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

Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica

Winston Franz Rios Ruiz

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

Winston Franz Rios Ruiz
Bachiller en Ciencias Biológicas
Licenciado en Ciencias Biológicas

Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

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

Rios-Ruiz, Winston Franz

Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica / Winston Franz Rios-Ruiz. - - Piracicaba, 2010.
108 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Biogeografia 3. Distribuição espacial 4. Ecologia microbiana 5. Ecossistemas Florestas tropicais I. Título

CDD 576.15
R586b

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

OFEREÇO

Aos meus pais,
Josias e Luzdina

À minha esposa Beatriz,
à minha filha Natalie
e ao meu filho Franz

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP e à Coordenação do PPG Microbiologia Agrícola por me conceder a oportunidade para realizar o Curso.

À Universidade Nacional de San Martín – Tarapoto, Perú, pela disponibilidade para a realização da minha capacitação.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação, confiança e apoio ao longo do Curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e ao CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do Projeto.

Aos meus pais Josias e Luzdina, exemplos de valor e sacrifício, pela força moral.

À minha esposa Beatriz, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência dedicados.

À minha filha Natalie e ao meu filho Franz, pela alegria e estímulo.

Aos meus familiares, que sempre estiveram pendentes de nós.

Aos professores, pelos seus ensinamentos.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia Molecular e Microbiologia da ESALQ, Wladimir, Denise e Fernando, pela ajuda e amizade.

Aos colegas e amigos do laboratório, pelos momentos de trabalho, companheirismo e diversão: Adriano, Alice, Elisa, Gisele, Giselle, Joze, Kelly, Maryeimy, Rafael D., Rafael V., Sandra, Silvia, Thiago e Vivian.

Aos doutores, Carolina, Eder, Lucas, Marcio, Robinson e Soraya.

A todas e cada uma das pessoas que fizeram possível a culminação do presente trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Revisão bibliográfica	15
2.1.1 Microbiologia da filosfera	15
2.1.1.1 A filosfera como habitat para os microrganismos	15
2.1.1.2 Diversidade de bactérias na filosfera	20
2.1.2 Biogeografia de populações microbianas	24
2.1.3 A Mata Atlântica	27
2.2 Material e Métodos	31
2.2.1 Áreas de estudo e amostragem	31
2.2.1.1 Parque Estadual Carlos Botelho (PECB)	32
2.2.1.2 Parque Estadual Ilha do Cardoso (PEIC)	34
2.2.1.3 Estação Ecológica de Assis (EEA)	36
2.2.2 Análise da estrutura de comunidades de <i>Bacteria</i> por DGGE	41
2.2.2.1 Extração de DNA genômico da filosfera	41
2.2.2.2 PCR-DGGE	42
2.2.2.3 Análise dos padrões de bandas gerados por DGGE	42
2.2.3 Análise de comunidades de <i>Bacteria</i> através de sequenciamento de clones do gene rRNA 16S	43
2.2.3.1 Seleção das amostras	43
2.2.3.2 Amplificação da região V1 – V3 do gene rRNA 16S	44
2.2.3.3 Purificação dos amplicons	44
2.2.3.4 Clonagem dos amplicons do gene rRNA 16S	44
2.2.3.5 Extração do DNA plasmidial	45
2.2.3.6 Sequenciamento de clones do gene rRNA 16S	46
2.2.3.7 Análise das sequências do gene rRNA 16S	46
2.3 Resultados e Discussão	47

2.3.1 Estrutura da comunidade bacteriana da filosfera	47
2.3.2 Variação espacial da estrutura das comunidades bacterianas da filosfera	50
2.3.3 Relação espaço temporal entre comunidades de bactérias da filosfera	55
2.3.4 Sequenciamento de clones do gene rRNA 16S	59
2.3.4.1 Afiliação filogenética de sequências dos clones do gene rRNA 16S	59
2.3.4.2 Estimativas de riqueza e índices de diversidade	77
2.3.4.3 Distribuição espaço temporal de UTOs da filosfera	85
3 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	105

RESUMO

Biogeografia de bactérias da filosfera de *Maytenus robusta* na Mata Atlântica

A biogeografia estuda a distribuição dos organismos em relação ao espaço e ao tempo, favorecendo a compreensão dos mecanismos que geram e mantêm a diversidade, especiação, extinção e dispersão das espécies. Dentre as florestas tropicais, a Mata Atlântica constitui um mosaico vegetal de grande diversidade, onde a filosfera representa um dos habitats mais comuns para os microrganismos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estrutura e diversidade da comunidade bacteriana da filosfera de *Maytenus robusta* no Parque Estadual Carlos Botelho, Parque Estadual Ilha do Cardoso e Estação Ecológica de Assis, no estado de São Paulo, Brasil. As folhas foram coletadas em duas épocas do ano, seca e chuvosa. A estrutura da comunidade bacteriana foi avaliada através de PCR-DGGE da região V3 do gene rRNA 16S e a diversidade por sequenciamento da região V1-V3 do mesmo gene. A similaridade entre a estrutura de comunidades de *Bacteria* foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel após PCR-DGGE. O agrupamento hierárquico gerado com o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA mostrou a existência de comunidades bacterianas distintas na filosfera de *M. robusta* nas áreas amostradas. A existência de padrões biogeográficos foi determinada através de análises de regressão, usando os dados de similaridade da estrutura das comunidades bacterianas e os de distância geográfica entre as árvores amostradas. A correlação negativa observada nas avaliações fornece evidências para suportar a hipótese de que a similaridade entre as comunidades bacterianas da filosfera de plantas da mesma espécie diminui com o aumento da distância entre as árvores, dentro de um mesmo bioma. A avaliação espaço temporal da composição da comunidade bacteriana, realizada pela análise NMDS, demonstrou que houve efeito espacial mas no temporal na estrutura das comunidades bacterianas da filosfera de *M. robusta*. A afiliação taxonômica de 1.470 sequências de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria*, obtidas da filosfera de *M. Robusta*, nas diferentes áreas e épocas, e a comparação múltipla das bibliotecas, mostraram que as comunidades bacterianas na filosfera foram distintas umas das outras, sendo os filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria* os mais frequentes. Somente 1% das Unidades Taxonômicas Operacionais foram comuns entre os indivíduos avaliados. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que, em cada bioma, plantas da mesma espécie possuem comunidades bacterianas únicas, sugerindo a existência de endemismo, altos níveis de especiação e baixa dispersão das comunidades bacterianas nas áreas avaliadas.

Palavras-chave: Ecologia microbiana; Diversidade de bactérias; Endemismo; Ecossistemas; Distribuição espacial; Floresta tropical

ABSTRACT

Biogeography of bacteria from the phyllosphere of *Maytenus robusta* in the Atlantic Forest

Biogeography studies the distribution of organisms in relation to space and time, favoring the understanding of the mechanisms that generate and keep the diversity, speciation, extinction and dispersion of species. Among the tropical forests, the Atlantic Forest constitutes a highly diverse vegetation mosaic, in which the phyllosphere represents one of the most common habitats for microorganisms. The goal of this work was to evaluate the structure and diversity of the bacterial community from the phyllosphere of *Maytenus robusta* in the Carlos Botelho State Park, Ilha do Cardoso State Park and Assis Ecologic Station, São Paulo state, Brazil. The leaves were collected in two different seasons of the year, dry season and rainy season. The structure of the bacterial community was evaluated through PCR-DGGE of the 16S rRNA gene V3 region, and the diversity by sequencing of the V1-V3 region of the same gene. The similarities between the structures of the bacterial community were determined based on the presence or absence of bands detected in the gels after PCR-DGGE. The hierarchical clustering generated using the Jaccard coefficient and the UPGMA method showed the existence of distinct bacterial communities in the *M. robusta* phyllosphere of the sampled areas. The existence of biogeographic patterns was determined through regression analyses, using the community structure similarity data geographic distance among the sampled trees. The negative correlation observed in most of the cases provides evidence to support the hypothesis that the similarity between the bacterial communities from phyllosphere of plants of the same species decreases as the distance among trees increased, within the same biome. The spacial-temporal evaluation of the structure of the bacterial communities, performed by the NMDS analyses, showed the occurrence of spacial but not temporal effects on the structure of the bacterial communities of *M. robusta* phyllosphere. The taxonomic affiliation of 1,470 bacterial 16S rRNA gene clones obtained from the *M. robusta* phyllosphere, in different areas and seasons, as well as the multiple comparisons of libraries showed that the bacterial communities in the phyllosphere were distinct from each other, and that *Proteobacteria* and *Acidobacteria* phyla were the most frequent. Only 1% of the bacterial Operational Taxonomic Units were common among the individuals evaluated. Based on the results obtained it is possible to conclude that, in each biome, plants of same species have unique bacterial communities, suggesting the existence of endemism, high levels of speciation and low dispersal of bacterial communities in the evaluated areas.

Keywords: Microbial Ecology; Bacterial Diversity; Endemism; Ecosystems; Spatial Distribution; Rainforest

1 INTRODUÇÃO

A biogeografia estuda a distribuição geográfica dos seres vivos através do espaço e do tempo, buscando entender os padrões de organização espacial e os processos que levam a tais disposições geográficas. Organismos restritos a uma região são considerados endêmicos, enquanto que os de uma ampla distribuição são designados cosmopolitas. O conhecimento da biogeografia dos microrganismos é fundamental para se determinar a real extensão de sua diversidade, a identificação de táxons e os processos ecológicos em que participam. Para os propósitos de bioprospecção e biotecnologia, a biogeografia é importante para a definição de estratégias de busca e descoberta de recursos biológicos de potencial interesse para a indústria e a medicina (RAMETTE; TIEDJE, 2007).

O estudo de padrões biogeográficos em microrganismos teve origem no começo do século XX, quando cientistas começaram a questionar a existência de diferentes bactérias em locais muito distantes resultando nas afirmações de Beijerinck e Baas-Becking de que “tudo está em todo lugar” e “o ambiente seleciona” (O’MALLEY, 2007), para se referir ao comportamento cosmopolita dos microrganismos. Embora alguns trabalhos realizados nos últimos anos demonstrem a existência de padrões biogeográficos nas bactérias, como a existência de endemismo (CHO; TIEDJE, 2000), e correlação negativa entre distância geográfica e similaridade genética (PAPKE et al., 2003; WHITAKER; GROGAN; TAYLOR, 2003), é ainda pouco o que se conhece da biogeografia de microrganismos, sendo importante a realização de estudos nesta área.

A dependência humana da diversidade de plantas, animais e microrganismos expressa-se na variedade de alimentos, medicamentos e interesse pela estabilidade climática e ambiental. Uma das maiores fontes de diversidade biológica são as florestas tropicais, e o Brasil possui a maior extensão contínua de biomas florestais do planeta, sendo a Mata Atlântica um deles. Embora, esse bioma tenha sido reduzido a menos de 16% de sua extensão original (RIBEIRO et al., 2009), os fragmentos remanescentes ainda conservam sua diversidade original, sendo necessária a manutenção de unidades de conservação para preservar a integridade da biodiversidade deste bioma.

Estudos sobre a biogeografia de microrganismos podem ser realizados tomando como referência diferentes ambientes. No presente trabalho foi considerado o ambiente da filosfera

(superfície da folha), o qual é um habitat único e dinâmico para populações microbianas. Embora submetidas a mudanças de temperatura, radiação ultravioleta e variações na umidade (LINDOW; BRANDL, 2003; WHIPPS et al., 2008), os microrganismos crescem em abundância na filosfera. Normalmente, as bactérias são numericamente mais abundantes na filosfera, se comparado a arqueas e fungos. As bactérias podem ter influências positivas ou negativas sobre as plantas hospedeiras, participando de importantes processos ecológicos como o controle biológico de patógenos (COSTA et al., 2008) e a fixação biológica do nitrogênio (FÜRNKRANZ, et al., 2008).

Apesar de sua importância, sabemos pouco sobre a diversidade e biogeografia das comunidades de bactérias da filosfera. A maioria dos trabalhos, baseados em métodos dependentes de cultivo, avaliaram o comportamento de bactérias isoladas e associadas com doenças, subestimando provavelmente a verdadeira extensão da diversidade de bactérias (PACE, 1997). Estudos utilizando métodos independentes de cultivo para caracterizar comunidades microbianas da filosfera, mostraram que a diversidade de bactérias é muito maior do que se estimava com métodos dependentes de cultivo (YANG et al., 2001), e que diferentes espécies de árvores selecionam comunidades bacterianas distintas (LAMBAIS et al., 2006).

Com base nestas informações foi desenvolvido o presente trabalho, visando avaliar a estrutura e diversidade das comunidades bacterianas da filosfera de uma mesma espécie vegetal, em áreas e épocas diferentes, tentando responder duas questões: 1) a maior distância geográfica entre dois indivíduos é uma condição para a menor similaridade genética da comunidade bacteriana? e 2) a estrutura das comunidades bacterianas na filosfera de indivíduos de uma mesma espécie vegetal localizados em áreas geograficamente distantes, são semelhantes?

