De acordo com Ando et al. (2005) e Gaby et al. (2012), tais iniciadores apresentaram resultados superiores para a captação da diversidade de comunidades de diazotróficos, quando comparados com outros iniciadores mais amplamente utilizados (e.g. iniciadores PolF-PolR de Poly *et al.*, 2001). As amostras de DNA foram amplificadas em reações de 50 µL cada. Na solução foram adicionados 1 µM de cada iniciador com a sequência tag, 1-5ng de DNA, 1 mg mL⁻¹ de BSA, 0,2 mM dNTPs e 2,5 mM MgCl₂. A amplificação foi feita com uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Todos os produtos da amplificação (amplicons) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1X TAE-1,5% corado com syber gelred diluído 10,000X. Os produtos de PCR purificados foram quantificados por fluorimetria, utilizando-se um fluorímetro Qubit (Life Technologies, São Paulo, Brasil).

3.6. Sequenciamento do gene rRNA 16S

Para o sequenciamento do gene rRNA 16S, o iniciador forward utilizado para amplificação da região V4 foi 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e o iniciador reverse 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). As amostras de DNA foram amplificadas em reações de 25 µL cada, em duplicata. Na solução foram adicionados 0.5 µL do iniciador forward 10 µM e 1 µL do iniciador reverse com a sequência tag, diluído a 5 µM, 1-5ng de DNA, 1 mg mL⁻¹ de BSA e 10 µL de Prime 5 PCR Hot Master Mix. A amplificação foi feita com uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 90 segundos, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. As amplificações foram feitas em termociclador BIO-RAD CT016444 (BioRad, Hercules, CA, USA). Os equipamentos, reagentes e protocolos de controle de qualidade foram os mesmos aplicados no sequenciamento do gene *nifH*.

3.6.1. Processamento das sequências do gene rRNA 16S

As sequências do fragmento do gene rRNA 16S obtidas foram inicialmente analisadas por meio do pipeline disponibilizado pelo *Brazilian Microbiome Project* (Pylro *et al.*, 2014). Foram descartadas sequências sem barcode, para então serem demultiplexadas. As sequências dos iniciadores foram retiradas com o script `bbduk.sh` do pacote BBTools. Para eliminação de sequências de baixa qualidade e agrupamento em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi utilizado o software USEARCH9 (Uparse) (Edgar, 2010, 2013). Na etapa adiante, sequências com qualidade abaixo do nível estabelecido, com erro esperado máximo = 1 (Edgar & Flyvbjerg, 2014) e tamanho inferior a 240 pares de bases, foram descartadas pelo filtro “`-fastq_filter`”.

3.6.2. Análise das sequências de bactérias diazotróficas inferidas da reconstrução de metagenomas obtidos a partir de sequências do gene rRNA 16S

A identificação taxonômica das UTOs classificadas como diazotróficas, determinação da estrutura filogenética e diversidade microbiana, foram realizadas com o pacote QIIME versão 1.9.0 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso *et al.*, 2010). Os grupos bacterianos diazotróficos foram deduzidos com base na filogenia, através da utilização de banco de dados com bactérias diazotróficas fornecido por Gaby & Buckley (2014), que compõe um conjunto de sequências de bactérias e arqueias diazotróficas curadas e identificadas. Adicionalmente os grupos taxonômicos foram divididos de acordo com os *clusters* associados ao tipo de nitrogenase (*clusters* I-V), que permite fazer a separação de genes identificados como parálogos ao *nifH* que não correspondem a diazotróficos. Dessa forma, a partir de uma comunidade total, podem ser filtrados os táxons não identificados como diazotróficos, graças a trabalhos anteriores que estudaram os mesmos táxons através da análise do gene *nifH* e o depósito de sequências bacterianas completas em bancos genômicos.

Através do QIIME, os amplicons *foward* e *reverse* foram montados em contigs utilizando-se o “`fastq.join`” (ARONESTY, 2013). O arquivo gerado “`.fastq`”, juntamente com o arquivo de barcodes “`.fastq`” e respectivo *mapping file* “`.txt`” foram então processados utilizando-se o “`split_libraries_fastq.py`”, e adotando-se os parâmetros padrões do pacote QIIME versão 1.9.0 (Caporaso *et al.*, 2012). O arquivo com as UTOs capturadas gerado pelo USEARCH7 foi utilizado para fazer a afiliação taxonômica utilizando-se o método BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e o banco de dados Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006), filtrado com

base no banco de dados de Gaby & Buckley (2014) para representar somente bactérias identificadas como diazotróficas, usado como referência no QIIME para a função “*assign_taxonomy.py*”. Os arquivos gerados, “*seqs_otu.txt*” e “*tax_assignments.txt*” foram utilizados para construir uma tabela de UTOs em formato BIOM, através do *script* “*make_otu_table.py*”. Além disso, foram feitas as análises de diversidade alfa (Shannon, Chao1, equitabilidade de Simpson, Número de UTOs e Cobertura) no QIIME através do *script* “*alpha_diversity.py*”.

3.7. Processamento e análises das sequências de *nifH*

A demultiplexação das sequências de *nifH* e filtragem por qualidade foi feita da mesma forma que as sequências de rRNA 16S. A identificação taxonômica das UTOs e determinação da estrutura filogenética foram realizadas seguindo o fluxo de trabalho TaxADivA (Taxonomy Assignment and Diversity Assessment) (Gaby *et al.*, 2017) e as análise de diversidade com o pacote QIIME versão 1.9.0.

O *script* para o fluxo de trabalho TaxADivA foi criado especificamente para análises de sequências de *nifH* e têm seus parâmetros otimizados para sequências de amplicons obtidas com os iniciadores de Ando *et al.*, (2005). De acordo com este *script*, as sequências *forward* e *reverse* foram fundidas com o programa PEAR (paired-end reads merger) (Zhang *et al.*, 2014). Com a modificação do *script*, as sequências dos iniciadores foram retiradas com a função *trim.seqs* do *mothur* (Schloss *et al.*, 2009). Quimeras foram removidas e sequências agrupadas em UTOs pelo programa VSEARCH (Rognes T. *et al.*, 2016), utilizando-se um *cutoff* de similaridade de 95%. Finalmente, as afiliações taxonômicas foram feitas pelo programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), utilizando-se o banco de dados de sequências de *nifH* de Gaby & Buckley (2014), que é programado pelo *script* para determinar o nível de classificação de acordo com limiares de identidade (% do *hit*), sendo que para espécies *hit* > 91,9%, gêneros *hit* > 88,1%, famílias *hit* > 75% e ordens *hit* < 75%. Posterior à classificação é feita a eliminação das sequências pertencentes aos *clusters* IV e V, de sequências parálogas ao *nifH*.

3.8. Análises estatísticas

Análises estatísticas multivariadas não-paramétricas foram utilizadas para determinar os fatores moduladores das estruturas das comunidades microbianas. As diferenças entre os grupos de amostras, delimitadas pelos fatores micro-habitat (filosfera, serapilheira e rizosfera) e tempo (época de amostragem), foram avaliadas por análise de similaridade (ANOSIM), utilizando-se o software *mothur* 1.39.5 (Schloss *et al.*, 2009), onde o valor estatístico *R* representa a separação entre os grupos (Clarke, 1993). Valores de *R* próximos a 1 significam diferença completa entre as comunidades comparadas, enquanto valores próximos a 0 significam alta similaridade entre os grupos (Clark & Gorley, 2006). Para estudar a variação das amostras explicada pelas diferenças entre espécies de árvores os grupos também foram comparados através da análise multivariada permutacional (PERMANOVA) com o pacote estatístico *Vegan* do programa R (Oksanen, 2007), o qual testa a hipótese de que os centróides e a dispersão dos objetos dos grupos comparados, definidos por uma matriz de distâncias, são equivalentes para qualquer grupo (Anderson, 2001). Nesse caso, as comparações foram realizadas com matrizes de dissimilaridades de Bray-Curtis, após os dados serem balanceados e transformados pela raiz quadrada dupla.

Análises *post-hoc* para ANOVA foram feitos com o teste de Welch, para dados desbalanceados com heterogeneidade de variâncias (Bluman, 2007), com o programa R.

As análises de coordenadas principais foram baseadas nas matrizes de distâncias construídas com o método UniFrac, uma métrica de distância utilizada em diversos estudos de ecologia de micro-organismos. *Weighted Unifrac* incorpora informações da relação de distância filogenética entre os membros da comunidade e a abundância dos organismos observados (Lozupone *et al.*, 2007). Para construção das matrizes de distâncias e obtenção das coordenadas principais foi utilizado a função *beta_diversity.py* e *principal_coordinates.py* do pacote QIIME.

Para acessar características de relevância biológica, foi considerado o tamanho de efeito nas análises de abundância taxonômicas, que mensura a magnitude de diferenças estatisticamente significativas (Parks *et al.*, 2010; Lakens *et al.*, 2013). O tamanho de efeito mensurado por η^2 (eta ao quadrado) nas análises foi provido pelo programa STAMP (Parks *et al.*, 2014), sendo esta mensuração definida por ‘SQ do efeito’ (soma dos quadrados) dividido pela ‘SQ total’, sendo que seu valor indica a porcentagem de variância do total explicada pelo fator (Lakens *et al.*, 2013), ou seja, quanto cada filiação taxonômica explica as diferenças entre os grupos de amostras.

Foi feita análise de biomarcadores, para testar associações significativas entre os táxons bacterianos e as espécies das árvores hospedeiras, utilizando-se análise discriminante linear (LDA). O algoritmo LEfSe (Segata *et al.*, 2011) visa descobrir biomarcadores (e.g. táxons, genes e metabolismos) de diferentes grupos de amostras, ao empregar LDA e medir o tamanho do efeito da associação do marcador ao grupo. Uma associação significativa entre um clado filogenético e um grupo de amostras, neste caso referente à espécie da árvore, será detectada quando houver consistente maior abundância relativa do clado para as amostras agrupadas. Entre os clados de micro-organismos detectados, aqueles que apresentam os maiores *scores* para a estatística possuem o maior poder em explicar as diferenças entre as comunidades (Segata *et al.*, 2011).

4. RESULTADOS

4.1. Análises das comunidades de bactérias com base em sequências do gene rRNA 16S

4.1.1. Diversidade de UTOs capturadas de bactérias totais

O sequenciamento dos amplicons do gene rRNA 16S resultou em média entre 101.007 e 187.901 sequências válidas (Tabela 3). Sequências de bactérias da serapilheira provindas da amostragem de 07/2015 obtiveram valores de qualidade muito abaixo do adequado e não foram utilizadas nas análises subsequentes, devido ao risco de comprometer os resultados. Pelo mesmo motivo, sequências R2 (*reverse*) de bactérias da serapilheira de 07/2016 também não foram utilizadas, porém, as sequências R1 (*forward*) obtiveram níveis de qualidade aceitáveis e suprimiram as análises para estas amostras.

Tabela 3. Média do número de sequências de amplicons do gene rRNA 16S válidas obtidas para cada micro-habitat, nas três épocas de amostragem.

Época	Micro-habitat	Amostras (n)	Sequências válidas
jul/15	Filosfera	75	121518 ± 54959
	Rizosfera	84	101007 ± 43040
fev/16	Filosfera	87	187902 ± 58581
	Serapilheira	90	180250 ± 47756
	Rizosfera	92	183678 ± 52828
jul/16	Filosfera	84	168254 ± 44444
	Serapilheira	89	154172 ± 40484
	Rizosfera	81	174861 ± 59053

A diversidade total de UTOs bacterianas nos diferentes micro-habitats e épocas de amostragem pode ser visualizada na Tabela 4. Os índices de cobertura mostraram que as amostragens capturaram quase toda a riqueza disponível, indicando que o esforço amostral foi adequado para representar essas comunidades bacterianas.

As maiores abundâncias de UTOs foram detectadas na serapilheira, com médias de 2464 ± 533 até 2925 ± 522 UTOs, em relação a filosfera (1009 ± 415 até 1341 ± 542) e rizosfera (1298 ± 337 até 1374 ± 215). Os maiores índices de diversidade (Shannon) também foram detectados na serapilheira, com índices aproximados de 8,9, se comparado com

filosfera (6,18) e rizosfera (7,33). Para a riqueza de UTOs, no geral, independente da época de amostragem, estima-se que na serapilheira exista em média 3608 UTOs, na filosfera 1235 e na rizosfera 1752 (Tabela 4). De acordo com os resultados obtidos, em um mesmo micro-habitat a época de amostragem parece ter pequeno efeito sobre o índice de riqueza estimado, com diferenças significativas encontradas somente para a filosfera no período de fevereiro de 2016, que foi menor que as demais épocas de acordo com teste de Welch ($p < 0,05$).

Tabela 4. Diversidade de UTOs de bactérias totais, determinada com base no agrupamento de sequências do gene rRNA 16S.

Época	Habitat	<i>Observed otus</i>	<i>Shannon Index</i>	<i>Good's coverage</i>	<i>Simpson evenness</i>	<i>Chao1 Richness</i>
jul/2015	Filosfera	1341 ± 542	6,71 ± 1,42	0,99 ± 0,02	0,03 ± 0,03	1739 ± 644
	Rizosfera	1298 ± 337	7,12 ± 0,46	0,99 ± 0,00	0,03 ± 0,01	1733 ± 449
fev/2016	Filosfera	1009 ± 415	5,85 ± 1,24	0,99 ± 0,01	0,03 ± 0,02	1460 ± 570
	Serapilheira	2464 ± 533	8,63 ± 0,69	0,98 ± 0,01	0,05 ± 0,02	3303 ± 625
	Rizosfera	1374 ± 215	7,43 ± 0,25	0,99 ± 0,00	0,05 ± 0,01	1781 ± 307
jul/2016	Filosfera	1034 ± 369	5,98 ± 1,08	0,99 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1524 ± 522
	Serapilheira	2926 ± 522	9,17 ± 0,68	0,98 ± 0,01	0,07 ± 0,03	3913 ± 595
	Rizosfera	1349 ± 254	7,44 ± 0,26	0,99 ± 0,00	0,05 ± 0,02	1743 ± 345

4.1.2. Diversidade de UTOs de bactérias diazotróficas inferidas da reconstrução de metagenomas a partir de sequências do gene rRNA 16S

A diversidade de UTOs de bactérias diazotróficas inferidas com base na reconstrução do metagenoma a partir do gene rRNA 16S nos diferentes micro-habitats e épocas de amostragem pode ser vista na Tabela 5. Assim como para a comunidade total, foi obtida alta cobertura e o esforço amostral foi adequado para representar essas comunidades bacterianas.

As maiores abundâncias de UTOs de possíveis diazotróficas foram detectadas na serapilheira, com média de 547 ± 106 até 632 ± 95 UTOs, em relação a filosfera (229 ± 83 até 322 ± 112) e rizosfera (232 ± 75 até 246 ± 60). Novamente, os maiores índices de diversidade (Shannon) e as maiores riquezas de UTOs (Chao1) também foram detectadas na serapilheira, em relação a filosfera e rizosfera. Houve baixa variação entre as épocas de amostragem, em um mesmo micro-habitat. A diversidade de Shannon e a riqueza Chao1 para filosfera, foram menores em fevereiro de 2016 em relação às outras duas épocas, de acordo com teste *post-hoc* de Welch ($p < 0,05$).

Tabela 5. Diversidade de UTOs de bactérias diazotróficas inferidas a partir da reconstrução de metagenomas.

Época	Habitat	<i>Observed otus</i>	<i>Shannon Index</i>	<i>Good's coverage</i>	<i>Simpson evenness</i>	<i>Chao1 Richness</i>
jul/2015	Filosfera	322 ± 112	5,38 ± 0,62	0,99 ± 0,01	0,06 ± 0,02	402 ± 134
	Rizosfera	232 ± 75	5,85 ± 0,36	0,99 ± 0,01	0,14 ± 0,03	313 ± 105
fev/2016	Filosfera	229 ± 83	4,09 ± 0,93	0,99 ± 0,01	0,04 ± 0,02	309 ± 112
	Serapilheira	547 ± 106	6,38 ± 0,65	0,99 ± 0,00	0,06 ± 0,03	688 ± 120
	Rizosfera	246 ± 58	5,58 ± 0,37	0,99 ± 0,03	0,10 ± 0,06	323 ± 81
jul/2016	Filosfera	261 ± 80	4,32 ± 0,82	0,99 ± 0,00	0,04 ± 0,02	355 ± 118
	Serapilheira	632 ± 95	6,97 ± 0,65	0,99 ± 0,01	0,08 ± 0,04	778 ± 108
	Rizosfera	246 ± 60	5,65 ± 0,28	0,99 ± 0,00	0,11 ± 0,02	321 ± 88

4.1.3. Estrutura das comunidades diazotróficas inferidas da reconstrução de metagenomas a partir de sequências do gene rRNA 16S

É evidenciado que as comunidades diazotróficas tem sua proporção em relação a comunidade total afetada pelo micro-habitat ao passo que demonstra baixa variação no tempo. Isso é demonstrando pela mensuração da fração de riqueza correspondente às bactérias diazotróficas dentro da comunidade total (Figura 3). As proporções apresentaram baixa variação entre os três períodos, com diferença significativa observada somente para filosfera na época de fevereiro de 2016 de acordo com teste *post-hoc* de Welch ($p < 0,05$). A diferença encontrada está em concordância com o nível reduzido de riqueza encontrado neste período para as bactérias diazotróficas na filosfera (Tabela 5). Dentre os três micro-habitats, a filosfera apresentou as maiores frequências relativas de táxons de bactérias diazotróficas, de acordo com a classificação das sequências do gene rRNA 16S, representando aproximadamente 23% (jul/2015), 22% (fev/2016) e 23% (jul/2016) das UTOs. As menores proporções foram observadas para a rizosfera com valores de aproximadamente 18% das UTOs nas três épocas, enquanto para serapilheira os valores foram se aproximadamente 20% (fev/2016) e 21% (jul/2016) das UTOs.

Figura 3. Proporção de UTOs de bactérias diazotróficas inferidas em relação a UTOs de bactérias totais, com base na riqueza estimada (Chao1). Teste *post-hoc* de Welch realizado entre épocas, para alfa 95%.

Os resultados da análise de coordenadas principais mostraram que as comunidades de bactérias diazotróficas inferidas a partir da reconstrução de metagenomas bacterianos são significativamente diferentes entre si na filosfera, serapilheira e rizosfera, e também dependem da época de amostragem (Figura 4). A estrutura das comunidades de bactérias diazotróficas da filosfera e serapilheira se mostraram mais similares entre si, quando comparado com a rizosfera.

Figura 4. Análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade diazotrófica baseada nos dados de rRNA 16S, para todos os micro-habitats, nas três épocas de amostragem.

A análise de similaridade (ANOSIM) mostrou que as estruturas das comunidades de bactérias diazotróficas são altamente influenciadas pelos micro-habitats que ocupam, com altos níveis de dissimilaridades entre elas, sendo tal efeito observado para todas as épocas de amostragem, com valores de ANOSIM para estatística R entre 0,633 e 0,999 (Tabela 6). Os níveis de dissimilaridade entre os micro-habitats filosfera e serapilheira (0,633 e 0,812) foram menores em relação à rizosfera, a qual apresentou valores R de aproximadamente 0,990, embora estatisticamente significativos para as duas épocas comparadas.

A época do ano também teve efeito na estrutura das comunidades diazotróficas, como mostrado pela ANOSIM entre as épocas de amostragens (Tabela 7). Todas as comparações foram estatisticamente significativas, com níveis considerados altos para a maioria das comparações ($>0,5$) (Clark & Gorley, 2006). Os valores de dissimilaridade em relação a época de amostragem mostraram-se menores do que os de micro-habitat, indicando que o efeito de micro-habitat tem maior poder na modulação da estrutura das comunidades diazotróficas, com valores de R entre as épocas variando de 0,076 a 0,621 (Tabela 7), enquanto os valores de R entre micro-habitats foram todos maiores que 0,633 (Tabela 6).

Fevereiro e julho de 2016 mostraram ser os períodos que as estruturas das comunidades dos micro-habitats mais se assemelharam. Para serapilheira, conclusões nesse sentido não puderam ser obtidas, pois o micro-habitat foi estudado em apenas dois períodos.

A estrutura da comunidade de diazotrófica da filosfera mostrou ser a mais afetada pela sazonalidade, com valor global de estatística *R* para ANOSIM de 0,516.

Na única comparação onde os três micro-habitats foram estudados (Fev/2016 contra Jul/2016), filosfera também mostrou a maior dissimilaridade. Também para estes períodos a estrutura da comunidade de diazotróficos da rizosfera se apresentou altamente similar entre as épocas, com valor 0,076.

Tabela 6. ANOSIM das comunidades diazotróficas inferidas a partir da reconstrução do metagenoma para os três micro-habitats, nas três épocas de amostragem.

Comparações entre micro-habitats		<i>R-value</i>	<i>P-value</i>
Jul/2015	Filosfera x Rizosfera	0,702	0,0001*
Fev/2016	Filosfera x Serapilheira x Rizosfera	0,906	0,0001*
	Filosfera x Serapilheira	0,633	0,0001*
	Filosfera x Rizosfera	0,999	0,0001*
	Serapilheira x Rizosfera	0,998	0,0001*
Jul/2016	Filosfera x Serapilheira x Rizosfera	0,939	0,0001*
	Filosfera x Serapilheira	0,812	0,0001*
	Filosfera x Rizosfera	0,999	0,0001*
	Serapilheira x Rizosfera	0,988	0,0001*

*Valores significativos para $p < 0,016$ com aplicação de correção de Bonferroni.

Tabela 7. ANOSIM das comunidades de bactérias diazotróficas inferidas a partir da reconstrução do metagenoma das três épocas de amostragem.

Comparações	Filosfera		Rizosfera		Serapilheira	
	<i>R-value</i>	<i>P-value</i>	<i>R-value</i>	<i>P-value</i>	<i>R-value</i>	<i>P-value</i>
Fev.2016 x Jul.2015 x Jul.2016	0,516	<0,0001*	0,402	<0,0001*		
Fev.2016 x Jul.2015	0,590	<0,0001*	0,621	<0,0001*		
Fev.2016 x Jul.2016	0,392	<0,0001*	0,076	<0,0001*	0,237	<0,0001*
Jul.2015 x Jul.2016	0,547	<0,0001*	0,525	<0,0001*		

*Valores significativos para $p < 0,016$ com aplicação de correção de Bonferroni.