Para responder a estas questões foi escolhida a espécie vegetal *Maytenus robusta*, presente em três unidades de conservação da Mata Atlântica: Parque Estadual Carlos Botelho, Parque Estadual Ilha do Cardoso e Estação Ecológica de Assis, localizadas no estado de São Paulo. A variabilidade espacial e temporal da comunidade bacteriana foi avaliada utilizando-se PCR-DGGE da região V3 e sequenciamento da região V1-V3 do gene rRNA 16S.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Microbiologia da filosfera

2.1.1.1 A filosfera como habitat para os microrganismos

A superfície das folhas (filosfera) é o habitat de diversos grupos de microrganismos, tais como, bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (MORRIS; MONIER; JACQUES, 1998). Estimativas globais sugerem que a superfície total de folhas colonizável por microrganismos é de aproximadamente $6,4 \times 10^8 \text{ km}^2$, e que a população de bactérias nessa superfície pode chegar a aproximadamente 10^{26} células. Dentre os microrganismos da filosfera predominam bactérias, cuja densidade pode variar entre 10^6 - 10^7 células cm^{-2} (até 10^8 células g^{-1}) de folhas de plantas de regiões temperadas (LINDOW; BRANDL, 2003), podendo ser ainda maior em plantas de regiões tropicais, onde a densa copa das árvores gera um ambiente úmido e propício para o crescimento bacteriano.

Observações microscópicas da superfície de folhas também revelaram que bactérias são os principais colonizadores da filosfera, seguidas de fungos, tanto em ambientes temperados (KARAMANOLI et al., 2000) como tropicais (BALDOTO; OLIVARES, 2008). Baldoto e Olivares (2008) avaliaram a distribuição de bactérias em relação às características anatômicas da superfície das folhas (forma da parede celular de células epidérmicas, presença ou ausência de cutícula cerosa, tricomas, estômatos, entre outros) de 47 espécies de plantas. Os sítios de colonização (parede celular de células epidérmicas, espaços intercelulares, estômatos e tricomas) nas diferentes espécies de plantas foram altamente variáveis, não existindo relação de padrão de distribuição microbiana entre espécies de uma mesma família botânica. Os autores observaram três padrões de distribuição, a saber: células solitárias, bactérias constituindo microcolônias e bactérias estruturadas em biofilmes (Figura 1).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície de folhas mostrando os padrões de distribuição de bactérias epifitas. A e B = bactérias solitárias (S). C e D = bactérias constituindo microcolônias (M). E e F = bactérias e outros microrganismos estruturados em biofilmes (B). L = face inferior da folha. Seta = bactéria, estrela = hifa de fungo. Fonte: Baldoto e Olivares (2008)

Para sobreviver e se multiplicar nas superfícies das folhas, as bactérias precisam resistir a períodos de estresse hídrico e altos níveis de radiação UV e se adaptar a temperaturas e condições nutricionais variáveis. As estratégias de colonização utilizadas pelas bactérias epífitas, em função dessas tensões, são a chave para a sobrevivência e a dominância desses microrganismos na filosfera. A formação de biofilmes pode ser uma das estratégias utilizadas pelas bactérias da filosfera para tolerar as grandes amplitudes de variações das condições ambientais.

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) é considerada um componente importante na formação da matriz dos biofilmes (COSTERTON et al., 1995) e pode beneficiar as bactérias da filosfera. Dado que a disponibilidade de água é provavelmente um dos fatores mais flutuantes na superfície da folha, os EPS podem proteger as bactérias da dessecação e estresse ocasionados por espécies ativas de oxigênio (KIRALY; EL-ZAHABY; KLEMENT, 1997). Tem sido demonstrado que bactérias crescendo em biofilmes resistem melhor ao estresse oxidativo do que bactérias planctônicas (STEWART et al., 2000). Adicionalmente, a densa matriz de células vizinhas pode originar um aumento na concentração de nutrientes (COSTERTON et al., 1995), favorecendo o desenvolvimento das bactérias em um ambiente oligotrófico (LEVEAU; LINDOW, 2001).

Vários fatores podem influenciar a colonização e desenvolvimento das bactérias em microhabitats da filosfera. Características relacionadas com a morfologia da própria folha são fatores importantes para a colonização da filosfera por microrganismos. As folhas são cobertas por uma única camada de células epidérmicas recobertas por cutícula, estrutura cerosa que pode variar dependendo da espécie vegetal e da idade da folha (MECHABER et al. (1996). Esta estrutura é impermeável, fazendo com que a umidade emitida através dos estômatos seja retida na superfície da folha. No entanto, a formação de protuberâncias e depressões originadas pela cutícula podem limitar a difusão passiva de nutrientes e de vapor de água do interior para a superfície da folha, podendo interferir na colonização da filosfera pelas bactérias.

A disponibilidade de fontes de carbono é outro dos principais fatores que influencia a colonização da filosfera. Açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose são liberados do interior da folha para a superfície (MERCIER; LINDOW, 2000; TUKEY, 1970). A utilização de biossensores moleculares para diferentes açúcares tem revelado importantes conhecimentos acerca das condições químicas da filosfera e da capacidade de utilização de nutrientes por parte das bactérias (MILLER et al., 2001; LEVEAU; LINDOW, 2001). Tais conhecimentos sugerem

que a distribuição de nutrientes na superfície das folhas é heterogênea, limitando a atividade metabólica de algumas bactérias e favorecendo o desenvolvimento de outras em determinadas regiões da filosfera e afetando as estruturas das comunidades de bactérias na filosfera.

Por outro lado, a variação nos fluxos de radiação UV é uma das características mais proeminentes do ambiente da superfície foliar, ao qual os microrganismos epífitos tiveram que se adaptar. Presume-se que a pigmentação das células microbianas confere proteção às radiações UV. Um exame detalhado de bactérias epífitas presentes em plantas de amendoim expostas a fluxos elevados de UV revelou que a maioria delas tolerou altas intensidades de UV (SUNDIN; JACOBS, 1999). Curiosamente, a proporção relativa de cepas tolerantes a UV na comunidade bacteriana aumentou quando as folhas foram expostas à radiação UV, e as estirpes mais tolerantes foram aquelas que produziram pigmentos de cor rosa ou laranja (SUNDIN; JACOBS, 1999). Em *Pseudomonas syringae*, a tolerância à radiação UV tem sido associada aos genes plasmidiais *rulAB*, os quais estão envolvidos no reparo do DNA (KIM; SUNDIN, 2000). Quase todas as cepas naturais desta espécie têm um locus funcional *rulAB*, e sem este são menos tolerantes à radiação UV. Assim, a presença de características adaptativas nas bactérias pode lhes outorgar benefícios para seu estabelecimento na filosfera.

Fatores físicos e químicos também podem controlar o crescimento bacteriano na filosfera. Espera-se que na filosfera exista seleção de fenótipos bacterianos capazes de modificar seu microhabitat, a fim de aumentar a disponibilidade de nutrientes no filoplano. Por exemplo, algumas bactérias podem produzir compostos com propriedades surfactantes que aumentariam a disponibilidade de nutrientes. Bunster, Fokkema e Schippers (1989) observaram a produção de surfactantes em 50% das diferentes cepas de *Pseudomonas* isoladas da rizosfera e filosfera de batata e trigo. Tendo em consideração a natureza hidrofóbica da cutícula, é provável que o aumento da umidade desses habitats, originado pelos surfactantes, permita a solubilização e difusão de substratos, tornando-os disponíveis para as bactérias. O filme de água criado pelo surfactante poderia espalhar a bactéria em toda a superfície foliar, incluindo áreas onde os nutrientes são mais abundantes. Assim, a produção de biossurfactantes pode ser uma característica que as bactérias possuem para alterar seu habitat e explorá-lo mais eficientemente.

Outros fatores importantes que podem controlar a liberação de nutrientes na filosfera são os reguladores de canais de íons. Determinantes genéticos para a biossíntese e secreção da toxina siringomicina foram encontrados na maioria das cepas de *P. syringae* pv. *syringae*, incluindo

muitas linhagens não patogênicas (QUIGLEY; GROSS, 1994), as quais podem se comportar como epífitas em uma grande variedade de plantas. A siringomicina é um importante fator de virulência de *P. syringae* pv. *syringae* (MO; GROSS, 1991) e afeta o transporte de íons através da membrana plasmática das células vegetais, regulando o funcionamento de canais de íons. Este fluxo de íons leva à liberação de metabólitos das células vegetais e, finalmente, à lise celular (HUTCHISON; TESTER; GROSS, 1995). Cepas não-patogênicas de *P. syringae* sintetizam siringomicina em quantidades insuficientes para causar necrose celular e doença, mas suficiente para desencadear a liberação de baixos níveis de metabólitos das plantas. Além de seu efeito em células vegetais, a siringomicina também pode atuar como biossurfactante (HUTCHISON; TESTER; GROSS, 1995). Estas propriedades podem explicar porque a produção de siringomicina, um processo complexo de biossíntese e regulação (BENDER; ALARCÓN-CHAIDEZ; GROSS, 1999), ocorre em estirpes patogênicas e não-patogênicas de *P. syringae*.

Em contraste com a produção de siringomicina, que parece estar restrita às espécies de *Pseudomonas*, a biossíntese do regulador de crescimento vegetal e precursor da auxina, ácido indol-3-acético (IAA), pode ocorrer em diferentes bactérias colonizadoras da filosfera (FETT; OSMAN; DUNN, 1987; GLICKMANN et al., 1998; LINDOW et al., 1998). Já que o IAA está envolvido em muitos aspectos do desenvolvimento das plantas, é de grande interesse a habilidade mostrada por bactérias de produzir uma auxina idêntica à encontrada em plantas. O IAA, em baixas concentrações, promove afrouxamento da parede celular (VANDERHOEF; DUTE, 1981), e auxina exógena, estimula a liberação de açúcares da parede celular vegetal (FRY, 1989; GOLDBERG, 1980). Considerando que os nutrientes na superfície das plantas são limitados, uma maior produção de IAA pelas bactérias pode causar um incremento na liberação de açúcares das células vegetais, disponibilizando maiores quantidades de nutrientes para as bactérias.

Adicionalmente, as populações microbianas que se desenvolvem na filosfera devem estar adaptadas às características genéticas das plantas. Foi demonstrado que o número total de bactérias cultiváveis em plantas herbáceas de folhas largas como pepino e feijão foi significativamente superior ao número total de bactérias de folhas de gramíneas e de folhas de cítricos e repolho (contendo cutícula com considerável cobertura de cera) (KINKEL; WILSON; LINDOW, 2000; O'BRIEN; LINDOW, 1989). Diferenças na capacidade de suportar populações de *Pseudomonas syringae* foram também observadas em cultivares de feijão (HIRANO; BAKER; UPPER, 1996; UPPER et al., 2003). O impacto do genótipo da planta pode influenciar

também na colonização e sobrevivência de inoculantes microbianos na filosfera. Correa et al. (2007), utilizando a técnica de DGGE, mostraram que a sobrevivência de *Azospirillum* na filosfera de duas variedades de tomate variou com o genótipo da planta, da mesma forma que a resposta da planta à inoculação.

2.1.1.2 Diversidade de bactérias na filosfera

Estudos de comunidades bacterianas na filosfera são numerosos, mas restritos a populações de bactérias aeróbias viáveis em meios de cultivo e direcionados, quase sempre, às interações planta-patógeno. Os poucos estudos avaliando variações da comunidade microbiana ao longo do tempo e diferentes escalas espaciais forneceram importantes conhecimentos sobre a identidade e a ecologia de bactérias da filosfera (DICKINSON; AUSTIN; GOODFELLOW, 1975, ERCOLANI, 1991; JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; THOMPSON et al., 1993). Ercolani (1991) fez um extenso inventário de bactérias mesófilas aeróbicas cultiváveis isoladas a partir da superfície de folhas de oliveira em quatro diferentes meses e durante seis anos (de 1984 a 1989), coincidindo com as épocas de cultivo. De um total de 1.701 cepas representativas isoladas, foram identificados 25 gêneros. A frequência de ocorrência no período de seis anos foi estimada em 51% para *Pseudomonas syringae*, 6,7% para *Xanthomonas campestris*, 6% para *Erwinia herbicola*, 4,7% para *Acetobacter aceti*, 4,3% para *Gluconobacter oxydans*, 3,9% para *Pseudomonas fluorescens*, 3,8% para *Bacillus megaterium*, 3,1% para *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, 2,8% para *Lactobacillus plantarum*, 2,2% para *Curtobacterium plantarum*, 2,2% para *Micrococcus luteus*, 1,4% para *Arthrobacter globiformis*, 1,2%, para *Klebsiella planticola*, 1,2% para *Streptococcus faecium*, 0,98% para *Clavibacter*, 0,82% para *Micrococcus* sp., 0,81% para *Serratia marcescens*, 0,57% para *Bacillus subtilis*, 0,4% para *Cellulomonas flavigena*, 0,37% para *Erwinia* sp., 0,3% para *Zymomonas mobilis*, 0,29% para *Bacillus* sp., 0,27% para *Alcaligenes faecalis*, 0,08% para *Erwinia carotovora* e 0,04% para *Pseudomonas aeruginosa*. O autor observou diferenças na estrutura da comunidade bacteriana em folhas de diferentes idades e em determinadas épocas de crescimento.