Foram obtidas as frequências relativas dos táxons (Figura 5) das UTOs classificadas das comunidades diazotróficas inferidas, para todas as épocas. Em todos os micro-habitats, o filo Proteobacteria foi mais abundante, representando na filosfera 85% (jul/15), 95,5% (fev/16) e 93,8% (jul/16), na rizosfera 85,9% (jul/15), 84,6% (fev/16) e 87,28% (jul/16) e na serapilheira 92,59% (fev/16) e 94,35% (jul/16). As classes de Proteobacteria mais representadas, de forma geral, foram Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria. As abundâncias da classe Deltaproteobacteria na filosfera e serapilheira foram aproximadamente 1% e 0,5%, respectivamente. Em abundâncias foram menores do que na rizosfera (12%). Já para Gammaproteobacteria, as abundâncias na rizosfera foram de aproximadamente 10% em comparação com 32% na filosfera e serapilheira. Betaproteobacteria foi altamente influenciada pela época de amostragem, sendo mais frequente nas comunidades da filosfera nas amostras coletadas em fevereiro e julho de 2016 com 47,51% e 42,6%, respectivamente, em comparação com julho de 2015 (6,45%).

As classes do filo Proteobacteria foram as mais importantes para diferenciar a comunidade diazotrófica, com base nos valores η^2 (eta ao quadrado). Os valores η^2 da classe Alphaproteobacteria foram 0,17 (jul/2015), 0,64 (fev/2016) e 0,78 (jul/2016), Betaproteobacteria de 0,12 (jul/2015), 0,59 (fev/2016) e 0,59 (jul/2016), Gammaproteobacteria de 0,27 (jul/2015), 0,25 (fev/2016) e 0,26 (jul/2016) e Deltaproteobacteria de 0,80 (jul/2015), 0,87 (fev/2016) e 0,82 (jul/2016).

As subclasses Oscillatoriothycideae, Nostocophycideae e Synechococophycideae, do filo Cyanobacteria, apresentaram frequências relevantes (acima de 1%) apenas na filosfera, com variação de importância no tempo. Embora com frequências relativamente baixas, o tamanho de efeito desses grupos foi relevante, com valores entre 0,04 e 0,17, devido a abundância maior na filosfera.

O filo Actinobacteria foi mais abundante na rizosfera, com frequência relativa aproximada de 12,5%, em relação a filosfera e serapilheira, que obtiveram valores de aproximadamente de 6,5% e 5%, respectivamente, com exceção da época de jul/2015 quando a frequência de filosfera foi similar a da rizosfera (12,53%). Os efeitos de Actinobacteria foram importantes em fev/2016 e jul/2016, com η^2 de 0,46 e 0,42, respectivamente.

Figura 5. Frequências relativas das diferentes classes de bactérias diazotróficas inferidas a partir da reconstrução de metagenoma. Somente os táxons com frequência acima de 1% são apresentados. Valores de η^2 (eta-squared) para tamanho de efeito indicados, foram obtidos pelo teste *post-hoc* de Welch.

Com o intuito de estudar os efeitos dos táxons vegetais na estrutura das comunidades de bactérias diazotróficas inferidas dos metagenomas reconstruídos, foi feita análise PERMANOVA para todas as espécies vegetais (Figuras 6, 7 e 8). O efeito dos táxons vegetais na rizosfera na época de julho de 2015 foi significativo, com um valor de $p=0,66$. Os maiores efeitos da espécie vegetal foram observados na filosfera, nas três épocas de amostragens, com valores de R da análise PERMANOVA em julho de 2015 de 14,3% comparado com 10,1% para rizosfera; em fevereiro de 2016, 18,8% para filosfera contra 14,5% e 10,9% de rizosfera e serapilheira, respectivamente; e em julho de 2016, 16,4% para filosfera contra 12,8% e 12,6% de rizosfera e serapilheira, respectivamente.

Pela análise de coordenadas principais, pôde ser observada a sobreposição entre diferentes comunidades associadas aos táxons vegetais, ainda assim, o efeito significativo indicado pela análise PERMANOVA sugere que o genótipo das árvores pode ter papel na seleção dos micro-organismos associados.

Figura 6. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades de possíveis diazotróficas com base no gene rRNA 16S, para todas as espécies de árvores, nas três épocas. **A.** Julho de 2015; **B.** Fevereiro de 2016; e **C.** Julho de 2016. No gráfico é apresentada a proporção de variação R^2 explicada pelo fator, apontada pela estatística PERMANOVA. *valores significativos ($p < 0,05$).

Rizosfera

Figura 7. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades de possíveis diazotróficas com base no gene rRNA 16S, para todas as espécies de árvores, nas três épocas. **A.** Julho de 2015; **B.** Fevereiro de 2016; e **C.** Julho de 2016. No gráfico é apresentada a proporção de variação R^2 explicada pelo fator, apontada pela estatística PERMANOVA. *valores significativos ($p < 0,05$).

Figura 8. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades de possíveis diazotróficas com base no gene rRNA 16S, para todas as espécies de árvores, nas três épocas. **A.** Fevereiro de 2016; e **B.** Julho de 2016. No gráfico é apresentada a proporção de variação R^2 explicada pelo fator, apontada pela estatística PERMANOVA. *valores significativos ($p < 0,05$)

4.2. Análises das comunidades de bactérias com base em sequências do gene *nifH*

4.2.1. Diversidade de UTOs dos micro-organismos diazotróficos

O sequenciamento dos amplicons do gene *nifH* resultou, em média, entre 31141 e 57257 sequências válidas (Tabela 8). O número de amostras variou para cada micro-habitat e por época de amostragem, devido a qualidade insatisfatória de sequências de diversas amostras, que foram eliminadas pelo filtro da pipeline TaxADivA (Gaby *et al.*, 2017).

Tabela 8. Médias do número de sequências válidas de amplicons obtidas do gene *nifH* para cada micro-habitat em três épocas do ano.

Época	Micro-habitat	Amostras (n)	Sequências válidas
jul/15	Filosfera	72	57232 ± 10968
	Serapilheira	50	57257 ± 29887
	Rizosfera	68	34834 ± 13579
fev/16	Filosfera	66	44591 ± 10817
	Serapilheira	81	48870 ± 19001
	Rizosfera	86	31141 ± 14088
jul/16	Filosfera	81	41658 ± 8326
	Serapilheira	80	39308 ± 12251
	Rizosfera	80	36844 ± 25893

A comunidade diazotrófica com base no gene *nifH* mostrou altos níveis de diversidade e riqueza (Tabela 9), com alta cobertura de amostragem, que variou de $0,89 \pm 0,04$ a $0,96 \pm 0,01$, indicando esforço amostral adequado às análises. A serapilheira obteve as maiores abundâncias de UTOs detectadas (entre 2840 ± 764 e 3235 ± 1049), em relação a filosfera (entre 1253 ± 443 e 1950 ± 590) e rizosfera (entre 1591 ± 500 e 1754 ± 1337). Os maiores índices de diversidade (Shannon) também foram detectadas na serapilheira, com média geral de diversidade de 9,57, em relação a rizosfera e filosfera que obtiveram médias de 8,65 e 7,4, respectivamente. As estimativas de riqueza, no geral, independente da época de amostragem, foram maiores na serapilheira (5222 UTOs, em média) do que na filosfera (3145 UTOs, em média) e na rizosfera (2869 UTOs, em média) de acordo com o método Chao1 (Tabela 9).

Na rizosfera a época de amostragem não teve efeito significativo sobre os índices de diversidade e riquezas estimados, de acordo com o teste de Welch ($p > 0,05$). Já para filosfera e serapilheira, diferenças significativas nos índices de diversidade e riqueza estimados foram observados, de acordo com o teste de Welch, para Shannon ($p < 0,001$) em ambos os micro-habitats. Em fevereiro de 2016, os índices de diversidade e riqueza na filosfera foram menores em relação as outras épocas.

Tabela 9. Diversidade de UTOs de micro-organismos diazotróficos. *Teste *post-hoc* de Welch aplicado para métricas de diversidade (alfa 5%).

Época	Habitat	<i>Observed otus</i>	<i>Shannon Index*</i>	<i>Good's coverage</i>	<i>Simpson evenness</i>	<i>Chao1 Richness*</i>
jul/2015	Filosfera	1744 ± 667	7,154 ± 1,24 c	0,96 ± 0,01	0,021 ± 0,02	3179 ± 1128 b
	Serapilheira	3235 ± 1049	9,913 ± 0,44 a	0,94 ± 0,02	0,090 ± 0,04	4836 ± 1524 a
	Rizosfera	1725 ± 605	8,786 ± 0,74 b	0,96 ± 0,01	0,102 ± 0,04	2843 ± 918 c
fev/2016	Filosfera	1253 ± 443	6,837 ± 1,39 c	0,95 ± 0,02	0,029 ± 0,02	2447 ± 766 c
	Serapilheira	2840 ± 764	9,077 ± 0,85 a	0,92 ± 0,03	0,048 ± 0,03	5005 ± 1440 a
	Rizosfera	1591 ± 500	8,575 ± 0,76 b	0,94 ± 0,02	0,085 ± 0,05	2798 ± 860 b
jul/2016	Filosfera	1950 ± 590	8,194 ± 1,00 c	0,92 ± 0,02	0,040 ± 0,02	3811 ± 1144 b
	Serapilheira	3157 ± 749	9,724 ± 0,48 a	0,89 ± 0,04	0,073 ± 0,04	5826 ± 1576 a
	Rizosfera	1754 ± 1337	8,589 ± 0,72 b	0,95 ± 0,02	0,081 ± 0,04	2966 ± 2327 c

4.2.2. Estrutura das comunidades de micro-organismos diazotróficos com base no gene *nifH*

Assim como na análise de coordenadas principais com base nas sequências do gene rRNA 16S, a análise de coordenadas principais com base no gene *nifH* mostrou que a estrutura das comunidades diazotróficas são influenciadas pelo micro-habitat e a época do ano (Figura 9).

Figura 9. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade diazotrófica baseada na sequência do gene *nifH*, para todos os micro-habitats, nas três épocas de amostragem.

A ANOSIM mostrou que a estrutura das comunidades diazotróficas são altamente influenciadas pelo micro-habitat, com altos níveis de dissimilaridades (R de 0,316 a 0,687) (Tabela 10) sendo esse efeito observado para todas as épocas de amostragens, com valores globais de ANOSIM de 0,476 (jul/2015), 0,520 (fev/2016) e 0,530 (jul/2016).

O efeito da época do ano sobre as comunidades diazotróficas também foi detectado pela ANOSIM (Tabela 11), com valores de R significativos para a maioria das comparações entre épocas, exceto para rizosfera em “fev/2016 x jul/2016” ($p > 0,05$) e serapilheira em “jul/2015 x fev/2016” ($p > 0,05$) e “jul/2015 x jul/2016” ($p > 0,05$). As épocas que se mostraram mais dissimilares foram jul/2015 e fev/2016 para filofera ($R = 0,192$) e rizosfera

($R = 0,308$), enquanto para serapilheira fev/2016 e jul/2016 foram as épocas que apresentaram maior dissimilaridade ($R = 0,219$).

Os valores globais de dissimilaridade (ANOSIM) para as épocas de amostragem (0,006 a 0,308) (Tabela 11) foram menores que os observados para dissimilaridades entre micro-habitats (0,316 a 0,687) (Tabela 10), indicando que a influência do micro-habitat na modulação das comunidades diazotróficas é maior em relação a época de amostragem.

Tabela 10. ANOSIM das comunidades diazotróficas para os micro-habitats, nas três épocas.

Comparações entre micro-habitats		<i>R-value</i>	<i>P-value</i>
Jul/2015	Filosfera x Serapilheira x Rizosfera	0,476	0,0001*
	Filosfera x Serapilheira	0,548	0,0001*
	Filosfera x Rizosfera	0,544	0,0001*
	Serapilheira x Rizosfera	0,316	0,0001*
Fev/2016	Filosfera x Serapilheira x Rizosfera	0,520	0,0001*
	Filosfera x Serapilheira	0,463	0,0001*
	Filosfera x Rizosfera	0,580	0,0001*
	Serapilheira x Rizosfera	0,538	0,0001*
Jul/2016	Filosfera x Serapilheira x Rizosfera	0,530	0,0001*
	Filosfera x Serapilheira	0,481	0,0001*
	Filosfera x Rizosfera	0,517	0,0001*
	Serapilheira x Rizosfera	0,687	0,0001*

*Valores significativos para $p < 0,016$ com aplicação de correção de Bonferroni.

Tabela 11. ANOSIM das comunidades diazotróficas para os três períodos, nos três micro-habitats.

Comparações	Filosfera		Rizosfera		Serapilheira	
	<i>R-value</i>	<i>P-value</i>	<i>R-value</i>	<i>P-value</i>	<i>R-value</i>	<i>P-value</i>
Fev.2016-Jul.2015-Jul.2016	0,112	<0,0001*	0,192	<0,0001*	0,130	<0,0001*
Fev.2016-Jul.2015	0,192	<0,0001*	0,308	<0,0001*	0,063	0,025
Fev.2016-Jul.2016	0,081	0,0002*	0,006	0,18	0,219	<0,0001*
Jul.2015-Jul.2016	0,079	<0,0001*	0,286	<0,0001*	0,043	0,08

*Valores significativos para $p < 0,016$ com aplicação de correção de Bonferroni.

A análise conjunta das comunidades de micro-organismos diazotróficos mostrou que aproximadamente 1,04%, 0,96% e 0,48% de todas as UTOs detectadas na filosfera, serapilheira e rizosfera são compartilhadas nas épocas de jul/2015, fev/2016 e jul/2016,

respectivamente (Figura 10). Serapilheira e rizosfera compartilharam 16,9% das UTOs em jul/2015, enquanto nas outras épocas, o compartilhamento foi de 14% e 10% em fev/2016 e jul/2016, respectivamente. As menores proporções de UTOs compartilhadas foram detectadas entre filosfera e rizosfera, com 2,2% (em jul/2015), 0,5% (em fev/2016) e 0,2% (em jul/2016).

Na comparação entre épocas de amostragem de jul/2015, fev/2016 e jul/2016 o compartilhamento de UTOs foi de aproximadamente 26,7% na filosfera, 27% na rizosfera e 22% na serapilheira (Figura 11). As UTOs compartilhadas entre duas épocas, para os três micro-habitats, variaram de 35,9% a 45,3%, com os menores valores observados de forma consistente entre jul/2015 e fev/2016, para filosfera (39,6%), rizosfera (40%) e serapilheira (35,9%).

A época do ano demonstrou maiores proporções compartilhadas das UTOs, com média de $25,2\% \pm 2,3\%$ para UTOs compartilhadas entre as três épocas e média de $0,8\% \pm 0,2\%$ para UTOs compartilhadas entres os três micro-habitats (Figura 10 e 11).

Figura 10. Diagramas de Venn mostrando as UTOs das comunidades diazotróficas com base nas sequências do gene *nifH*, compartilhadas entre os três micro-habitats. Foram contabilizadas as UTOs presentes em 80% das amostras.

Figura 11. Diagramas de Venn mostrando as UTOs das comunidades diazotróficas com base nas sequências do gene *nifH*, entre as três épocas. Foram contabilizadas as UTOs presentes em 80% das amostras.

A análise de coordenadas principais, associada com PERMANOVA, mostrou que as estruturas das comunidades diazotróficas associadas a cada espécie vegetal, apesar disso, foram significativas (PERMANOVA, $p < 0,05$) (Figuras 12, 13 e 14). Os maiores valores de R foram observados para filosfera (Figura 12A, 12B e 12C), que representou a proporção de 26,2% (jul/2015), 21,7% (fev/2016) e 23,9% (jul/2016) de variação explicada pelo táxon vegetal. Os menores valores de R foram observados na rizosfera (Figura 13A, 13B e 13C), que foram 14% (jul/2015), 11,6% (fev/2016) e 12,3% (jul/2016). Para serapilheira foram observados valores de R similares as de rizosfera, que foram 17,9% (jul/2015), 13,7% (fev/2016) e 13,1% (jul/2016) (Figura 14A, 14B e 14C). Fevereiro de 2016 mostrou consistentemente os menores valores de R da análise, para os três micro-habitats.

Filosfera

Figura 12. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade diazotrófica baseada em sequências do gene *nifH*, para todas as espécies de árvores nas três épocas. **A.** Julho de 2015; **B.** Fevereiro de 2016; e **C.** Julho de 2016. No gráfico é apresentada a proporção de variação (R^2) explicada pelo fator, apontada pela estatística PERMANOVA. *valores significativos para ($p < 0,05$).

Rizosfera

Figura 13. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade diazotrófica baseada em sequências do gene *nifH*, para todas as espécies de árvores nas três épocas. **A.** Julho de 2015; **B.** Fevereiro de 2016; e **C.** Julho de 2016. No gráfico é apresentada a proporção de variação (R^2) explicada pelo fator, apontada pela estatística PERMANOVA. *valores significativos para ($p < 0,05$).

Serapilheira

Figura 14. Biplot de análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade diazotrófica baseada em sequências do gene *nifH*, para todas as espécies de árvores nas três épocas. **A.** Julho de 2015; **B.** Fevereiro de 2016; e **C.** Julho de 2016. No gráfico é apresentada a proporção de variação (R^2) explicada pelo fator, apontada pela estatística PERMANOVA. *valores significativos para ($p < 0,05$).

Para testar associações significativas entre os táxons bacterianos e as espécies das árvores hospedeiras, utilizou-se análise discriminante linear (LDA). Foram detectadas associações significativas entre clados filogenéticos diazotróficos e espécies de árvores, indicando maior abundância relativa de determinados clados para as amostras associadas aos táxons vegetais (Tabelas 12, 13 e 14).

As associações significativas detectadas na filosfera (Tabela 12) abrangeram 8 gêneros com 5 táxons vegetais (jul/2015), 14 gêneros com 7 táxons vegetais (fev/2016) e 16 gêneros com 7 táxons vegetais, sendo o micro-habitat que apresentou o maior número de associações, com 13 delas apresentando tamanho de efeito (LDA *score*) maior que 3,0. As associações de gêneros com táxons vegetais que persistiram mais de uma época foram detectadas para *Novosphingobium* (*Rinorea*), *Nodularia* (*Erisma*) e *Pantoea* (*Erisma*), indicando potencial maior importância na relação com o hospedeiro, devido a capacidade da associação em persistir em diferentes épocas.

Na rizosfera as associações significativas abrangeram 5 gêneros com 4 táxons vegetais (jul/2015), 2 gêneros com 2 táxons vegetais (fev/2016) e 5 gêneros com 4 táxons vegetais (Tabela 13), sendo a rizosfera o micro-habitat com o menor número de associações detectadas, dentre as quais, apenas duas apresentaram tamanho de efeito (LDA *score*) maior que 3,0. Não foi detectada nenhuma associação na rizosfera para 5 táxons vegetais (*Amphyrox*, *Manilkara*, *Miconia*, *Protium* e *Rinorea*). Os gêneros que persistiram em um mesmo táxon vegetal em diferentes épocas foram *Methylobacterium* (*Erisma*) e *Pelomonas* (*Erisma*).

As associações significativas detectadas na serapilheira (Tabela 14) abrangeram 3 gêneros com 2 táxons vegetais (jul/2015), 8 gêneros com 7 táxons vegetais (fev/2016) e 5 gêneros com 3 táxons vegetais, sendo que 12 associações apresentaram tamanho de efeito (LDA *score*) maior que 3,0. O único táxon vegetal onde não foi detectada associação significativa foi *Chamaecrista*. As associações persistentes em diferentes épocas foram dos gêneros *Paenibacillus* (*Amphyrox*) e *Pantoea* (*Aparisthmium*).

Bactérias do filo Cyanobacteria exibiram associações com táxons vegetais somente na filosfera e serapilheira, principalmente em fev/2016 e jul/2016, com jul/2015 apresentando apenas uma associação na filosfera (*Anabaena* e *Erisma*). Na serapilheira foram detectados, em fev/2016, 2 gêneros, abrangendo 2 famílias e 1 ordem, e, em jul/2016, 3 gêneros, abrangendo 3 famílias e 2 ordens. Já na filosfera foram detectadas, em fev/2016, associações de 4 gêneros, abrangendo 3 famílias e 2 ordens, e, em jul/2016 6 gêneros, abrangendo 4 famílias e 3 ordens.

Associações de táxons vegetais com a ordem Rhizobiales na filosfera e rizosfera foram observadas na maioria das épocas de amostragens, com respectivas 3 e 3 associações em jul/2015, 2 associações na filosfera em fev/2016, e respectivas 1 e 3 associações em jul/2016. Em contraste, na serapilheira apenas uma associação foi detectada em jul/2015.

Tabela 12. Associações significativas encontradas entre as espécies de árvores e os gêneros de micro-organismos na filosfera em três épocas do ano, através da análise LDA (análise discriminante linear – LefSe) (continua).

Época	Ordem	Família	Gênero	Hospedeiro	LDA Score	p-value
jul/15	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i>	3,72	0,00
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i>	2,49	0,05
	Frankiales	Frankiaceae	<i>Frankia</i>	<i>Cousarea</i>	2,40	0,05
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	<i>Erisma</i>	2,83	0,02
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Erisma</i>	2,98	0,01
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	<i>Miconia</i>	3,41	0,01
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Rinorea</i>	2,56	0,01
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	<i>Rinorea</i>	2,89	0,00
fev/16	Oscillatoriales	Nodosilinea	<i>Nodosilinea</i>	<i>Amphyrrox</i>	3,00	0,00
	Nostocales	Microchaetaceae	<i>Scytonema</i>	<i>Amphyrrox</i>	3,41	0,01
	Frankiales	Frankiaceae	<i>Frankia</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,26	0,02
	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,00	0,03
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum</i>	<i>Chamaecrista</i>	2,37	0,04
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Nodularia</i>	<i>Erisma</i>	2,66	0,02
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>Erisma</i>	3,27	0,05
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	<i>Manilkara</i>	2,57	0,00
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	<i>Protium</i>	2,38	0,04
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Raoultella</i>	<i>Protium</i>	2,26	0,03
	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>Protium</i>	3,14	0,01
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>Protium</i>	3,37	0,03
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	<i>Rinorea</i>	2,90	0,00
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	<i>Rinorea</i>	3,02	0,00

Tabela 12. Associações significativas encontradas entre as espécies de árvores e os gêneros de micro-organismos na filosfera em três épocas do ano, através da análise LDA (análise discriminante linear – LefSe) (conclusão).