Thompson et al. (1993) analisaram 1.236 cepas bacterianas isoladas de folhas imaturas, maduras e senescentes de beterraba durante um ciclo completo de crescimento. Foram identificadas 78 espécies e 37 gêneros. Como Ercolani (1991), observaram padrões distintos de

colonização em diferentes épocas do ano, sendo que a diversidade de populações bacterianas foi menor durante os meses mais secos, e maior durante os meses mais frios e chuvosos. Coincidentemente, em ambos estudos as comunidades bacterianas em folhas jovens eram compostas de um maior número de táxons quando comparadas às folhas mais velhas. Assim, determinados ambientes da filosfera aparentemente selecionam genótipos bacterianos específicos. Esse comportamento é reforçado pela constatação de que *Pseudomonas fluorescens* são capazes de adquirir plasmídeos nativos da microbiota epífita durante o estágio de maturação da planta (LILLEY; BAILEY, 1997). Esses dados sugerem que bactérias mais susceptíveis a transferência lateral de genes que conferem capacidade de adaptação às mudanças das condições da filosfera podem dominar a filosfera durante a fase de maturação das folhas.

Nos últimos anos, métodos independentes de cultivo vêm sendo utilizados para estudar a diversidade de bactérias na filosfera. Yang et al. (2001) estudaram a comunidade de bactérias da filosfera de plantas de interesse agrícola como: laranja, algodão, milho, beterraba e feijão, através de PCR-DGGE e sequenciamento de algumas bandas do gel correspondentes a laranja. Os resultados mostraram que a estrutura das comunidades de bactérias (representadas pelo perfil de bandas no gel) de indivíduos da mesma espécie foi mais semelhante entre si do que entre indivíduos de espécies diferentes. Além disso, foi observado que na filosfera existiam comunidades bacterianas mais complexas do que aquelas detectadas por métodos baseados em cultivo. Os estudos revelaram ainda que a maioria das sequências do gene rRNA 16S eram de bactérias não previamente descritas na filosfera (YANG et al., 2001).

Posteriormente, estudos para a caracterização das comunidades bacterianas da filosfera foram realizados com árvores da Mata Atlântica (LAMBAIS et al., 2006). As estruturas das comunidades de bactérias na filosfera de nove espécies de árvores da Estação Ecológica de Caetetus, Estado de São Paulo, foram comparadas utilizando-se PCR-DGGE e sequenciamento de fragmentos do gene rRNA 16S. Os resultados mostraram que diferentes plantas selecionam populações bacterianas distintas e que cada comunidade da filosfera pode abrigar aproximadamente 95-670 espécies bacterianas, sendo que 97% são espécies não conhecidas, sugerindo que elas podem ser exclusivas da filosfera. Além disso, a Mata Atlântica pode conter de 2 a 13 milhões de novas espécies de bactérias associadas à filosfera. Foi determinado também que dentro de um mesmo ecossistema, as comunidades bacterianas da filosfera de uma espécie de

árvore apresentam baixa variabilidade espacial, sugerindo que as espécies vegetais selecionam comunidades bacterianas únicas na filosfera.

Estudos sobre alterações graduais e progressivas da comunidade microbiana em ecossistemas têm recebido pouca atenção, apesar de sua ubiquidade nos ambientes naturais. Segundo Redford e Fierer (2009), a filosfera representa um habitat único para explorar a variabilidade temporal e os processos de sucessão das comunidades bacterianas. A superfície foliar de plantas decíduas é um habitat intrinsecamente efêmero que emerge de novo a cada ano como uma superfície presumivelmente estéril, tornando-se um habitat natural ideal para a condução de estudos detalhados dos processos de sucessão. Os autores estudaram a dinâmica sucessional de populações bacterianas da filosfera de um único indivíduo de *Populus deltoides*, cujas folhas emergem a cada ano no início de maio e persistem até a queda que acontece ao final de outubro no hemisfério norte. As avaliações do processo sucessional foram realizadas em diferentes meses de duas épocas do ano (Agosto, Setembro e Outubro de 2006 e Maio, Junho, Julho e Agosto de 2007). Para isso, coletaram folhas de três diferentes indivíduos da mesma espécie num mesmo dia, a fim de comparar as variações da comunidade bacteriana entre as árvores e relacioná-las com as variações das diferentes épocas. Através de sequenciamento do gene rRNA 16S e qPCR (PCR quantitativo), para estimar a abundância relativa de genes de rRNA 16S em cada amostra, observaram que a estrutura das comunidades bacterianas foi altamente variável entre os meses de uma mesma estação, assim como entre as duas estações do ano. Análises de agrupamentos com base na similaridade entre as comunidades de bactérias em cada época avaliada, mostraram que as comunidades bacterianas se agruparam em função dos períodos inicial, médio e final da estação. Assim, as comunidades dos períodos inicial e final foram mais semelhantes entre si em relação às comunidades do período médio da estação, e esses padrões foram consistentes de ano para ano. Embora tenham observado mudanças claras e previsíveis na composição da comunidade bacteriana ao longo das estações, mudanças na diversidade bacteriana foram menos previsíveis. A dinâmica temporal observada sugere que, embora as comunidades bacterianas tenham tido altos níveis de diversidade filogenética e rápidas taxas de retorno, essas comunidades seguiram padrões sucessionais previsíveis de época para época.

Recentemente o mesmo grupo de pesquisadores (REDFORD et al., 2010), usando a técnica de pirosequenciamento, caracterizou as comunidades bacterianas de folhas de 56 espécies

de árvores de Boulder (Colorado, E.U.A.), e quantificaram a variabilidade inter e intra-específica das comunidades bacterianas de 10 dessas espécies. Foi analisada também a variabilidade geográfica das comunidades microbianas da filosfera de *Pinus ponderosa* de vários locais dos E.U.A. e Austrália. Foi observado que espécies de árvores individuais abrigam altos níveis de diversidade de bactérias, e que houve considerável variabilidade na composição da comunidade microbiana entre as árvores. As comunidades bacterianas exibiram padrões previsíveis de relacionamento com as árvores, existindo correspondência significativa entre filogenia da árvore e filogenia da comunidade bacteriana. A variabilidade inter-específica (indivíduos de diferentes espécies) da composição da comunidade bacteriana foi maior que a variabilidade intra-específica (indivíduos da mesma espécie). No entanto, observaram baixa influência geográfica (entre continentes inclusive) sobre as comunidades bacterianas da filosfera de *P. ponderosa*, as quais apresentaram mínima variação espacial.

Visando obter informações sobre a fisiologia de bactérias e os mecanismos comuns de adaptação entre as populações da filosfera e as plantas hospedeiras, Delmotte et al. (2009), combinando técnicas de metagenômica e metaproteômica, avaliaram a comunidade de bactérias presentes na filosfera de três espécies de plantas: soja, trevo e *Arabidopsis thaliana*. Após a extração de DNA e proteínas de bactérias da filosfera, a avaliação genômica foi realizada através de pirosequenciamento, além do sequenciamento de clones do gene rRNA 16S e PCR-DGGE para análise comparativa das comunidades bacterianas. Já, a análise proteômica consistiu na digestão de proteínas, separação dos fragmentos por cromatografia líquida e a análise dos peptídeos por espectrometria de massas.

O resultado da proteômica foi uma mistura de quase meio milhão de espectros, cada um correspondendo a uma sequência de um peptídeo curto. A vinculação destes espectros de proteínas com uma possível função e origem evolutiva é um desafio, e só é possível com um marco de referência apropriado. Normalmente, esse marco é fornecido pela base de dados de DNA e de sequências de proteínas disponíveis publicamente. No entanto, se uma comunidade microbiana tem só alguns representantes no banco de dados, as chances de encontrar combinações positivas com sequências curtas do proteoma ambiental são escassas. Nesse aspecto, a metagenômica contribui significativamente, ou seja, aumenta a probabilidade de identificação de proteínas através do perfil metagenômico da mesma amostra de onde as proteínas foram extraídas. O pirosequenciamento, nesse trabalho, foi usado para construir uma

biblioteca de sequências de DNA a partir de amostras de bactérias de folhas. Ao incluir esses dados metagenômicos nas sequências do banco de dados públicos, até 87% mais de proteínas puderam ser identificadas na comunidade de bactérias. Isto sugere que muitas bactérias da filosfera das plantas que foram investigadas (soja, trevo e *Arabidopsis*) são, na verdade, geneticamente distintas das bactérias cujos dados genômicos estão atualmente disponíveis. Essa hipótese foi confirmada para membros do gênero *Sphingomonas*, as bactérias mais numerosas nas filosferas estudadas.

Os resultados revelaram ainda, que muitas das proteínas altamente expressas como: porinas (OprF, em *Pseudomonas*), receptores dependentes-TonB (em *Sphingomonas*) e transportadores tipo ABC (em *Pseudomonas* e *Methylobacterium* spp.), por exemplo, estão aparentemente envolvidas na assimilação dos poucos nutrientes disponíveis na superfície das folhas. Proteínas relacionadas com o uso do metanol liberado pelas plantas, também foram abundantes e podem ser atribuídas a espécies de *Methylobacterium*, colonizadoras de folhas de muitas plantas (SY et al., 2005). Proteínas de estresse (por exemplo, superóxido dismutase) foram abundantes na filosfera, revelando a necessidade de proteção das células bacterianas de danos relacionados com a oxidação e desidratação.

O conhecimento da real extensão da diversidade de bactérias em diferentes ambientes, como a filosfera, tem sido possível com a aplicação da proteogenômica, revelando a importância da identificação de táxons e os processos ecológicos em que participam.

2.1.2 Biogeografia de populações microbianas

A biogeografia estuda a distribuição da biodiversidade em relação ao espaço e ao tempo, favorecendo a compreensão dos mecanismos que geram e mantêm a diversidade, especiação, extinção, dispersão e interação entre as espécies (MARTINY et al., 2006). O estudo da distribuição geográfica dos organismos desenvolveu-se com referência quase exclusiva à ecologia de plantas e animais (COX; MOORE, 2005). No entanto, nos últimos anos, com o advento dos métodos independentes de cultivo (LAMBAIS et al., 2005), a diversidade e biogeografia microbiana estão sendo avaliadas, gerando certas controvérsias em relação aos conceitos tradicionais da ecologia.

Padrões biogeográficos de populações microbianas, como a relação entre similaridade genética e distância geográfica, têm sido observados. Cho e Tiedje (2000) caracterizaram a distribuição espacial de genótipos de *Pseudomonas* usando BOX-PCR, uma técnica de genotipagem, em solos de dez locais em quatro continentes. Os autores encontraram que a similaridade de isolados de *Pseudomonas* estava negativamente correlacionada com a distância geográfica regional (distância entre as amostras de 5 m a 80 Km), mas não entre continentes (distâncias maiores). De modo semelhante, um estudo sobre a diversidade genética de comunidades de cianobactérias nos EUA, Japão, Nova Zelândia e Itália mostrou o isolamento geográfico de populações de cianobactérias, tanto em escala global (entre continentes) como local (distâncias de quilômetros) (PAPKE et al., 2003). Correlação negativa entre a similaridade genética e a distância geográfica foi observada ao se estudar a diversidade de isolados da arquea termofílica *Sulfolobus* de cinco regiões geograficamente distintas, separadas por mais de 250 km (WHITAKER; GROGAN; TAYLOR, 2003). Esses trabalhos demonstraram que a biogeografia de microrganismos é influenciada pela distância geográfica, conduzindo ao isolamento de diferentes populações e subsequentemente à divergência genética.

Estudos relacionando a influência de fatores ambientais sobre a diversidade e biogeografia de microrganismos também foram realizados. Fierer e Jackson (2006) coletaram cerca de 100 amostras de solo de diferentes locais das Américas do Norte e Sul e, usando T-RFLP, demonstraram que as diferenças encontradas nas estruturas das comunidades bacterianas estão fortemente correlacionadas com o pH do solo. Observaram também que essa heterogeneidade espacial foi maior em solos neutros do que em solos ácidos. Em outro estudo, baseado no sequenciamento do gene rRNA 16S foi avaliada a distribuição de bactérias amônio-oxidantes (*Nitrosomonas* e *Nitrospira*) obtidas de solos de diferentes ecossistemas norte-americanos e, entre as diferentes variáveis medidas, a temperatura teve uma forte influência na seleção de linhagens deste grupo (FIERER et al., 2009).