Época	Ordem	Família	Gênero	Hospedeiro	LDA Score	p-value
jul/16	Clostridiales	Heliobacteriaceae	<i>Heliorestis</i>	<i>Aparisthmium</i>	2,81	0,04
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,01	0,00
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,48	0,00
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	<i>Chamaecrista</i>	2,04	0,02
	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Chamaecrista</i>	2,01	0,03
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	<i>Cousarea</i>	2,95	0,00
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Nodularia</i>	<i>Erisma</i>	2,50	0,01
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>Erisma</i>	3,79	0,00
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Nostoc</i>	<i>Erisma</i>	2,23	0,00
	Stigonematales	Mastigocladaceae	<i>Mastigocladus</i>	<i>Erisma</i>	2,77	0,02
	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Azoarcus</i>	<i>Erisma</i>	2,87	0,00
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Niveispirillum</i>	<i>Erisma</i>	2,41	0,01
	Nostocales	Microchaetaceae	<i>Tolypothrix</i>	<i>Manilkara</i>	2,10	0,01
	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Protium</i>	2,69	0,02
	Oscillatoriales	Microseira	<i>Microseira</i>	<i>Rinorea</i>	2,15	0,02
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	<i>Rinorea</i>	2,56	0,00

Tabela 13. Associações significativas encontradas entre as espécies de árvores e os gêneros de micro-organismos na rizosfera em três épocas do ano, através da análise LDA (análise discriminante linear – LefSe).

Época	Ordem	Família	Gênero	Hospedeiro	LDA Score	p-value
jul/15	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Ensifer</i>	<i>Chamaecrista</i>	2,16	0,04
	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Cousarea</i>	2,63	0,01
	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>Erisma</i>	2,45	0,02
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Azomonas</i>	<i>Erisma</i>	2,20	0,05
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	<i>Erisma</i>	3,15	0,04
fev/16	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Aparisthmium</i>	2,07	0,00
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum</i>	<i>Erisma</i>	2,78	0,01
jul/16	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	<i>Methylocapsa</i>	<i>Aparisthmium</i>	2,75	0,04
	Frankiales	Frankiaceae	<i>Frankia</i>	<i>Cousarea</i>	2,84	0,03
	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Cousarea</i>	3,64	0,02
	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	<i>Erisma</i>	2,66	0,00
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	<i>Erisma</i>	2,87	0,02

Tabela 14. Associações significativas encontradas entre as espécies de árvores e os gêneros de micro-organismos na serapilheira em três épocas do ano, através da análise LDA (análise discriminante linear – LefSe).

Época	Ordem	Família	Gênero	Hospedeiro	LDA Score	p-value
jul/15	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Amphyrrox</i>	3,00	0,05
	Clostridiales	Peptococcaceae	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>Amphyrrox</i>	2,19	0,00
	Stigonematales	Mastigocladaceae	<i>Mastigocladus</i>	<i>Erisma</i>	2,49	0,01
fev/16	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Amphyrrox</i>	3,72	0,00
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,67	0,00
	Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	<i>Cousarea</i>	3,16	0,00
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Trichormus</i>	<i>Cousarea</i>	3,15	0,01
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	<i>Erisma</i>	2,27	0,01
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Manilkara</i>	3,18	0,05
	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Manilkara</i>	3,29	0,04
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>	<i>Miconia</i>	3,37	0,00
	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	<i>Rinorea</i>	2,03	0,02
jul/16	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	<i>Amphyrrox</i>	2,33	0,00
	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Amphyrrox</i>	3,30	0,04
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,25	0,00
	Oscillatoriales	Nodosilinea	<i>Nodosilinea</i>	<i>Aparisthmium</i>	3,12	0,04
	Nostocales	Microchaetaceae	<i>Tolypothrix</i>	<i>Protium</i>	3,10	0,02

As frequências relativas dos filos diazotróficos dentro de cada micro-habitat são apresentadas na Figura 15. Em todos os micro-habitats estudados, o filo dominante foi Proteobacteria, representando na filosfera aproximadamente 79% das UTOs em jul/2015, 86% em fev/2016 e 78% em jul/2016. Na rizosfera Proteobacteria representou aproximadamente 93% das UTOs em jul/2015, 94% em fev/2016 e 93% (jul/2016), e na serapilheira 90% em jul/2015, 73,4% em fev/2016 e 82,4% em jul/2016. As classes de Proteobacteria com maior representação foram Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria. Como um todo, a abundância de Alphaproteobacteria foi maior na rizosfera (73%), em contrapartida com filosfera (40%) e serapilheira (30%). Betaproteobacteria foi mais abundante na serapilheira (37%), em contrapartida a filosfera (23%) e rizosfera (14%). Gammaproteobacteria foi menos abundante na rizosfera, para as três épocas, com frequências aproximadas de 5%, em relação a filosfera (em média, 18%) e serapilheira (em média, 13%). Deltaproteobacteria apresentou frequência relativa aproximada

de 0,5% na serapilheira em fevereiro de 2016, com frequências menores nas demais e micro-habitats.

Os maiores efeitos de grupos taxonômicos na diferenciação das comunidades diazotróficas, mensurados por η^2 (eta ao quadrado), foram observados para as classes do filo Proteobacteria, com valores de η^2 para a classe Alphaproteobacteria de 0,25 (jul/2015), 0,62 (fev/2016) e 0,81 (jul/2016). Betaproteobacteria mostrou valores de η^2 de 0,22 (jul/2015), 0,35 (fev/2016) e 0,42 (jul/2016), e Gammaproteobacteria apresentou valores de η^2 de 0,05 (jul/2015), 0,15 (fev/2016) e 0,12 (jul/2016). Essas três classes de Bacteria foram as mais relevantes na determinação das estruturas das comunidades diazotróficas nos diferentes micro-habitats.

O filo Cyanobacteria foi mais abundante na filosfera, com frequências relativas de aproximadamente (18%), em relação a serapilheira (média de 5,4%) e rizosfera (média de 1%). Cyanobacteria representou o filo mais abundante da filosfera depois de Proteobacteria, e em conjunto, representaram aproximadamente de 98,37% a 98,96% da comunidade diazotrófica da filosfera. Cyanobacteria apresentou valores significantes de η^2 , com 0,31 em jul/2015, 0,16 em fev/2016 e 0,33 em jul/2016.

Firmicutes foi detectado na serapilheira com frequência média de aproximadamente 12%, em relação a filosfera (média de 1%) e rizosfera com média de 4,66%. O filo Firmicutes representou o mais importante na serapilheira, além de Proteobacteria. Os efeitos do filo Firmicutes na estruturação das comunidades diazotróficas foram relevantes nas três épocas com valores η^2 de 0,26 em jul/2015, 0,39 em fev/2016 e 0,34 em jul/2016.

O filo Actinobacteria foi mais abundante na rizosfera, com aproximadamente 1% de frequência relativa, contra 0,6% na serapilheira e 0,2% na filosfera. Actinobacteria apresentou η^2 variando entre 0,4 e 0,6, que pode ser atribuído as suas abundâncias reduzidas na filosfera, se comparado aos outros micro-habitats.

Os filos Euryarchaeota (Archaea), Chlorobi e Spirochaetes foram detectados em menores frequências relativas, variando de 0% a 0,7% nos diferentes micro-habitats e épocas de amostragem.

Figura 15. Distribuição das frequências relativas das UTOs classificadas, obtidas das sequências de *nifH* ao nível de Classe para Proteobacteria e Filo para as demais. Foram filtrados os táxons com frequência relativa menor do que 0,5%, em qualquer época. Valores de η^2 (*eta-squared*) foram obtidos pelo teste *post-hoc* de Welch, com valores significativos para $p < 0,05$.

Os principais gêneros de bactérias simbióticas com potencial para formação de nódulos foram agrupados e computados em frequências relativas (Figura 16), sendo o grupo composto por *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Frankia*, que foram os gêneros potencialmente simbióticos com as maiores abundâncias encontradas. Os três micro-habitats mostraram níveis de abundância diferentes para os potenciais simbiontes, nas três épocas, de acordo com teste *post-hoc* de Welch ($p < 0,05$). Observou-se que nas três épocas, rizosfera mostrou as maiores abundâncias de grupos potencialmente simbiontes, representando 53,81% (jul/2015), 71,53% (fev/2016) e 73,39% (jul/2016) das UTOs. A maior variação das proporções entre as épocas foi observada na filosfera, com o menor valor em julho de 2016 ($6,03\% \pm 6,62\%$), e valores expressivamente maiores em julho de 2015 ($38,14\% \pm 27,80\%$) e fevereiro de 2016 ($47,05\% \pm 27,58\%$).

Figura 16. Frequências relativas dos gêneros de bactérias potencialmente simbiontes. *valores significativos de acordo com teste de Welch ($p < 0,05$).

4.2.3. Comparação entre os resultados obtidos para os dados de *nifH* e rRNA 16S

Com o intuito de avaliar se as comunidades de possíveis diazotróficos definidos com base na sequência dos genes rRNA 16S e *nifH* foram similares entre si, índices de diversidade e abundância de táxons estimados por ambas as metodologias, foram comparados.

Não foram incluídas nas análises comparativas as amostras analisadas por somente uma das metodologias. O número total de amostras comparadas para cada micro-habitat nas diferentes épocas são mostradas na Tabela 15.

Tabela 15. Número de comunidades de diazotróficos putativos determinadas com base nas sequências do gene rRNA 16S e *nifH* comparadas.

Época	Micro-habitat	Amostras (n)
jul/15	Filosfera	62
	Rizosfera	61
fev/16	Filosfera	66
	Rizosfera	86
	Serapilheira	81
jul/16	Filosfera	80
	Rizosfera	79
	Serapilheira	82

Os resultados das análises de diversidade para os dois métodos de estudos das comunidades diazotróficas, com base nos genes rRNA 16S e *nifH*, foram comparados e são apresentados na Tabela 16. Foram obtidas diferenças significativas para a diversidade (Shannon) das amostras de filosfera de julho de 2016 ($p < 0,05$) e rizosfera de fevereiro de 2016 ($p < 0,05$). O restante das comparações não significativas estatisticamente.

Tabela 16. Valores de p para comparações dos índices de diversidade de Shannon obtidos para as comunidades com base em 16S rRNA e *nifH*.

Comparações dos índices de diversidade				
Época	Micro-habitat	rRNA 16S	<i>nifH</i>	<i>P-value</i>
jul/15	Filosfera	7,22 ± 2,16	7,15 ± 1,27	0,83
	Rizosfera	8,64 ± 0,36	8,83 ± 0,73	0,07
fev/16	Filosfera	6,73 ± 1,43	6,84 ± 1,41	0,67
	Rizosfera	8,78 ± 0,34	8,58 ± 0,76	0,02*
	Serapilheira	9,18 ± 1,06	9,08 ± 0,85	0,52
jul/16	Filosfera	6,62 ± 1,52	8,20 ± 1,01	<0,001*
	Rizosfera	8,66 ± 0,29	8,59 ± 0,73	0,45
	Serapilheira	9,60 ± 0,86	9,72 ± 0,48	0,27

*Significativos estatisticamente para $p < 0,05$, pela análise de variância de Welch.

As frequências relativas dos táxons ao nível de classe, nas comunidades diazotróficas, determinadas com base nos genes rRNA 16S e *nifH*, foram comparadas (Figura 17). Diferenças significativas para diversas classes, em todos os micro-habitats e todas as épocas estudadas, foram detectadas. Dentre os táxons mais abundantes, poucos se mostraram com frequências estatisticamente equivalentes entre as metodologias. Bacilli mostrou equivalência em jul/15 e fev/16 na filosfera; Spirochates mostrou equivalência em fev/16 para serapilheira e rizosfera, e em jul/16 na filosfera, serapilheira e rizosfera; Alphaproteobacteria mostrou equivalência em jul/15 na filosfera; e Gammaproteobacteria mostrou equivalência em fev/2016 na filosfera.

As classes do filo Proteobacteria mostraram diferenças expressivas entre as metodologias. Deltaproteobacteria foi mais abundante dentre as sequências de rRNA 16S para todas as épocas e todos os micro-habitats. Gammaproteobacteria apresentou resultados semelhantes, exceto em fev/2016 na filosfera. Alphaproteobacteria foi mais abundante entre as sequências de *nifH*, em relação ao rRNA 16S, em todas as épocas para filosfera e rizosfera, enquanto na serapilheira foi mais abundante entre as sequências de rRNA 16S, nas duas épocas de amostragem. Betaproteobacteria foi mais abundante entre as sequências de *nifH* em todas as épocas de amostragem na rizosfera e serapilheira, enquanto que na filosfera, em duas épocas, foi mais abundante entre as sequências de rRNA 16S.

Clostridia e Bacilli também foram classes abundantes que apresentaram maiores frequências relativas entre as sequências de *nifH*, em relação a rRNA 16S, principalmente na rizosfera e serapilheira.

Filosfera 07/15

Filosfera 02/16

Figura 17. Comparações das frequências relativas das classes de possíveis diazotróficos com base em sequências dos genes rRNA 16S e *nifH* e rRNA 16S. Análise estatística feita pelo teste *post-hoc* de Welch. *valor significativo para $p < 0,05$ (continua).

Filosfera 07/16

■ rRNA16S □ *nifH*

Rizosfera 07/15

■ rRNA16S □ *nifH*

Figura 17. Comparações das frequências relativas das classes de possíveis diazotróficos com base em sequências dos genes rRNA 16S e *nifH* e rRNA 16S. Análise estatística feita pelo teste *post-hoc* de Welch. *valor significativo para $p < 0,05$ (continua).

Figura 17. Comparações das frequências relativas das classes de possíveis diazotróficos com base em sequências dos genes rRNA 16S e *nifH* e rRNA 16S. Análise estatística feita pelo teste *post-hoc* de Welch. *valor significativo para $p < 0,05$ (continua).

Figura 17. Comparações das frequências relativas das classes de possíveis diazotróficos com base em sequências dos genes rRNA 16S e *nifH* e rRNA 16S. Análise estatística feita pelo teste *post-hoc* de Welch. *valor significativo para $p < 0,05$ (conclusão).

5. DISCUSSÃO

A variação na estruturação das comunidades microbianas em diferentes compartimentos em ambientes florestais tem sido observada em vários estudos (Prescott *et al.*, 2013; Laforest-Lapointe *et al.*, 2017; Lambais *et al.*, 2014; Laforest-Lapointe *et al.*, 2016). Tais diferenças nas estruturas implicam na ocorrência de diferentes funções ecológicas nos diferentes compartimentos, com contribuições diferenciadas ao ecossistema. Portanto, a compreensão dos mecanismos que controlam a estruturação das comunidades microbianas é fundamental para entender o funcionamento dos ecossistemas. Dentre as comunidades microbianas, as de diazotróficos podem ter papel importante em florestas tropicais.

Nesse estudo, as comunidades de possíveis diazotróficos na filosfera, serapilheira e rizosfera de nove espécies de árvores da floresta Amazônica, em diferentes épocas do ano, foram avaliadas usando sequenciamento em larga escala dos genes rRNA 16S e *nifH*.

A comparação dos resultados das análises com base no sequenciamento de amplicons dos genes rRNA 16S e *nifH* permitiram conclusões gerais semelhantes acerca dos efeitos do três micro-habitats em diferentes épocas na estruturação das comunidades de possíveis diazotróficos, com base nos resultados das análises ANOSIM e PERMANOVA. No entanto, foram observadas grandes divergências na frequência de táxons detectados pelas duas metodologias. Alguns grupos microbianos apresentaram frequências divergentes com as diferentes abordagens metodológicas. Por exemplo, as classes Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria e o filo Actinobacteria foram mais abundantes nas comunidades de possíveis diazotróficos determinada pela reconstrução de metagenomas com base no gene rRNA 16S, enquanto a classe Alphaproteobacteria e o filo Clostridia foram mais frequentes nas comunidades de possíveis diazotróficos determinada pelo sequenciamento do gene *nifH*, além de diversos outros táxons que apresentaram divergências variadas entre as metodologias.

Como estudos de *nifH* estão diretamente associados à presença dos genes da nitrogenase, tais diferenças poderiam estar relacionadas a capacidade de perda de genes não utilizados pelos micro-organismos. Nesse caso, eventos de perda de genes da nitrogenase não podem ser identificados pelo sequenciamento do gene rRNA 16S. Como já foi caracterizado em alguns estudos, o cluster genético que inclui gene *nifH* possui potencial de mobilidade, que pode resultar em sua eliminação em determinadas espécies quando não utilizado (Li *et al.*, 2014). Dessa forma, a aplicação do sequenciamento de *nifH* demonstra superioridade na identificação de grupos diazotróficos específicos, busca de diversidade desconhecida, além de oferecer maior autenticidade em relação à presença da nitrogenase no ambiente.

Embora os estudos de comunidades diazotróficas através do sequenciamento de amplicons de rRNA 16S represente um método indireto de levantamento da diversidade destas comunidades, seus resultados permitiram inferências acerca da estruturação das comunidades. Com o amplo volume de dados genéticos de micro-organismos diazotróficos gerados ao decorrer dos anos, torna-se possível a criação de bancos de dados filogenéticos que associem os dois métodos e permitam inferências de padrões ecológicos.

Os resultados mostraram que as estruturas das comunidades de possíveis diazotróficos na filosfera, serapilheira e rizosfera são específicas em cada um destes micro-habitats, e variam com a época do ano, sendo que o fator mais determinante na estruturação dessas comunidades foi o micro-habitat, conforme demonstrado pelas análises de similaridade (ANOSIM). As comunidades de possíveis diazotróficos exibiram alta diversidade nos três micro-habitats avaliados, que se manteve em todos os períodos estudados. No entanto, a proporção relativa da riqueza de diazotróficos em relação à riqueza de bactérias totais não varia com o tempo. Esses dados sugerem que diferentes grupos de diazotróficos estão adaptados a diferentes ambientes, apesar da variação temporal, mas que o tamanho da comunidade em cada micro-habitat não é sensível às variações temporais. Os resultados sugerem ainda que pode haver um equilíbrio entre o *fitness* conferido pelo traço adaptativo (i.e., síntese da nitrogenase) com as necessidades do nicho, que aliado a alta diversidade, leva a estabilidade da função ecossistêmica (FBN), como previsto pelos modelos ecológicos apresentados por Tilman (1999), e experimentado em ensaios por Fernandez et al (1999). Há de se considerar, no entanto, que embora estes micro-organismos apresentem o gene *nifH*, nem todos necessariamente são capazes de fixar nitrogênio (Menge *et al.*, 2009).

Entre os micro-habitats, os mais similares em termos de estrutura de comunidades diazotróficas, ao longo das épocas, foram filosfera e serapilheira. Esses dois micro-habitats foram mais congruentes quando considerada a composição e abundância dos táxons mais dominantes, com valores de ANOSIM mais próximos em duas épocas de amostragem. Também compartilharam maior quantidade de táxons, de acordo com a análise dos táxons compartilhados em pelo menos 80% das amostras, que potencialmente representam micro-organismos ecologicamente de maior importância funcional no micro-habitat. Embora espacialmente muito mais próxima de rizosfera no estrato vertical, a serapilheira parece oferecer condições seletivas ao microbioma mais próximas das oferecidas pela filosfera. Isto pode estar relacionado ao fato de a serapilheira receber constantemente material vegetal e seus microbiomas, em decorrência da senescência, ação mecânica de chuva ou outros eventos que levem à perda de folhas.

Neste estudo, foi confirmado mais uma vez, a dependência da estruturação das comunidades de dizotróficos na filosfera em relação ao táxon da planta. Estudos anteriores já haviam demonstrado o papel do genótipo vegetal na estruturação de comunidades bacterianas e de cianobactérias na Mata Atlântica (Lambais *et al.*, 2014; Rigonato *et al.*, 2016) e em floresta temperada (Laforest-Lapointe *et al.*, 2016). No entanto, na Amazônia, o efeito do táxon vegetal na estruturação de comunidades diazotróficas ainda não havia sido investigado. O maior efeito do táxon vegetal foi observado para filosfera, demonstrado pela análise PERMANOVA. As análises de biomarcadores (LEfSe), com base em sequências do gene *nifH*, mostraram a existência de gêneros bacterianos associados às diferentes espécies vegetais, para os três micro-habitats. Tais associações são possivelmente resultante da pressão de seleção exercida pelo genótipo da planta. Importantes promotores de crescimento associados às espécies vegetais foram identificados, dentre eles *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Bacillus* e *Rhizobium*, que são gêneros diazotróficos amplamente estudados (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Na filosfera, OTUs afiliadas a *Pantoea*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium* e *Methylobacterium* apresentaram associações significativas com as espécies vegetais, e já foram reportadas como membros do microbioma *core* da filosfera de diversas espécies, como soja, trevo, populações selvagens de *Arabidopsis thaliana* e amostras envolvendo 11 famílias de plantas (Bulgarelli *et al.*, 2013; Delmotte *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 1998). *Pantoea* é um potencial agente de controle contra patógenos de folhas, como já relatado, com a produção de antibiótico (fenazina) e antagonismo a *Erwinia amylovora* (patógeno foliar comum em culturas de maçãs) (Giddens *et al.*, 2003). Membros do gênero *Sphingomonas*, também podem contribuir para a saúde da planta, como evidenciado pela supressão do patógeno foliar *Pseudomonas syringae* em condições laboratoriais (Innerebner *et al.*, 2011). A metilotrofia de *Methylobacterium* é um metabolismo altamente propício à colonização da filosfera, que utiliza o metanol, um produto secundário do metabolismo da parede celular de plantas (Delmotte *et al.*, 2009), e já foi demonstrada a vantagem competitiva do gênero no processo de colonização (Sy *et al.*, 2005), caracterizando *Methylobacterium* como um promotor de crescimento com grande potencial de associação na filosfera.