Segundo Martiny et al. (2006), a biogeografia é definida por dois eventos, um referente a aspectos “contemporâneos” como variações de fatores ambientais, e outro referente a aspectos “evolutivos” ou “históricos”, como o isolamento continental ou distância geográfica. Assim, a distribuição geográfica de populações microbianas poderia ser explicada com quatro hipóteses, propostas por Martiny et al. (2006). A hipótese da nulidade afirma que os microrganismos estariam distribuídos aleatoriamente no ambiente. A segunda hipótese considera que as variações

ambientais contemporâneas influenciam na biogeografia dos microrganismos, assumindo que a distância geográfica não afeta a diversidade, devido à ampla dispersão dos microrganismos. Esta hipótese representa o postulado de que tudo está em todas as partes e que o ambiente seleciona (O'MALLEY, 2007). A terceira hipótese afirma que a distribuição geográfica dos microrganismos foi moldada pelos acontecimentos evolutivos que limitaram a dispersão, e que as condições ambientais do passado levaram à divergência genética das diferentes populações microbianas. A última hipótese postula que a biogeografia de microrganismos é determinada tanto por condições ambientais contemporâneas como por eventos evolutivos do passado. Definidas estas possibilidades, duas importantes questões podem ser levantadas: comunidades microbianas de diferentes locais possuem diferenças de diversidade? Se possuem, isto se deve a fatores ambientais contemporâneos, eventos evolutivos ou ambos?

Estudos tentando responder estas questões estão sendo desenvolvidos. Foti et al. (2006), estudando especificamente a biogeografia de *Thioalkalivibrio* em lagos de Mongólia, Kênia, Califórnia, Egito e Sibéria, encontraram que a distribuição dessa bactéria mostrou uma tendência ao endemismo, sendo a distância geográfica o fator limitante para a ocorrência do endemismo. Adicionalmente, aplicando uma abordagem metabolômica (ligação entre o genótipo e o fenótipo), um estudo sobre a biogeografia da bactéria cosmopolita *Salinibacter ruber*, isolada do Mediterrâneo, Atlântico e de lagos dos Andes peruanos, demonstrou que os isolados geograficamente mais distantes, apresentaram quantidades de metabólitos diferentes. Os marcadores mais relevantes foram moléculas de CHO de estrutura alifática, que poderiam representar componentes de membranas celulares, tais como ácidos graxos e terpenos. Foi proposto que estas moléculas poderiam ser as responsáveis pela diferenciação dos isolados existentes nas regiões geográficas avaliadas, podendo ocorrer regulações transcricionais ou post-transcricionais distintas. Estas diferenças estariam relacionadas também com as condições ambientais de cada local de onde as bactérias foram isoladas, já que, por exemplo, os lagos dos Andes peruanos não somente estão distantes 10.000 Km dos outros dois locais, como também encontram-se a 3.500 m acima do nível do mar onde a temperatura e a radiação solar são diferentes (ROSELLÓ-MORA et al., 2008).

Recentemente, outro estudo em seis lagos situados na Mongólia, China e Argentina, com composições de sal diferentes, explorou as diferenças na estrutura da comunidade microbiana dentro do contexto das condições ambientais contemporâneas e da distância geográfica. Foi

observado que fatores ambientais como pH, temperatura e concentrações de íons influenciam significativamente a biogeografia de *Archaea*. No entanto, a distância geográfica não teve influência sobre este grupo microbiano. Já a biogeografia de *Bacteria* foi significativamente influenciada tanto por fatores ambientais (pH e concentrações de íons) como pela distância geográfica (PAGALING et al., 2009). Essas observações são consistentes com os estudos acima descritos (CHO; TIEDJE, 2000; FOTI et al., 2006; PAPKE et al., 2003), e podem ser explicadas pelo fato de que grandes distâncias limitam a dispersão e que os eventos evolutivos, como especiação e extinção, podem conduzir a diferenças em duas populações microbianas separadas por barreiras geográficas. No caso da biogeografia das arqueas, Pagaling et al. (2009) sugerem que esses microrganismos estariam sendo dispersos mais facilmente ou são mais móveis.

A biogeografia microbiana está ainda em seu início, e mais estudos relacionados com este tema são necessários para entender quais são os fatores que influenciam a distribuição dos microrganismos nos mais diversos ambientes.

2.1.3 A Mata Atlântica

As florestas tropicais úmidas ocupam 7% da superfície da terra e são consideradas os ambientes mais ricos em biodiversidade, abrigando mais de 50% do total das espécies nas terras emersas do planeta (MYERS et al., 2000). Uma das maiores áreas de floresta tropical é a Mata Atlântica que ocupa o segundo lugar em extensão nas Américas, logo após a Floresta Amazônica. Atualmente, está incluída entre os principais “hotspots”, ou seja, centros de altíssima biodiversidade em que a extensão original foi dramaticamente reduzida, colocando em risco a sobrevivência de incontáveis espécies de animais e plantas. No início do século XVI, a Mata Atlântica apresentava cerca de 1.000.000 km² (12% do território nacional), e hoje estima-se que seus remanescentes representem entre 11,4 e 16% da vegetação original (RIBEIRO et al., 2009).

Do ponto de vista ecológico considera-se Mata Atlântica as matas pluviais tropicais que se distribuem ao longo das serras que acompanham o litoral brasileiro (algumas vezes chamadas de matas de encosta), formando uma longa faixa de dezenas até mais de uma centena de quilômetros de largura, a qual se estende de forma descontínua, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. Elas são consideradas como um bioma azonal do Zonobioma I (Equatorial), constituído por florestas tropicais ombrófilas densas e sempre-verdes. Ao lado de áreas de outros

biomas, como manguezais, matas de restinga, matas tropicais estacionais decíduas e semi-decíduas e cerrados, essas florestas integram o Domínio morfoclimático e fitogeográfico Tropical Atlântico, como o bioma predominante (COUTINHO, 2009).

A Mata Atlântica apresenta diversidade bastante variável, devendo sua exuberância à grande umidade do ar, trazida pelos ventos marinhos, que se precipita sob a forma de chuvas na encosta, ao subirem para camadas frias de maior altitude. Segundo a classificação de Köppen, o clima ao longo da Mata Atlântica varia entre os tipos *Aw* (tropical), *Cwa* (tropical de altitude) e *Cf* (Subtropical), com temperaturas médias entre 14 e 21°C, chegando à máxima absoluta a 35°C, não passando a mínima absoluta de 1°C. A pluviosidade média varia entre 1500 a 2000 mm ano⁻¹, em função da região geográfica e, em particular, do relevo. Assim, em algumas áreas montanhosas de São Paulo a pluviosidade anual pode atingir índices excepcionalmente elevados, entre 3600 e 4500 mm ano⁻¹ (FRANKE, et al., 2005).

As composições florísticas das formações florestais na Mata Atlântica apresentam variações na abundância de espécies adaptadas às condições ambientais próprias de cada região, principalmente às variações de pluviosidade e temperatura. Franke et al. (2005) e Rodrigues et al. (2008b) fazem uma compilação de diferentes trabalhos relacionados com a diversidade da Mata Atlântica em regiões do nordeste e do estado de São Paulo, respectivamente, e descrevem como espécies vegetais de maior riqueza as seguintes: *Asteraceae*, *Bignoniaceae*, *Bromeliaceae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Lentibulariaceae*, *Melastomataceae*, *Monimiaceae*, *Myrtaceae*, *Orchidaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*, *Rubiaceae*, *Sapotaceae* e *Solanaceae*. *Leguminosae*, *Lauraceae* e *Myrtaceae* são os grupos mais constantes. A riqueza de *Myrtaceae* tem sido apontada em diversos estudos fitossociológicos como uma das características diferenciadoras do estrato arbóreo. Entre os principais gêneros da Mata Atlântica encontram-se: *Dalbergia*, *Hymenaea*, *Melanoxylon*, *Myrocarpus* e *Piptadenia* em *Leguminosae*; *Jacaranda*, *Tabebuia* e *Tecoma* em *Bignoniaceae*; *Ocotea*, *Nectandra* e *Phoebe* em *Lauraceae*. Muitas das espécies relacionadas com estes gêneros são restritas a determinadas áreas constituindo uma flora endêmica significativa. Mori, Boom e Prance (1981) estimam que de cada duas espécies arbóreas uma ocorre exclusivamente neste bioma.

Para obter mais informações sobre os processos ecológicos da Mata Atlântica foi realizado o projeto “Diversidade, dinâmica e conservação em florestas do estado de São Paulo – 40 ha de parcelas permanentes” do programa BIOTA/FAPESP (RODRIGUES et al., 2008a), o

qual estabeleceu parcelas permanentes em quatro unidades de conservação do estado de São Paulo, Parque Estadual Carlos Botelho (PECB), Parque Estadual Ilha do Cardoso (PEIC), Estação Ecológica de Caetetus (EEC) e Estação Ecológica de Assis (EEA). Cada uma destas unidades é remanescente de formações florestais com composição florística, estrutura e dinâmica próprias (RODRIGUES et al., 2008a).

Utilizando a metodologia de parcelas permanentes nestas Unidades, Rodrigues e colaboradores (RODRIGUES et al., 2008a) registraram 11.500 árvores em 216 espécies na floresta ombrófila densa (parcela do PECB), 15.500 árvores em 121 espécies na floresta de restinga (parcela do PEIC), 22.000 indivíduos em 115 espécies no cerradão (parcela da EEA) e 12.000 indivíduos em 150 espécies na floresta estacional semidecidual (EEC). A similaridade florística obtida entre as formações florestais foi muito baixa, inferior a 12% pelo índice de Jaccard. Os autores concluem que cada formação florestal apresenta composição florística própria, em função de fatores bióticos e abióticos determinantes. Com a instalação, no primeiro semestre de 2003, de estações meteorológicas automáticas em cada uma das áreas os pesquisadores obtiveram dados meteorológicos que permitiram caracterizar o clima das distintas unidades. Embora as temperaturas médias não tenham sido muito distintas entre as três regiões, as diferenças foram marcantes para os demais elementos meteorológicos, sendo as maiores discrepâncias observadas para a chuva e radiação solar, revelando principalmente a grande importância das chuvas orográficas na formação do clima das encostas. A intensidade de chuva foi a responsável pelo gradiente de umidade relativa observado entre as três áreas e pelo menor nível de disponibilidade de radiação solar na Floresta Atlântica. Com relação à velocidade média do vento, também observaram gradiente bem definido com as maiores velocidades no interior do Estado e as menores nas localidades próximas do litoral (RODRIGUES et al., 2008a).

Estudos relacionados com a estrutura e diversidade de bactérias na filosfera de diferentes espécies de árvores também foram realizados nestas áreas. O trabalho de Lambais et al. (2006), já descrito, foi realizado utilizando espécies da EEC, entre elas: *Aspidosperma polyneuron*, *Campomanesia xantocarpa*, *Holocalyx balansae*, *Ocotea indecora*, *Seguiera floribunda*, *Trichilia catigua*, *T. clausenii*, *T. pallida* e *Urera baccifera*. Já, Andrade (2007), utilizou espécies do PECB, entre elas: *O. teleiandra*, *O. dispersa*, *Mollinedia schottiana*, *M. uleana*, *Eugenia cuprea* e *Tabebuia serratifolia*. Em ambos os estudos foi observado que a estrutura de comunidades bacterianas na filosfera foi mais similar entre indivíduos filogeneticamente mais

próximos do que entre indivíduos filogeneticamente mais distantes. No entanto, o efeito da distância geográfica na diversidade e estrutura das comunidades da filosfera não foi avaliado. Essas informações poderiam ampliar nossos conhecimentos sobre a diversidade bacteriana associada à filosfera e seus papéis funcionais na Mata Atlântica.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da distância geográfica e do tempo, na diversidade e estrutura das comunidades bacterianas da filosfera de uma mesma espécie vegetal (*Maytenus robusta*) localizada em diferentes áreas da Mata Atlântica.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Áreas de estudo e amostragem

O estudo foi realizado no Parque Estadual Carlos Botelho, Parque Estadual Ilha do Cardoso e a Estação Ecológica de Assis, localizadas no Estado de São Paulo (Figura 2).

Figura 2 - Localização das três Unidades de Conservação onde foram realizadas as amostragens de folhas de *Maytenus robusta*. Fonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA); Instituto Florestal

Para o desenvolvimento do Projeto: “Diversidade, dinâmica e conservação em florestas do Estado de São Paulo: 40 ha de parcelas permanentes”, sob coordenação do Dr. Ricardo Rodrigues, em cada uma destas unidades, foram instaladas parcelas permanentes de 320 x 320 m, totalizando 10,24 ha, subdivididas em 256 sub-parcelas contíguas de 20 x 20 m (400 m²). Os indivíduos arbóreos com diâmetro de caule superior a 15 cm contidos em cada sub-parcela foram numerados e georeferenciados (Anexo 1) permitindo a precisa localização das espécies nas áreas (RODRIGUES et al., 2008a). A seguir são descritas as características das unidades de conservação onde foram coletadas as folhas.