Na filosfera de *Rinorea*, uma espécie bastante abundante no sub-bosque da floresta Amazônica que apresenta elevadas taxas de FBN, *Novosphingobium* foi um gênero bastante frequente (presente em três épocas de amostragem). Esse gênero, além de fixar nitrogênio, é caracterizado como produtor de potenciais promotores de crescimento (Matsuyama *et al.*, 2003), degradação de lignina e celulose (Aylward *et al.*, 2013) e degradação de compostos

aromáticos (Liu *et al.*, 2005). Tais características de *Novosphingobium* propiciam a colonização epifítica e podem auxiliar no crescimento da planta na floresta. Tais associações encontradas na filosfera evidenciam a existência de uma gama diversa de promotores de crescimento, que possivelmente estariam estabelecendo relação de benefícios mútuos entre planta e micro-organismos.

Na serapilheira também foram observadas associações entre gêneros de possíveis diazotróficos e táxons vegetais, com exceção de *Chamaecrista*, de acordo com a análise dos genes *nifH*. Bactérias do filo Cyanobacteria, principalmente da ordem Nostocales (grupo também com grande presença na filosfera) apresentaram o maior número de associações no micro-habitat, o que pode ser indicativo da influência da filosfera. Nostocales é composto por diversas espécies consideradas importantes fixadoras de N em ambientes terrestres (e.g. florestas boreais e ambientes áridos) (Belnap, 2002; DeLuca *et al.*, 2008). Nesse contexto, de 17 associações encontradas na serapilheira, 11 são comuns à filosfera.

Na rizosfera, as associações entre micro-organismos e táxons vegetais foram majoritariamente identificadas envolvendo grupos de Rhizobia, de acordo com a análise dos genes *nifH*, que são reconhecidos promotores de crescimento, mesmo de forma assimbiótica (Antoun *et al.*, 1998; Fry, 1989). O número de associações observado na rizosfera foi menor do que na filosfera e serapilheira e, além disso, cinco dos nove táxons vegetais estudados não apresentaram associações significativas. Tais resultados sugerem menor pressão seletiva do genótipo da planta sobre os micro-organismos diazotróficos na rizosfa, se comparado aos outros micro-habitats. Nesse sentido, também pôde ser observado menor variação das comunidades diazotróficas na rizosfera explicada pelas espécies de plantas, de acordo com a análise PERMANOVA. É possível que na rizosfera a FBN assimbiótica seja menos determinante para a sobrevivência dos micro-organismos, já que normalmente, a abundância de N é maior nesse ambiente, se comparado à filosfera e serapilheira (Hedin *et al.*, 2009).

Bactérias com potencial para a formação de simbioses (rizóbios e Frankia) demonstraram presença marcante na rizosfera e filosfera. Mesmo quando não estão associadas em nódulos nas raízes, estes grupos são reportados como importantes bactérias promotoras de crescimento para plantas, sejam leguminosas ou não (Antoun *et al.*, 1998). Aliado a esse contexto, bactérias diazotróficas são reconhecidamente importantes produtores de auxina, o que favorece a colonização da filosfera, por facilitar a liberação de nutrientes pela parede celular da planta (Fry, 1989), além de ser um fitormônio que pode agir como molécula sinalizadora em interações entre micro-organismo e plantas (Spaepen & Vanderleyden, 2011). Já foi demonstrado, em estudo de campo, que a FBN por rizóbios pode ser importante para as

plantas, mesmo que ocorra de forma epifítica, em locais distantes da raiz (Nandi *et al.*, 1982), e que algumas linhagens de *Rhizobium* poderiam fixar nitrogênio assimbioticamente (Oliveira-Longatti *et al.*, 2013). No entanto, poucos estudos reportam essa capacidade de *Rhizobia* fixar nitrogênio assimbioticamente, e sua relevância em ecossistemas naturais.

Filosfera e serapilheira, em relação a rizosfera, apresentaram maiores proporções relativas de bactérias diazotróficas em relação a bactérias totais, e maior seletividade associada ao táxon vegetal. Tais constatações podem estar ligadas a maior demanda por N nesses micro-habitats. A filosfera é um ambiente oligotrófico e suscetível a grandes variações na disponibilidade de nutrientes (Vorholt, 2012; Remus-emsermann *et al.*, 2010), enquanto a serapilheira possui conteúdo de C alto em relação ao N, devido à constante deposição de resíduos vegetais (Urbanová *et al.*, 2015). A maior demanda de N destes micro-habitats e possível regulação favorável à FBN, pode representar uma importante dinâmica de entrada de N em ecossistemas tropicais, que poderia estar associada ao seu elevado acúmulo nesses ambientes.

6. CONCLUSÕES

A estrutura das comunidades diazotróficas da filosfera, rizosfera e serapilheira variam com a época do ano. Que demonstra que estas comunidades são sensíveis às flutuações das condições no tempo.

A filosfera, serapilheira e rizosfera modularam diferencialmente as comunidades diazotróficas, selecionando grupos específicos de micro-organismos. Sendo a modulação ocasionada pelo micro-habitat maior do que a modulação temporal.

A proporção de bactérias possivelmente diazotróficas em relação à comunidade total de bactérias na filosfera, serapilheira e rizosfera não apresenta relevante variação temporal, apesar das variações nas estruturas das comunidades, sugerindo a existência de altos níveis de redundância na FBN.

O táxon vegetal determina a estruturação das comunidades diazotróficas, com o maior efeito na filosfera, comparada com serapilheira e rizosfera.

As abordagens metodológicas com base nos sequenciamentos dos genes *nifH* e rRNA 16S permitiram as mesmas inferências gerais acerca dos padrões de estruturação das comunidades de possíveis diazotróficos, porém grandes divergências nas abundâncias dos táxons foram observadas.

REFERÊNCIAS

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–10.
- Anderson, Marti J. (2001). "A new method for non-parametric multivariate analysis of variance". *Austral Ecology*. 26 (1): 32–46.
- Ando, S., Goto, M., Meunchang, S., Thongra-ar, P., Fujiwara, T., Hayashi, H., & Yoneyama, T. (2005). Detection of *nifH* Sequences in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 51(2), 303–308.
- Antoun, R., Beauchamp, C. J., Goussard, N., & Chabot, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) *Plant Soil* 204, 57–67.
- Atamna-Ismaeel, N., Finkel, O., Glaser, F., von Mering, C., Vorholt, J. A., Koblížek, M., ... Bèjà, O. (2012). Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environmental Microbiology Reports*, 4(2), 209–216.
- Austin O., A. T., & Sala. (2002). Carbon and nitrogen dynamics across a natural precipitation gradient in Patagonia, Argentina. *Journal of Vegetation Science*, 13(3), 351–360.
- Aylward, F. O., McDonald, B. R., Adams, S. M., Valenzuela, A., Schmidt, R. A., Goodwin, L. A., ... Poulsen, M. (2013). Comparison of 26 *Sphingomonad* Genomes Reveals Diverse Environmental Adaptations and Biodegradative Capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3724–3733.
- Ayres, E., Steltzer, H., Simmons, B. L., Simpson, R. T., Steinweg, J. M., Wallenstein, M. D., ... Wall, D. H. (2009). Home-field advantage accelerates leaf litter decomposition in forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(3), 606–610.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233–266.
- Baldrian, P. (2017). Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 109–130.
- Baldrian, P. (2017). Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest soils. *Current Opinion in Microbiology*, 37(Box 1), 128–134.
- Barron, A. R., Wurzbarger, N., Bellenger, J. P., Wright, S. J., Kraepiel, A. M. L., & Hedin, L. O. (2009). Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nature Geoscience*, 2(1), 42–45.
- Barron, A. R., Purves, D. W., & Hedin, L. O. (2011). Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. *Oecologia*, 165(2), 511–520.

- Belnap, J. (2002). Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biology and Fertility of Soils*, 35(2), 128–135.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486.
- Bluman, A.G. (2007) *Elementary statistics: A step by step approach* (6th edition), McGraw Hill Higher Education, New York, New York.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807–838.
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D. B., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2011). Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108(34), 14288–14293.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Publishing Group*, 7(5), 335–336.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), 1621–1624.
- Ceuppens, S., Delbeke, S., De Coninck, D., Boussemaere, J., Boon, N., & Uyttendaele, M. (2015). Characterization of the bacterial community naturally present on commercially grown basil leaves: Evaluation of sample preparation prior to culture-independent techniques. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 10171–10197.
- Chang, W. S., Van De Mortel, M., Nielsen, L., De Guzman, G. N., Li, X., & Halverson, L. J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8290–8299.
- Chan KG, Atkinson S, Mathee K et al. (2011) Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiol* 11: 51.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, Oxford, v. 11, p. 265-270.
- Chao, A. and Lee, S.-M. (1992). Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* 87, 210-217.
- Chave, J., Navarrete, D., Almeida, S., Álvarez, E., Aragão, L. E. O. C., Bonal, D., ... Malhi, Y. (2010). Regional and seasonal patterns of litterfall in tropical South America. *Biogeosciences*, 7(1), 43–55.

- Clarke, K. R. (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, Caberra, v. 18, p.117-143.
- Clarke, K. R.; Gorley, R. N. (2006). *PRIMER 6.0: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (1999). Global patterns of terrestrial biological nitrogen fixation in natural ecosystems.pdf, 13(2), 623–645.
- Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2006). Nutrient additions to a tropical rain forest drive substantial soil carbon dioxide losses to the atmosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10316–10321.
- Cornwell, W. K., Cornelissen, J. H. C., Amatangelo, K., Dorrepaal, E., Eviner, V. T., Godoy, O., ... Westoby, M. (2008). Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecology Letters*, 11(10), 1065–1071.
- Cusack, D. F., Chou, W. W., Yang, W. H., Harmon, M. E., & Silver, W. L. (2009). Controls on long-term root and leaf litter decomposition in neotropical forests. *Global Change Biology*, 15(5), 1339–1355.
- Dawkins, R. (1982). *The extended phenotype*. Oxford University Press, New York, New York, USA
- da Rocha, H., Goulden, M., Miller, S. D., Menton, M. C., Pinto, L. D. V. O., de Freitas, H. C., & Silva-Figueira, A. M. E. (2004). Seasonality of water and heat fluxes over a tropical forest in eastern Amazonia. *Ecological Applications*, 14(4), S22–S32.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., ... Vorholt, J. A. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16428–16433.
- DeLuca, T. H., Zackrisson, O., Gundale, M. J., & Nilsson, M. C. (2008). Ecosystem feedbacks and nitrogen fixation in boreal forests. *Science*, 320(5880), 1181.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069–5072.
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621–631.
- Doornbos, R. F., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227–243.
- Douglas, A. E., & Werren, J. H. (2016). Holes in the hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts. *mBio*, 7(2), 1–7.
- Duffy BK (2001) Competition. *Encyclopedia of Plant Pathology* (Maloy OC & Murray TD, eds), pp. 243–244. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461.

Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Meth* 10:996-998.

Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31(21), 3476–3482.

Effmert U, Kalderas J, Warnke R & Piechulla B (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol* 38: 665–703.

Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, 10(1), 1–9.

Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., & Tiedje, J. (1999). How Stable Is Stable? Function versus Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3370–3697.

Fibach-Paldi, S., Burdman, S. & Okon, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326, 99–108 (2012).

Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*.

Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, A. (2011). Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 583–609.

Fry, S. C. (1989). Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. *Physiologia Plantarum*, 75(4), 532–536.

Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2012). A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase. *PLoS ONE*, 7(7), e42149.

Gaby, J. C. & D. H. Buckley. (2015). Assessment of nitrogenase diversity in the environment. In: F. J. de Bruijin (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. Wiley/Blackwell, New York.