2.2.1.1 Parque Estadual Carlos Botelho (PECB)

O PECB está localizado no sul do Estado de São Paulo (24°00' a 24°15'S e 47°45' a 48°10'W), na região da serra de Paranapiacaba, ocupando parte dos municípios de São Miguel e Arcanjo, Capão Bonito, Sete Barras e Tapiraí. Apresenta uma área de 37.797,43 ha e possui cobertura vegetal classificada como Floresta Ombrófila Densa. A parcela instalada para o Projeto descrito acima e utilizada para o presente trabalho esta localizada em um trecho no Núcleo Sete Barras, à aproximadamente 800 m de altitude (RODRIGUES, et al., 2008a).

De acordo com Dias et al. (1995), o clima é de tipo *Cfa* (segundo a classificação de Köppen) definido como subtropical úmido. A temperatura média anual é de 19°C com máximas de 34°C, e a precipitação média anual de 1.683 mm, sendo que o mês mais seco apresenta precipitação média de 73 mm.

Em relação aos tipos de solos identificados na área pode-se destacar: Latossolo vermelho amarelo (LV), Latossolo vermelho amarelo argilúvio (LVP), Cambissolo húmico aluminico sômbrico (CHA) e Neossolo regolítico psamítico léptico (RRQ) (PFEIFER et al., 1986).

A Figura 3 mostra a localização da parcela permanente no PECB e a distribuição das sub-parcelas onde foram coletadas as folhas de *Maytenus robusta*.

Figura 3 - Parque Estadual Carlos Botelho, mostrando a localização exata (círculo vermelho) da instalação da Parcela Permanente. Os códigos A03, B12, C07, E10, E11 e J0, correspondem às sub-parcelas onde foram realizadas as coletas de folhas de *Maytenus robusta* e representam seis árvores amostradas. Fonte: Rodrigues et al. (2008a)

2.2.1.2 Parque Estadual Ilha do Cardoso (PEIC)

O PEIC está localizado no litoral sul do Estado de São Paulo, no município de Cananéia (25°03'05"a 25°8'18"S e 47°53'48"a 48°05'42"W), e apresenta uma área aproximada de 22.500 ha (Figura 4). Forma parte do Complexo Estuarino Lagunar Paranaguá-Cananéia-Iguape, que compreende um conjunto de Unidades de Conservação marinho-costeiras (TABARELLI et al., 2005). A leste, a Ilha é banhada pelo Oceano Atlântico e a oeste é separada do continente pelo Canal do Ararapira. Na parte central apresenta cadeia de montanhas que chegam a mais de 800 m de altitude. As planícies estão limitadas ao norte, leste e sul da ilha (BARROS et al., 1991).

Segundo Melo & Mantovani (1994), dados coletados no biênio 1990-1991 em altitudes mais baixas que 200 metros revelaram que a média das temperaturas mínimas está em torno de 19°C; a média das máximas, em torno de 27 °C. A precipitação média anual está entre 1.800 e 2.000 mm, com clima tipo *Af*, segundo o modelo de classificação climática de Köppen.

No PEIC destacam-se cinco formações vegetais: floresta tropical de encosta, floresta tropical de planície litorânea, floresta de restinga, dunas e manguezal. A maior parte da ilha (74%) é coberta por florestas tropicais de encosta (MELO; MONTAVANI, 1994). As florestas tropicais de planície litorânea, com grandes quantidades de epífitas e lianas, limitam-se ao perímetro do maciço montanhoso, ocorrendo em sua maior extensão a norte e leste da Ilha. Apresentam estratos arbóreos que variam de 10 a 30 m de altura. A floresta de restinga, onde a parcela permanente utilizada neste estudo está localizada, ocorre em continuidade com a floresta de planície litorânea alcançando de 10 a 15 m de altura, com predominância de *Calophyllum brasiliensis*. À medida que se aproxima do litoral, o estrato arbóreo da vegetação de restinga passa a ser dominado por mirtáceas, com grandes quantidades de epífitas e herbáceas no solo, e eritáceas com arbustos distribuídos em agrupamentos, mais ou menos isolados, de 1 a 3 m de altura (restinga baixa). Nas praias, a vegetação pioneira de dunas distribui-se no nordeste e sul-sudeste da ilha. Finalmente, o manguezal cobre os sedimentos da planície litorânea voltados, principalmente para o lado do continente, ao longo do Canal do Ararapira (BARROS et al., 1991).

Os solos sob restinga englobam aqueles classificados como espodossolos (na sua maioria, arenosos, ácidos e muito pobres) e neossolos quartzarênicos (GOMES et al., 2007).

A Figura 4 mostra a localização da parcela permanente no PEIC usada neste estudo.

Figura 4 - Parque Estadual Ilha do Cardoso, mostrando a localização exata (círculo vermelho) da instalação da Parcela Permanente. Os códigos B14, E11, F10, G08, H07, I08, I08B, J04, J05 e N02, correspondem às sub-parcelas onde foram realizadas as coletas de folhas de *Maytenus robusta* e representam dez árvores amostradas. Fonte: Rodrigues et al. (2008a)

2.2.1.3 Estação Ecológica de Assis (EEA)

A EEA está localizada no Município de Assis, região sudoeste do Estado de São Paulo, (22°33'65" a 22°36'68"S e 50°23'00" a 50°22'29"W), distante cerca de 12 km da sede do município, ocupando atualmente área de 1.760,64 ha, entre altitudes de 500 e 588 m, em relevo suave ondulado. A Estação Ecológica situa-se em zona de transição entre climas *Cwa* e *Cfa*, segundo a classificação de Köppen, tipos climáticos que diferem essencialmente na duração da estação seca. Na região de estudo, as chuvas são concentradas no verão e a precipitação média anual gira em torno de 1.400 mm, com temperaturas médias ao redor de 21,8 °C, podendo ocorrer geadas severas (BRANDO; DURIGAN, 2004).

Trata-se de uma das áreas mais ao sul da extensa região do domínio do Cerrado, onde a vegetação savânica forma, com a floresta estacional semidecidual, um mosaico geralmente associado às características físico-químicas dos solos. A vegetação da EEA caracteriza-se como Cerrado *sensu lato*, predominando a fisionomia cerradão. Também são encontradas fisionomias florestais ripárias (paludícolas ou não), junto às quais se encontram pequenos trechos de campo úmido. Ainda na área da Estação ocorrem manchas de vegetação com estrato arbóreo descontínuo, com fisionomia de cerrado *sensu stricto* e uma pequena faixa ecotonal, onde ocorrem espécies da floresta estacional semidecidual (DURIGAN et al., 1999).

Os solos da EEA são geralmente arenosos, ácidos e de baixa fertilidade. Juhász et al. (2006), em levantamento detalhado ao longo de uma vertente no interior da unidade, encontraram os seguintes tipos de solo: Latossolo vermelho distrófico típico (LVd); Latossolo vermelho amarelo distrófico típico (LVAd); Latossolo Amarelo distrófico típico (LAd) e Gleissolo Háptico Tb distrófico argissólico (GXbd).

A Figura 5 mostra a extensão total da EEA e a localização da parcela permanente usada neste estudo.

Figura 5 - Estação Ecológica de Assis, mostrando a localização exata (círculo vermelho) da instalação da Parcela Permanente. Os códigos A14, C11, E09, F09, F07, G05, H06, I06, M06 e M07, correspondem às subparcelas onde foram realizadas as coletas de folhas de *Maytenus robusta*, e representam dez árvores amostradas. Fonte: Rodrigues et al. (2008a)

Para o presente estudo foi utilizada a espécie arbórea *Maytenus robusta* (Celastraceae, popular cafeeiro), por estar presente nas três áreas e ter valor medicinal (ANDRADE et al., 2007), visando determinar a variação espaço temporal da estrutura da comunidade bacteriana na filosfera. Em cada uma das três parcelas permanentes foram coletadas amostras de folhas de *Maytenus robusta* a aproximadamente 8 m de altura. As folhas foram coletadas em duas épocas do ano: época seca (Agosto 2008, no PECB e PEIC e Julho 2009, na EEA) e época chuvosa (Fevereiro 2009 na EEA e Março 2009 no PECB e PEIC).

As amostras foram codificadas segundo a localização da planta na sub-parcela, sendo seis indivíduos no PECB (A03, B12, C07, E10, E11 e J0) (Figura 3), dez no PEIC (B14, E11, F10, G08, H07, I08, I08B, J04, J05 e N02) (Figura 4) e dez na EEA (A14, C11, E09, F09, F07, G05, H06, I06, M06 e M07) (Figura 5). Nas duas épocas foram coletadas amostras de folhas dos mesmos indivíduos. Para amostragem das folhas foi utilizado um podão. As folhas individuais foram coletadas com auxílio de uma tesoura de poda. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos e mantidas em caixas térmicas com gelo, até serem processadas no Laboratório de Microbiologia Molecular (ESALQ-USP). A média mensal de temperatura e precipitação pluviométrica da série histórica de 1950 a 2007 e dos períodos de coleta (2008, 2009), são apresentadas nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 6 – Temperatura média mensal (°C) e precipitação pluviométrica mensal (mm) (Série histórica de 1950 a 2007) registradas nos municípios de Sete Barras (A), Cananéia (B) e Assis (C), como referência de parâmetros climatológicos para as unidades de PECB, PEIC e EEA, respectivamente. Fonte: Instituto Agrônômico de Campinas

Figura 7 – Temperatura média mensal (°C) e precipitação pluviométrica mensal (mm) registradas nos municípios de Sete Barras (A), Cananéia (B) e Assis (C), como referência de parâmetros climatológicos para as unidades de PECB, PEIC e EEA, respectivamente. As coletas (indicadas pelas setas) foram realizadas nos meses de Agosto 2008, Fevereiro, Março e Julho de 2009. Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas

2.2.2 Análise da estrutura de comunidades de *Bacteria* por PCR-DGGE

2.2.2.1 Extração de DNA metagenômico da filosfera

Sob condições assépticas, entre 15 a 20 folhas foram acondicionadas em béqueres autoclavados (500 mL) contendo solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0) e sonicadas por 10 minutos a 22,5 kHz utilizando um disruptor de células ultrassônico (Microson TM, Misonix Inc., New York, USA). A solução tampão contendo a suspensão de células foi filtrada através de membrana de celulose (0,22 μ m, Millipore) e esta transferida para microtubos contendo grãos de sílica e duas esferas de cerâmica. Foi adicionado 1 mL da solução CLS-TC para bactérias do kit Fast DNA (MP Biomedicals, Ohio, USA), e a mistura homogeneizada utilizando um agitador Fast Prep FP120 (MP Biomedicals, Ohio, USA), à velocidade de 4 m s⁻¹ por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 g. Uma alíquota de 600 μ L da fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 600 μ L da solução com matriz de ligação e prosseguiu-se com inversão dos tubos por 5 minutos e incubação a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 1 minuto e o sobrenadante descartado. O pélete foi ressuspensionado em 500 μ L da solução de lavagem SEWS. A solução foi transferida para o filtro Spin Filter, o qual foi acoplado a um microtubo. Este conjunto foi centrifugado por duas vezes a 13.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado. O filtro foi, então, transferido para novo tubo e adicionaram-se 100 μ L da solução DES sobre a matriz de ligação contida no tubo. A matriz foi ressuspensionada cuidadosamente para solubilização do DNA. Essa mistura foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente, e centrifugou-se a 13.000 g por 1 minuto para recuperar o DNA eluído com DES. O DNA obtido foi armazenado a -20°C. A integridade do DNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando tampão TAE 1X, após ser corado com SYBR Green (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por fluorimetria usando um fluorômetro Qubit (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2.2.2 PCR-DGGE

A região V3 do gene rRNA 16S foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREAS et al., 1997). A amplificação do fragmento V3 do gene rRNA 16S foi realizada utilizando-se solução tampão para Taq DNA polimerase, contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos iniciadores e 1 µl do DNA metagenômico, totalizando 25 µl. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), sob as seguintes condições: 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C, e extensão final por 10 min a 72 °C. A concentração dos produtos da PCR (amplicons) foi determinada por fluorometria em fluorímetro Qubit (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A aquisição da imagem dos géis foi feita com um densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, São Paulo, Brasil) e o programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, Brasil). Quantidades iguais de DNA (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE), contendo 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m) a um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (solução desnaturante 100%, contém 40% de formamida e 7 M de uréia; solução 0%, sem uréia e formamida) (ØVREAS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e 60 °C, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, California, USA), e tampão TAE 1X. Após a coloração do DNA com “SYBR Green” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) a imagem do gel foi capturada por densitometria, utilizando-se um densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, São Paulo, Brasil).

2.2.2.3 Análise dos padrões de bandas gerados após DGGE

A similaridade entre as estruturas de comunidades de *Bacteria* foi determinada com base na presença ou ausência de bandas com a mesma mobilidade em gel após DGGE com a utilização do programa Diversity Database (BioRad, Hercules, California, USA). A partir de matrizes binárias foram feitas análises de agrupamento hierárquico, utilizando-se o coeficiente de

Jaccard para o cálculo de similaridade e o método UPGMA (*unweighted pair-group mean arithmetic method*) para elaboração do dendrograma, através do programa NTSYSpc v.2.01.

As relações entre as similaridades das estruturas das comunidades bacterianas e a distância geográfica entre as árvores amostradas foram determinadas através de funções de regressão. Para isso, foram utilizadas matrizes de similaridade com o coeficiente de Jaccard e matrizes de distância geográfica das possíveis combinações de pares de indivíduos amostrados. Foi realizada a busca do melhor modelo de regressão, sendo escolhido aquele que apresentou o maior coeficiente de determinação (r^2). Para verificar a significância do r^2 foi utilizado o Teste *t* de Student. A avaliação espaço temporal da estrutura da comunidade bacteriana foi realizada através de análise de escala multidimensional (*Non-metric Multidimensional Scaling* – MMDS), utilizando-se os dados de presença e ausência das bandas detectadas no gel após DGGE e o programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001). Subsequentemente uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre as áreas estudadas utilizando o mesmo programa.

2.2.3 Análise de comunidades de *Bacteria* através de sequenciamento de clones do gene rRNA 16S

2.2.3.1 Seleção das amostras

Para a construção das bibliotecas de clones da região V1-V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria*, foram selecionadas três amostras de cada uma das três áreas em estudo, tendo em consideração três pontos ao longo de uma linha diagonal, com os dois pontos extremos equidistantes do ponto central, a fim de ter maior representatividade da área. Assim, no PECB foram selecionados os indivíduos das sub-parcelas B12, E10 e J0 (Figura 3, Anexo 2), do PEIC os indivíduos B14, H07 e N02 (Figura 4, Anexo 2) e da EEA os indivíduos A14, F07 e M06 (Figura 5, Anexo 2). Nas duas épocas foram coletadas as mesmas árvores e construídas três bibliotecas de clones do gene rRNA 16S para cada área e épocas de coleta, perfazendo um total de 18 bibliotecas. Para tanto, foi utilizado o DNA metagenômico extraído da filosfera conforme descrito no item 2.3.2.1.

2.2.3.2 Amplificação da região V1-V3 do gene rRNA 16S

Para amplificação da região V1-V3 do gene rRNA 16S foram utilizados os seguintes iniciadores: PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (LAMBAIS et al., 2006). A amplificação foi realizada conforme descrito no item 2.2.2.2 e os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (TAE 1X) e visualizados por coloração com "SYBER Green" (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

2.2.3.3 Purificação dos amplicons

Amplicons foram purificados usando o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitex, Berlin, Alemanha). Para tanto, as bandas de DNA foram excisadas do gel de agarose e colocadas em microtubos de 1,5 mL e adicionada 1 mL de uma solução de solubilização. A mistura foi incubada a 50°C por 10 min, até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Adicionou-se 500 µL de uma solução de ligação misturando-se por inversão. Uma alíquota de aproximadamente 800 µL da amostra foi transferida para a coluna de purificação e centrifugada por 1 min a 13.200 g. Este processo foi então repetido com o volume restante da amostra. O eluente foi descartado e adicionou-se à coluna 500 µL de solução tampão de lavagem, seguido de centrifugação por 30 segundos a 13.200 g. A lavagem foi repetida uma vez mais, e após a centrifugação a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Para eluição do DNA, adicionou-se 20 µL de solução tampão de eluição diretamente na matriz da coluna, incubando-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 1 min a 13.200 g. O DNA recuperado no microtubo foi utilizado para ligação ao vetor de clonagem.

2.2.3.4 Clonagem dos amplicons do gene rRNA 16S

Os amplicons de DNA purificados foram quantificados por fluorimetria em fluorímetro Qubit (Invitrogen, São Paulo, Brasil), a fim de determinar a quantidade adequada a ser utilizada na reação de ligação. Esses fragmentos foram ligados ao vetor pGEM-T Easy Vector (Promega,

Madison, Wisconsin, USA), conforme especificações do fabricante. A reação de ligação dos produtos da PCR ao plasmídeo pGEM-T Easy foi realizada em tampão de ligação rápida 2X contendo 3U de DNA ligase T4. O material foi incubado a 4°C durante a noite. Posteriormente, células competentes de *E. coli* DH5 α (200 μ L) foram transformadas por choque térmico (gelo por 30 minutos, banho-maria 42°C por 30 segundos e gelo por 2 minutos) utilizando-se a reação de ligação obtida. Posteriormente foi adicionado 1 mL de meio CG (Circlegrow, MP Biomedicals, Ohio, USA) e incubado sob agitação (agitador incubador Innova 4300, LabX, Midland, Canadá) a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Após o plaqueamento das células transformadas em meio sólido CG contendo ampicilina (100 mg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside), as mesmas foram incubadas a 37°C por 12 horas.

2.2.3.5 Extração do DNA plasmidial

Após o desenvolvimento das colônias, foram selecionadas aquelas que continham plasmídeos recombinantes. Estas foram cultivadas em placas altas de crescimento (96 poços) contendo 1 mL de meio CG líquido com ampicilina (100 mg mL⁻¹) a 37°C sob agitação (300 rpm) durante 18 horas e seladas com adesivo. O meio foi centrifugado a 2.254 g por 6 min e 20°C. O pélete foi lavado com 240 μ L de uma solução contendo 25mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA (pH 8,0) e 50 mM de glicose e agitado em vórtex por 2 minutos para ressuspender o pélete. Em seguida, as suspensões bacterianas foram centrifugadas por 6 minutos a 2.254 g para sedimentação das células. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 80 μ L da mesma solução e as células ressuspendidas por agitação. Para uma placa de fundo “U” (96 poços) contendo 1 μ L de RNase em cada poço (10 mg mL⁻¹), foram transferidos 60 μ L de cada suspensão de células. Em cada poço da placa foram adicionados 60 μ L da solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,2 N). A placa foi selada, homogeneizada por inversão e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação rápida, foram adicionados 60 μ L de uma solução contendo acetato de potássio 3 M e 10% de ácido acético glacial, misturando-se por inversão. A placa foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, e incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo, a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos. O adesivo foi recolocado e a placa centrifugada a 2.254 g por 4 minutos e 20°C. Em seguida, transferiu-se 100 μ L do sobrenadante para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22) fixada sobre uma placa

fundo “V” de 250 µL, e o conjunto centrifugado (sem a tampa) a 2.254 g por 4 minutos e 4 °C. Ao filtrado adicionou-se 100 µL de isopropanol gelado e em seguida centrifugou-se a 2.254 g por 45 minutos a 4°C. O precipitado de DNA foi então lavado com 180 µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 4.000 g por 5 minutos e 4°C. Após o descarte do sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel absorvente e centrifugou-se a 1.140 g por 1 minuto e 4 °C. Após secar durante 1 hora a temperatura ambiente, o DNA foi ressolubilizado em 80 µL de água ultrapura esterilizada, durante a noite. As placas foram estocadas a -20°C para serem posteriormente utilizada no sequenciamento do DNA.

2.2.3.6 Sequenciamento de clones do gene rRNA 16S

Para o sequenciamento dos clones de fragmentos do gene rRNA 16S utilizou-se uma alíquota de 200-500 ng do DNA plasmidial, 10 pmol do iniciador M13f (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') 1 µL de *DYEnamic ET Terminator* (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), 2 µL de solução tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultra pura para um volume final de 10 µL. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) nas seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos da PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95% gelado. As suspensões foram centrifugadas a 2.254 g por 45 minutos, e o pélete lavado com etanol 70%, gelado. O pélete foi seco no escuro por no mínimo 2 horas, re-solubilizado em formamida e desnaturado a 96 °C por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante.

2.2.3.7 Análise das sequências do gene rRNA 16S

As sequências de nucleotídeos geradas pelo sequenciamento dos clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* foram inicialmente processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de sequências do vetor e de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20, representando menos de um erro a cada 100 bases lidas).

Para a afiliação filogenética das sequências obtidas utilizou-se o algoritmo Classifier, do Ribosomal Database Project (RDP), o qual compara cada sequência do gene rRNA 16S com as sequências depositadas na base de dados do RDP, e com base na distância evolutiva entre as sequências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define a possível afiliação em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento das sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, as sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X 2.0 (LARKIN et al., 2007) com os parâmetros *gap-opening penalty* de 10,0 e *gap-extention penalty* de 0,1 para *pairwise* e *multiple alignment*, e demais definições de parâmetros padrões. O alinhamento foi utilizado para o cálculo de uma matriz de distância evolutiva com o programa DNADIST do pacote PHYLIP 3.66 (FELSENSTEIN, 2006), usando o algoritmo de Jukes-Cantor para correção das distâncias.

Os números de UTOs e de sequências de cada UTO foram computados para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e recíproco de Simpson, e para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao 1 (CHAO, 1987; CHAO; LEE, 1992), além da estimativa da cobertura de amostragem, com o programa SPADE (CHAO; SHEN, 2009; <http://chao.stat.nthu.edu.tw>).

A comparação entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) após o alinhamento das sequências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima. Uma análise NMDS foi realizada utilizando-se o número de UTOs estimado pelo DOTUR para as bibliotecas de cada unidade e época através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001), seguida de análise de similaridade (ANOSIM) para determinar diferenças estatísticas entre as unidades e épocas utilizando o mesmo programa.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Estrutura da comunidade bacteriana da filosfera

A estrutura da comunidade bacteriana da filosfera de *Maytenus robusta* com base nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S, detectados após DGGE, é apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Perfil de amplicons do gene rRNA 16S de *Bacteria* após PCR-DGGE e Agrupamentos hierárquicos dos diferentes tratamentos gerados com o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA. PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca, PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa, PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca, PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa, EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca e EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. M = marcador. Os códigos A03, B12, C07, E10, E11 e J00, correspondem às seis amostras coletadas no PECB-S e PECB-C. Os códigos B14, E11, F10, G08, H07, I08, I08B, J04, J05 e N02, correspondem às dez amostras coletadas no PEIC-S e PEIC-C. Os códigos A14, C11, E09, F09, F07, G05, H06, I06, M06 e M07, correspondem às dez amostras coletadas na EEA-S e EEA-C

Nos dendrogramas de cada tratamento (Figura 8), PECB-S (Parque Estadual Carlos Botelho época seca), PECB-C (Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa), PEIC-S (Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca), PEIC-C (Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa), EEA-S (Estação Ecológica de Assis época seca) e EEA-C (Estação Ecológica de Assis época chuvosa), observam-se agrupamentos de comunidades bacterianas que variam entre as épocas de uma mesma unidade e entre diferentes unidades.

Assim, no tratamento PECB-S observa-se agrupamento de comunidades bacterianas de indivíduos geograficamente distantes como A03 e B12 (175 m, Anexo 2) e de indivíduos com menor distância como E10 e E11 (28 m, Anexo 2), demonstrando diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os indivíduos (Figura 8). Diferente padrão de similaridade é observado no tratamento PECB-C, onde comunidades de bactérias próximas se agrupam (E10 e E11, 28 m, Anexo 2) e comunidades de indivíduos distantes ficam separadas (B12 e J0, 277 m, Anexo 2) (Figura 8), observando-se nesta época, além de diferenças na estrutura das comunidades bacterianas, correlação negativa entre similaridade da estrutura da comunidade bacteriana e distância geográfica entre os indivíduos.

Em relação ao tratamento PEIC-S, observa-se agrupamentos das comunidades bacterianas de indivíduos próximos como I08 e I08B (7 m, Anexo 2), no entanto, essas se agrupam com um indivíduo distante (N02, 155 m, Anexo 2). Assim mesmo, comunidades bacterianas de indivíduos com distâncias menores a 70 m como H07 e J04 também se agrupam. Observa-se por outro lado, que comunidades de indivíduos distantes como B14 e N02 (334 m, Anexo 2) não apresentam similaridade (Figura 8). Já no tratamento PEIC-C, observase-se similaridade entre indivíduos relativamente próximos como F10 e H07 (70 m, Anexo 2) e entre indivíduos com maior distância como E11 e J05 (149 m, Anexo 2). Por outro lado, observa-se que não existe similaridade entre as sub-parcelas B14 e N02, (334 m, Anexo 2) (Figura 8). Por tanto, em ambos os tratamentos observa-se heterogeneidade da comunidade bacteriana entre os indivíduos de um mesmo tratamento e entre épocas diferentes.