Gaby, J. C., Rishishwar, L., Valderrama-Aguirre, L. C., Green, S. J., Valderrama-Aguirre, A., Jordan, I. K., & Kostka, J. E. (2017). Diazotroph community characterization via a high-throughput *nifH* amplicon sequencing and analysis pipeline. *Applied and Environmental Microbiology*, (November), AEM.01512-17.

Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., ... Vörösmarty, C. J. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry* (Vol. 70).

- Giddens, S. R., Houlston, G. J., & Mahanty, H. K. (2003). The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of *Pantoea agglomerans* (Erwinia herbicola) Eh1087 and *Erwinia amylovora* in planta. *Environmental Microbiology*, 5(10), 1016–1021.
- Goulden, M. L., Miller, S. D., Da Rocha, H. R., Menton, M. C., De Freitas, H. C., Michela, A., ... Sousa, D. (2004). Diel and Seasonal Patterns of Tropical Forest Co₂ Exchange. *Ecological Applications*, 14(4), 42–54.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395–412.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598.
- Hedin, L. O., Brookshire, E. N. J., Menge, D. N. L., & Barron, A. R. (2009). The Nitrogen Paradox in Tropical Forest Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 613–635.
- Hicks, W. T., Harmon, M. E., & Myrold, D. D. (2003). Substrate controls on nitrogen fixation and respiration in woody debris from the Pacific Northwest, USA. *Forest Ecology and Management*, 176(1–3), 25–35.
- Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., & Young, I. M. (2009). Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321(1–2), 117–152.
- Högberg, M. N., Briones, M. J. I., Keel, S. G., Metcalfe, D. B., Campbell, C., Midwood, A. J., ... Högberg, P. (2010). Quantification of effects of season and nitrogen supply on tree below-ground carbon transfer to ectomycorrhizal fungi and other soil organisms in a boreal pine forest. *New Phytologist*, 187(2), 485–493.
- Hottes, A. K., Freddolino, P. L., Khare, A., Donnell, Z. N., Liu, J. C., & Tavazoie, S. (2013). Bacterial Adaptation through Loss of Function. *PLoS Genetics*, 9(7).
- Houlton, B. Z., Wang, Y.-P., Vitousek, P. M., & Field, C. B. (2008). A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, 454(7202), 327–330.
- Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – (2017).
- Innerebner, G., Knief, C., & Vorholt, J. A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3202–3210.
- Jacobs, J. L., Carroll, T. L., & Sundin, G. W. (2005). The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microbial Ecology*, 49(1), 104–113.
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil*, 321(1–2), 5–33.

- Kalyuzhnaya, M. G., Hristova, K. R., Lidstrom, M. E., & Chistoserdova, L. (2008). Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of Burkholderiales: Implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3817–3823.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic Acids, Sugars, and -Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250–256.
- Kim, H., Nishiyama, M., Kunito, T., Senoo, K., Kawahara, K., Murakami, K., & Oyaizu, H. (1998). High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *Journal of Applied Microbiology*, 85(4), 731–736.
- Kim, M., Singh, D., Lai-Hoe, A., Go, R., Rahim, R. A., Ainuddin, A. N., ... Adams, J. M. (2012). Distinctive Phyllosphere Bacterial Communities in Tropical Trees. *Microbial Ecology*, 63(3), 674–681.
- Knoll, D., & Schreiber, L. (1998). Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: Wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by organisms. *New Phytologist*, 140(2), 271–282.
- Koskiniemi, S., Sun, S., Berg, O. G., & Andersson, D. I. (2012). Selection-driven gene loss in bacteria. *PLoS Genetics*, 8(6), 1–7.
- Laforest-Lapointe, I., Paquette, A., Messier, C., & Kembel, S. W. (2017). Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature*, 546(7656), 145–147.
- Lakens, D. (2013). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: A practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in Psychology*, 4(NOV), 1–12.
- Lambais, M. R., Barrera, S. E., Santos, E. C., Crowley, D. E., & Jumpponen, A. (2016). Phyllosphere Metaproteomes of Trees from the Brazilian Atlantic Forest Show High Levels of Functional Redundancy. *Microbial Ecology*, 73(1), 123–134.
- Lambais, M. R., Lucheta, A. R., & 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), 567–574.
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821.
- Liesak, W., Stackebrandt, E., Liesack, W., & Stackebrandt, E. (1992). Occurrence of novel groups of the domains Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol*, 174(15), 5072–5078.
- Li, X., Deng, Z., Liu, Z., Yan, Y., Wang, T., Xie, J., ... Chen, S. (2014). The genome of *Paenibacillus sabinae* T27 provides insight into evolution, organization and functional elucidation of *nif* and *nif*-like genes. *BMC Genomics*, 15(1), 1–14.

- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883.
- Liu, Z. P., Wang, B. J., Liu, Y. H., & Liu, S. J. (2005). *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1229–1232.
- Lozupone, C. A.; Hamady, M; Kelley, S. T.; Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (5): 1576–85.
- Lugtenberg B. & Kamilova F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63: 541–556.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), 209–220.
- Marcell, L. M., & Beattie, G. a. (2002). Effect of leaf surface waxes on leaf colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI, 15(12), 1236–1244.
- Martinez-Romero E (2006) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes*, vol 1, pp 793–817.
- Matulich, K. L., & Martiny, J. B. H. (2015). Microbial composition alters the response of litter decomposition to environmental change. *Ecology*, 96(1), 154–163.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., ... Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332(6033), 1097–1100.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663.
- Menge, D., & Hedin, L. (2009). Nitrogen Fixation in Different Biogeochemical Niches along a 120 000-Year Chronosequence in New Zealand. *Ecology*, 90(8), 2190–2201.
- Menge, D. N. L., Levin, S. A., & Hedin, L. O. (2009). Facultative versus Obligate Nitrogen Fixation Strategies and Their Ecosystem Consequences. *The American Naturalist*, 174(4), 465–477.
- Mercier, J., & Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 369–374.
- Mirza, B. S., Potisap, C., Nüsslein, K., Bohannan, B. J. M., & Rodrigues, J. L. M. (2014). Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the amazon rainforest. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 281–288.

- Matsuyama, H., Kamesaki, T., Sasaki, R., Minami, H., & Yumoto, I. (2003). Production of Two Types of Exopolysaccharide by *Novosphingobium rosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(2), 152–156.
- Morris CE, Kinkel LL, Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ. (2002) Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. In: Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ, editors. *Phyllosphere microbiology*. p. 365–75.
- Müller, D. B., Schubert, O. T., Röst, H., Aebersold, R., & Vorholt, J. A. (2016). Systems-level Proteomics of Two Ubiquitous Leaf Commensals Reveals Complementary Adaptive Traits for Phyllosphere Colonization. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(10), 3256–3269.
- Nandi, A. S., Sengupta, B., & Sen, S. P. (1982). Utility of *Rhizobium* in the phyllosphere of crop plants in nitrogen-free sand culture, 167–171.
- Nepstad, D. C. (2002). The effects of partial throughfall exclusion on canopy processes, aboveground production, and biogeochemistry of an Amazon forest. *Journal of Geophysical Research*, 107(D20), 8085.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 29–34.
- Oksanen, J. et al. The vegan package. *Community Ecology Package* 10, 631–637 (2007).
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252–263.
- Oliveira-Longatti, S. M. De, Marra, L. M., & Moreira, F. M. D. S. (2013). Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. *African Journal of Microbiology Research*, 7(11), 948–959.
- Pajares, S., & Bohannan, B. J. M. (2016). Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 1–20.
- Parks, D. H., & Beiko, R. G. (2010). Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*, 26(6), 715–721.
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123–3124.
- Pérez-Pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., & González, B. (2012). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environmental Microbiology*, 14(5), 1091–1117.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799.
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C. M., ... Maron, P.-A. (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal*, 7(8), 1609–1619.

- Poly, F., Monrozier, L. J., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95–103.
- Prescott, C. E., & Grayston, S. J. (2013). Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management*, 309, 19–27.
- Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Schlöter, M., Pecyna, M. J., Kapturska, D., ... Buscot, F. (2016). Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. *Molecular Ecology*, 25(16), 4059–4074.
- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; <http://www.R-project.org/> (Vienna, Austria, 2013).
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541–554.
- Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2007). Controls over leaf litter and soil nitrogen fixation in two lowland tropical rain forests. *Biotropica*, 39(5), 585–592.
- Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2011). Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 489–512.
- Reed, S. C., Townsend, A. R., Cleveland, C. C., & Nemergut, D. R. (2010). Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia*, 164(2), 521–531.
- Remus-Emsermann, M. N. P., Tecon, R., Kowalchuk, G. A., & Leveau, J. H. J. (2012). Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere. *The ISME Journal*, 6(4), 756–765.
- Remus-Emsermann, M. N., & Leveau, J. H. (2010). Linking environmental heterogeneity and reproductive success at single-cell resolution. *The ISME Journal*, 4(2), 215–222.
- Rigonato, J., Gonçalves, N., Andreote, A. P. D., Lambais, M. R., & Fiore, M. F. (2016). Estimating genetic structure and diversity of cyanobacterial communities in Atlantic forest phyllosphere. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(11), 953–960.
- Robson, R. L., & Postgate, J. R. (1980). Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Review of Marine Science*, 34, 183–207.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Schlaeppli, K., & Bulgarelli, D. (2015). The Plant Microbiome at Work. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 212–217.

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541.
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6).
- Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4–12.
- Silver, W. L., Lugo, a E., & Keller, M. (1999). Soil oxygen availability and biogeochemical cycling along elevation and topographic gradients in Puerto Rico. *Biogeochemistry*, 44, 301–328.
- Simpson F. B., & Burris R. H., (1984). A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* 224:1095–97.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), 1–13.
- Stock, W. D., and O. A. M. Lewis. (1986). Soil nitrogen and the role of fire as a mineralizing agent in a South African coastal fynbos ecosystem. *Journal of Ecology* 74 : 317–328.
- Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M. B., Burgess, R., & Baldrian, P. (2012). Cellulose utilization in forest litter and soil: Identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 735–746.
- Sy, A., Timmers, A. C. J., Knief, C., & Vorholt, J. a. (2005). Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7245–52.
- Talbot, J. M., & Treseder, K. K. (2011). Ecology: Dishing the dirt on carbon cycling. *Nature Climate Change*, 1(3), 144–146.
- Temme, K., Zhao, D., & Voigt, C. A. (2012). Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18), 7085–7090.
- Tilman, D. (1999). The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles. *Ecology*, 80(5), 1455–1474.
- Urbanová, M., Šnajdr, J., & Baldrian, P. (2015). Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 53–64.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206.

- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016). The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47(1), 1–24.
- Veen, G. F. C., Freschet, G. T., Ordonez, A., & Wardle, D. A. (2015). Litter quality and environmental controls of home-field advantage effects on litter decomposition. *Oikos*, 124(2), 187–195.
- Vitousek, P. M., & Field, C. B. (1999) Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: a simple model and its implications. *Biogeochemistry* 46: 179–202
- Vitousek, P. M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., ... Sprent, J. I. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57–58(McKey 1994), 1–45.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828–840.
- Wagg C., Jansa J., Schmid B. & van der Heijden MGA (2011) Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecol Lett* 14: 1001–1009.
- Wilson, M., & Lindow, S. E. (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4468–4477.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., & Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol*, 5(7), 539–554.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614–620.