No tratamento EEA-S observa-se um padrão semelhante aos tratamentos anteriores. As estruturas das comunidades bacterianas de indivíduos próximos como H06 e I06 (39 m, Anexo 2) e E09 e F07 (47 m, Anexo 2) apresentam alta similaridade (coeficiente de Jaccard = 0,81). No entanto, indivíduos também próximos (A14 e C11, 58 m, Anexo 2) não se agrupam (Figura 8). Já, no tratamento EEA-C observa-se agrupamento das comunidades dos indivíduos próximos F07

e G05 (39 m, Anexo 2) assim como entre A14 e C11 (58 m, Anexo 2), no entanto, indivíduos distantes também se agrupam (H06 e M06, 117 m). Assim mesmo, não se observa agrupamento entre indivíduos distantes como A14 e M07 (264 m, Anexo 2) (Figura 8), demonstrando heterogeneidade nas estruturas das comunidades bacterianas nos dois tratamentos.

Os resultados mostram que as comunidades bacterianas apresentam variações em sua estrutura em função do indivíduo amostrado e do ambiente do qual ele foi amostrado. Uma análise geral da correlação entre similaridade (coeficiente de Jaccard) da estrutura da comunidade e distância geográfica (metros) entre todos os pares de indivíduos de cada um dos tratamentos é apresentada no item a seguir.

2.3.2 Variação espacial da estrutura das comunidades bacterianas da filosfera

Complementando as análises realizadas pelo agrupamento hierárquico e com a finalidade de verificar se as estruturas de comunidades de bactérias da filosfera de árvores geograficamente mais próximas entre si apresentam maior similaridade entre si do que com as de árvores geograficamente mais distantes, foi feita uma análise de regressão usando os dados da matriz de similaridade (coeficiente de Jaccard) e os dados da matriz de distância geográfica (metros) entre as árvores, nas diferentes unidades e épocas (Figuras 9, 10 e 11). Foi feita a escolha do modelo de regressão que maior r^2 apresentou, resultando em modelos logarítmicos para os tratamentos da época seca e em modelos exponenciais para a época chuvosa.

Assim, em relação à coleta no PECB na época seca (Figura 9A), pode-se observar uma baixa correlação negativa entre as variáveis, não revelando diferença significativa estatisticamente entre elas ($r^2 = 0,134$; $p > 0,05$). Já na coleta da época chuvosa (Figura 9B), observou-se uma correlação negativa significativa estatisticamente entre as duas variáveis ($r^2 = 0,373$; $p < 0,05$).

Em relação ao PEIC na época seca (Figura 10A), observa-se também correlação negativa e significativa estatisticamente entre as variáveis ($r^2 = 0,374$; $p < 0,05$). Na coleta da época chuvosa (Figura 10B), a correlação negativa entre as variáveis é menor, mas significativa estatisticamente ($r^2 = 0,179$; $p < 0,05$).

Na EEA, apresenta-se também correlação negativa significativa estatisticamente nas épocas seca ($r^2 = 0,253$; $p < 0,05$) (Figura 11A) e chuvosa ($r^2 = 0,268$; $p < 0,05$) (Figura 11B).

Figura 9 - Correlação entre similaridade das estruturas das comunidades de bactérias da filosfera e distância geográfica das árvores de *Maytenus robusta* amostradas no Parque Estadual Carlos Botelho, época seca (A) e época chuvosa (B). r^2 = coeficiente de determinação. n = número de dados

Figura 10 - Correlação entre similaridade das estruturas das comunidades de bactérias da filosfera e distância geográfica das árvores de *Maytenus robusta* amostradas no Parque Estadual Ilha do Cardoso, época seca (A) e época chuvosa (B). r^2 = coeficiente de determinação. n = número de dados

Figura 11 - Correlação entre similaridade das estruturas das comunidades de bactérias da filosfera e distância geográfica das árvores de *Maytenus robusta* amostradas na Estação Ecológica de Assis, época seca (A) e época chuvosa (B). r^2 = coeficiente de correlação. n = número de dados

Com exceção dos resultados obtidos na época seca do PECB, que apresentou correlação negativa não significativa pelo teste t ($p > 0,05$), todos os outros tratamentos apresentaram correlação negativa significativa (teste t , $p < 0,05$) tanto na época seca como na época chuvosa, variando, no entanto, o coeficiente de determinação entre eles. Esta variação pode ser atribuída à influência de fatores intrínsecos de cada Unidade de Conservação, entre eles, o tipo de vegetação, as espécies vegetais que rodeiam ao indivíduo amostrado, a altura das plantas que formam a vegetação das Unidades, assim como a presença de algumas clareiras abertas naturalmente, fatos que ocasionam diferenças na intensidade luminosa e alterações da umidade e temperatura, originando micro climas próprios em cada parcela (JACQUES; KINKEL; MORRIS 1995; RODRIGUES, et al., 2008a).

Um dos principais fatores que influenciam a distribuição de microrganismos é a temperatura. Ward et al. (1998), utilizando a técnica de DGGE, estudaram as mudanças da estrutura das comunidades de cianobactérias em canais de fontes termais do Parque Nacional de Yellowstone em relação à temperatura. Os pesquisadores observaram mudanças na estrutura da comunidade de cianobactérias ao avaliar locais com temperaturas diferentes. Da mesma forma, Fierer et al (2009) avaliando a distribuição de bactérias amônio-oxidantes obtidas de solos de diferentes ecossistemas norte-americanos, encontraram que a temperatura teve uma forte influência na seleção de linhagens deste grupo. Uma provável explicação para as diferenças observadas nos coeficientes de correlação dos diferentes tratamentos e principalmente na correlação não significativa ($r^2 = 0,134$; $p > 0,05$) determinada na época seca no PECB poderia estar relacionada com este fator, o qual estaria ocasionando diferenças na estrutura de comunidades entre uma época a outra.

Os resultados são consistentes com o trabalho de Cho e Tiedje (2000), os quais caracterizaram a distribuição espacial de genótipos de *Pseudomonas* e encontraram que a similaridade dos isolados estava negativamente correlacionada com distâncias entre as amostras (5 m a 80 Km). No presente trabalho as menores e maiores distâncias entre as árvores amostradas foram de 28,69 a 277,41 m para o PECB, 7,76 a 334,53 m para o PEIC e 20,48 a 289,75 m para a EEA (Anexo 2) e a distância entre as unidades de: 115 Km entre PECB e PEIC, 300 Km entre PECB e EEA e 375 Km entre PEIC e EEA. De modo semelhante, Papke et al. (2003) estudando a diversidade genética de comunidades de cianobactérias nos EUA, Japão, Nova Zelândia e Itália determinaram a existência de isolamento geográfico de populações de cianobactérias, tanto em

escala global (entre continentes) como local (distâncias de quilômetros). Whitaker, Grogan e Taylor (2003) também observaram correlação negativa entre a similaridade genética e a distância geográfica ao estudar a diversidade de isolados de arquea *Sulfolobus* de cinco regiões, separadas por mais de 250 km.

Embora os trabalhos descritos anteriormente tenham sido conduzidos com isolados de ambientes marinhos ou terrestres (solo), utilizando métodos dependentes de cultivo, a correlação negativa e significativa estatisticamente observada neste trabalho, entre a similaridade das estruturas das comunidades bacterianas da filosfera de *Maytenus robusta* e a distância geográfica entre as árvores, na maioria dos tratamentos avaliados (PECB-C, PEIC-S, PEIC-C, EEA-S e EEA-C), fornecem evidências para suportar a hipótese de que a similaridade entre as comunidades bacterianas na filosfera de árvores da mesma espécie, em um mesmo ambiente, diminui com a distância geográfica entre as árvores, sugerindo a existência de isolamento geográfico de diferentes populações e subsequentemente divergência genética. Este padrão biogeográfico, em plantas e animais, é descrito quase como uma regra natural (NEKOLA; WHITE, 1999; SOININEN; McDONALD; HILLEBRAND, 2007) e pelos estudos descritos anteriormente e os resultados obtidos neste trabalho, poderia se dizer que também esta presente nos microrganismos.

No entanto, recentemente, Redford et al. (2010), ao avaliar a influência espacial na filosfera de *Pinus ponderosa*, determinaram mínima influência da distância geográfica na comunidade bacteriana, sugerindo que fatores intrínsecos à morfologia da superfície foliar e características típicas na formação de biofilmes também poderiam estar influenciando no desenvolvimento de cada comunidade bacteriana na filosfera e que a similaridade genética que poderia existir com outras comunidades, estaria sendo afetada pelo conjunto de fatores bióticos e abióticos presentes num determinado ambiente, os quais são discutidos no decorrer do texto.

2.3.3 Relação espaço temporal entre comunidades de bactérias da filosfera

Considerando os dados de presença e ausência de bandas do gene rRNA 16S detectadas no gel após DGGE, foi realizada a análise NMDS dos diferentes tratamentos com o objetivo de determinar a influência espacial e temporal sobre a estrutura das comunidades bacterianas da filosfera de *Maytenus robusta*. Baseada na representação bidimensional das amostras, a Figura 12

mostra a distribuição dos grupos constituídos pelas unidades e épocas (PECB-S, PECB-C, PEIC-S, PEIC-C, EEA-S e EEA-C; Figura 12A) para determinar a influência temporal e a distribuição dos grupos constituídos somente pelas unidades (PECB, PEIC e EEA; Figura 12B) para determinar a influência espacial.

Figura 12 - Análise de escala multidimensional (NMDS) utilizando-se os dados de presença e ausência das bandas de DNA do gene rRNA 16S após PCR-DGGE entre as diferentes unidades e épocas (A) e entre as unidades (B). PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca. PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa. PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca. PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa. EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca. EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa

Complementando a representação gráfica obtida pela NMDS, uma ANOSIM foi aplicada com o objetivo de discriminar as áreas e épocas, testando as diferenças entre os valores médios de similaridade entre as amostras dentro de uma mesma unidade e entre amostras de épocas diferentes. Após a avaliação realizada entre os diferentes tratamentos, a ANOSIM não revelou diferenças significativas estatisticamente entre as épocas, seca e chuvosa, em uma mesma unidade (PECB-S e PECB-C, PEIC-S e PEIC-C e EEA-S e EEA-C), segundo o teste *Pairwise* (pareamento) ($R_{\text{global}} = 0,74$; $p < 0,001$; Tabela 1), demonstrando mínima influência temporal sobre a estrutura da comunidade de bactérias. Fatores climáticos entre uma época e outra, consequentemente, não seriam parâmetros determinantes da estrutura das comunidades de bactérias na filosfera de *Maytenus robusta*.

No entanto, quando se avaliam as diferenças entre os pares de tratamentos das diferentes unidades e épocas, observa-se diferenças significativas na maioria delas (PECB-S e PEIC-S, PECB-S e PEIC-C, PECB-S e EEA-S, PECB-S e EEA-C, PECB-C e PEIC-S, PECB-C e EEA-S, PECB-C e EEA-C, PEIC-S e EEA-S, PEIC-S e EEA-C, PEIC-C e EEA-S) ($R_{\text{global}} = 0,74$; $p < 0,001$; Tabela 1), sendo mais evidente entre as unidades PECB e EEA ($R_{\text{global}} = 0,697$; $p < 0,001$) (Tabela 1), demonstrando influência espacial sobre a estrutura da comunidade de bactérias.

Tabela 1 – Resultado do teste *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S após DGGE, das diferentes áreas e épocas. PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca. PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa. PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca. PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa. EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca. EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. (R global = 0,74; $*p < 0,001$). O R global para os tratamentos referentes às unidades (PECB, PEIC e EEA) é de 0,697. ($*p < 0,001$)

Tratamentos	Teste <i>Pairwise</i>
PECB-S, PECB-C	0,028
PECB-S, PEIC-S	0,809*
PECB-S, PEIC-C	0,859*
PECB-S, EEA-S	0,960*
PECB-S, EEA-C	0,879*
PECB-C, PEIC-S	0,794*
PECB-C, PEIC-C	0,734
PECB-C, EEA-S	0,929*
PECB-C, EEA-C	0,815*
PEIC-S, PEIC-C	0,627
PEIC-S, EEA-S	0,942*
PEIC-S, EEA-C	0,846*
PEIC-C, EEA-S	0,864*
PEIC-C, EEA-C	0,719
EEA-S, EEA-C	0,553
PECB, PEIC	0,632
PECB, EEA	0,813*
PEIC, EEA	0,689

Os resultados são consistentes, considerando-se que cada uma das unidades apresenta características próprias de vegetação, i. e., Floresta Ombrófila Densa no PECB, Floresta de Restinga no PEIC e Cerradão na EEA. A diferença significativa observada entre PECB e EEA é mais evidente pelo fato de que ambas formações florestais são muito diferentes com características típicas de tamanho e diversidade das espécies arbóreas, incidência de luz, velocidade do vento, entre outros. Rodrigues et al. (2008a) determinaram que a similaridade florística entre as três formações florestais (PECB, PEIC e EEA) é muito baixa, inferior a 12% pelo índice de Jaccard.

A confirmação da sensibilidade do teste de NMDS em discriminar as áreas estudadas quanto à diferente estruturação de suas comunidades bacterianas será apresentada mais adiante através da análise de clones de sequências do gene rRNA 16S obtidas em cada área e época de estudo.

2.3.4 Sequenciamento de clones do gene rRNA 16S

2.3.4.1 Afiliação filogenética de sequências dos clones do gene rRNA 16S

A diversidade de bactérias na filosfera de *Maytenus robusta* foi avaliada através do sequenciamento da região V1-V3 do gene rRNA 16S, amplificada a partir do DNA metagenômico extraído da filosfera. As três amostras selecionadas de cada tratamento (PECB-S, PECB-C, PEIC-S, PEIC-C, EEA-S e EEA-C) em função de suas posições equidistantes dentro da parcela, a fim de ter maior representatividade da área, receberam uma nova codificação para facilitar as análises. Assim, B12, E10 e J0, selecionadas do PECB, foram designadas como 1S, 2S e 3S para o PECB-S e 1C, 2C e 3C para o PECB-C. As amostras B14, H07 e N02, do PEIC, receberam os códigos 4S, 5S, e 6S para o PEIC-S e 4C, 5C e 6C para o PEIC-C. Já as amostras A14, F07 e M06, selecionadas da EEA, foram designadas como 7S, 8S e 9S para a EEA-S e 7C, 8C e 9C para a EEA-C.

A afiliação filogenética das sequências foi feita utilizando-se a versão 2.2 de março de 2010 do algoritmo Classifier do RDP. A Tabela 2 mostra a relação de frequências dos táxons bacterianos nos diferentes tratamentos.

Tabela 2 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera de *Maytenus robusta* nos tratamentos: Parque Estadual Carlos Botelho época seca (PECB-S), Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa (PECB-C), Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca (PEIC-S), Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa (PEIC-C), Estação Ecológica de Assis época seca (EEA-S) e Estação Ecológica de Assis época chuvosa (EEA-C). Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa C)

(continuação)																						
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PECB-S			PECB-C			PEIC-S			PEIC-C			EEA-S			EEA-C		
					1S	2S	3S	1C	2C	3C	4S	5S	6S	4C	5C	6C	7S	8S	9S	7C	8C	9C
Bacteria_Incertae_sedis	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	1,1	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	3,8	ND	ND	4,0	ND	ND	ND	ND	2,2	ND	ND
Bacteroidetes	ND				ND	ND	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,4	1,5	2,4	ND	ND	1,1
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Dysgonomonas	ND	ND	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND			4,5	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	1,1	2,3	ND
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND		ND	ND	3,9	3,9	ND	3,8	ND	1,3	1,6	ND	ND	1,1	ND	2,9	6,1	1,1	1,2	5,7
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	ND	ND	ND	2,6	ND	ND	3,8	1,2	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Cytophagaceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,6	1,2	1,3	ND	1,1	ND	ND	1,2	1,5	2,4	ND	ND	1,1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Cytophagaceae	Hymenobacter	ND	1,2	3,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,5	2,4	ND	1,2	1,1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Cytophagaceae	Spirosoma	2,2	1,2	2,6	1,3	1,1	1,3	ND	2,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,7	ND	3,5	3,4
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,3	1,2	ND	3,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Mucilaginibacter	5,6	ND	1,3	1,3	ND	1,3	1,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	3,3	ND	ND
Cyanobacteria	ND				1,1	ND	ND	ND	4,5	1,3	ND	1,3	1,6	ND	1,3	2,3	ND	2,9	ND	ND	ND	ND
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND			7,8	2,4	6,5	24,7	ND	ND	ND	10,3	4,9	6,4	2,7	1,1	ND	25	ND	11	ND	ND
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND	Family I	GPI	ND	ND	ND	2,6	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 2 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera de *Maytenus robusta* nos tratamentos: Parque Estadual Carlos Botelho época seca (PECB-S), Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa (PECB-C), Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca (PEIC-S), Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa (PEIC-C), Estação Ecológica de Assis época seca (EEA-S) e Estação Ecológica de Assis época chuvosa (EEA-C). Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa C)

(continuação)																						
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PECB-S			PECB-C			PEIC-S			PEIC-C			EEA-S			EEA-C		
					1S	2S	3S	1C	2C	3C	4S	5S	6S	4C	5C	6C	7S	8S	9S	7C	8C	9C
Proteobacteria	ND				4,5	8,5	1,3	9,1	4,5	9,0	3,5	1,3	6,6	2,1	1,3	8,0	3,7	5,9	ND	1,1	2,3	8,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND			5,6	4,9	2,6	5,2	4,5	2,6	18,8	7,7	13,1	10,6	20,0	12,5	29,3	4,4	9,8	11,0	19,8	6,8
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae		1,1	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND		12,4	7,3	11,7	10,4	19,1	9,0	15,3	1,3	4,9	5,3	18,7	9,1	23,2	7,4	12,2	17,6	22,1	8,0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND	4,5	ND	5,2	6,5	4,5	ND	2,4	6,4	ND	8,5	2,7	3,4	2,4	ND	ND	2,2	1,2	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylovirgula	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND	2,2	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	1,2	ND	1,2	1,1	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Agromonas	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	1,1	ND	ND	1,2	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	ND	2,4	ND	1,3	1,1	ND	ND	ND	ND	3,2	ND	ND	ND	ND	4,9	2,2	3,5	2,3
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Devosia	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND		ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	3,8	3,3	ND	4,0	1,1	ND	1,5	ND	3,3	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Rhodopila	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	ND		ND	2,4	1,3	ND	2,2	ND	7,1	1,3	3,3	ND	2,7	ND	2,4	ND	2,4	ND	2,3	1,1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	ND	6,7	4,9	5,2	2,6	5,6	3,8	8,2	5,1	3,3	6,4	1,3	6,8	2,4	4,4	6,1	15,4	11,6	11,4

Tabela 2 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera de *Maytenus robusta* nos tratamentos: Parque Estadual Carlos Botelho época seca (PECB-S), Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa (PECB-C), Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca (PEIC-S), Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa (PEIC-C), Estação Ecológica de Assis época seca (EEA-S) e Estação Ecológica de Assis época chuvosa (EEA-C). Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa C)

																						(continuação)
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	PECB-S			PECB-C			PEIC-S			PEIC-C			EEA-S			EEA-C		
					1S	2S	3S	1C	2C	3C	4S	5S	6S	4C	5C	6C	7S	8S	9S	7C	8C	9C
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	1,1	1,2	ND	ND	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	3,4	1,2	2,6	ND	3,4	1,3	ND	1,3	ND	6,4	ND	2,3	ND	ND	2,4	4,4	7,0	ND
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND		1,1	2,4	1,3	ND	ND	ND	1,2	1,3	ND	1,1	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	1,1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae_sedis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	1,1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae_sedis	Aquabacterium	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	1,3	ND	1,1	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,3	ND	ND
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND			ND	1,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	1,1	ND	ND
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	ND		1,1	1,2	1,3	ND	ND	2,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	1,1
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	3,4
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	Cystobacter	3,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,7	ND	ND	3,4
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,5	ND	1,1	ND	ND
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	Byssovorax	4,5	ND	ND	1,3	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	1,1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND			ND	1,2	ND	ND	ND	2,6	2,4	ND	1,6	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND	ND	1,1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND	ND	1,2	1,3	3,9	1,1	15,4	7,1	2,6	4,9	11,7	ND	18,2	ND	ND	1,2	ND	2,3	4,5

Tabela 2 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera de *Maytenus robusta* nos tratamentos: Parque Estadual Carlos Botelho época seca (PECB-S), Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa (PECB-C), Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca (PEIC-S), Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa (PEIC-C), Estação Ecológica de Assis época seca (EEA-S) e Estação Ecológica de Assis época chuvosa (EEA-C). Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa C)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	(conclusão)																	
					PECB-S			PECB-C			PEIC-S			PEIC-C			EEA-S			EEA-C		
					1S	2S	3S	1C	2C	3C	4S	5S	6S	4C	5C	6C	7S	8S	9S	7C	8C	9C
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea	ND	ND	ND	ND	7,9	1,3	ND	ND	ND	2,1	14,7	1,1	ND	1,5	1,2	ND	ND	4,5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	5,6	ND	1,3	ND	1,1	17,9	1,2	ND	ND	4,3	2,7	6,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Enhydrobacter	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	ND	ND	6,1	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	ND	ND	2,3
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	ND	30,5	2,6	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	ND	ND	12,5
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TM7	TM7			Incertae_sedis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,2	1,2

ND* = Não Detectado

As sequências das amostras 1S, 2S e 3S do tratamento PECB-S foram afiliadas a seis, quatro e cinco filos, respectivamente (Figura 13). Bactérias do filo *Proteobacteria* foram as mais frequentes representando 58,4, 76,8 e 45,5% das sequências em 1S, 2S e 3S, respectivamente. O segundo filo de maior ocorrência foi *Acidobacteria* com 6,7, 12,2 e 22,1% das sequências, respectivamente. Filos como *Bacteroidetes* e *Cyanobacteria* estiveram representados com menor frequência e *Actinobacteria* foi observado somente em 1S e 3S. O filo *Bacteria_incertain_sedis* só foi observado na amostra 1S, com 1,1% das sequências (Figura 13). Em relação às amostras 1C, 2C e 3C do PECB-C, a distribuição das frequências teve um padrão semelhante, sendo o filo *Proteobacteria* o mais abundante com 42,9, 62,9 e 67,9% das sequências. No entanto, a amostra 1C apresentou um incremento no filo *Cyanobacteria*, constituindo aproximadamente 27,3% de suas sequências. Com menores frequências estiveram representados os filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. Nesta época de coleta na amostra 2C também foi detectado o filo *Bacteria_incertain_sedis*, (1,1%).

As amostras 4S, 5S e 6S do PEIC-S, apresentaram também, como filo de maior frequência, *Proteobacteria*, representando aproximadamente 68,2, 37,2 e 50,8% das sequências destas amostras. Com menores frequências estiveram representados, nas três amostras, os filos *Acidobacteria* e *Bacteroidetes* com frequências que variaram entre 5,1 e 14,1%. O filo *Actinobacteria* foi detectado nas amostras 4S e 5S e *Cyanobacteria* nas amostras 5S e 6S. Na amostra 5S foi detectado também o filo *Bacteria_incertain_sedis* com 5,1% das sequências (Figura 13). O padrão de filos nas amostras 4C, 5C e 6C, do PEIC-C, foi mais homogêneo. O filo *Proteobacteria* representou aproximadamente 67, 69,3 e 75% das sequências. Com menor frequência, foram detectados os filos *Acidobacteria* e *Cyanobacteria*. Na amostra 4C foram detectados os filos *Actinobacteria* (4,3%) e *Firmicutes* (2,1%). Este último só foi detectado nesta amostra. O filo *Bacteroidetes* foi detectado em 1,1% das sequências nas amostras 4C e 6C. Na amostra 5C, o filo *Bacteria_incertain_sedis* representou 5,3% das sequências, coincidindo com a amostra 5S da época seca (Figura 13).

Figura 13 - Frequência relativa de sequências de rRNA 16S de *Bacteria* classificadas em diferentes filós nos diferentes tratamentos. PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca. PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa. PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca. PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa. EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca e EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa (C), ND = não detectado

Nas amostras 7S, 8S e 9S do tratamento EEA-S foram detectados os filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes*, sendo *Proteobacteria* o mais frequente, com aproximadamente 67,1, 26,5 e 56,1% das sequências respectivamente. Além destes filos, na amostra 8S foram detectados os filos *Actinobacteria* e *Cyanobacteria* (Figura 13). Nas amostras 7C, 8C e 9C, do tratamento EEA-C, foi detectado um padrão semelhante ao da época seca. O filo *Proteobacteria*, como em todas as amostras analisadas, foi detectado em maior frequência, representando 63,7, 74,4 e 75% das sequências, respectivamente. Nestas amostras (7C, 8C e 9C) também foram detectados os filos *Acidobacteria* (11, 8,2 e 5,6% respectivamente) e *Bacteroidetes* (6,6, 8,2 e 13,5% respectivamente). Além disso, na amostra 7C foram detectados os filos *Actinobacteria* (2,2%) e *Cyanobacteria* (9%). O grupo *Candidate division TM7* foi detectado nas amostras 8C e 9C (1,2% em ambos os casos), sendo estas amostras as únicas a este filo (Figura 13).

De maneira geral, a distribuição dos filos em todas as amostras, mostrou que *Proteobacteria* foi o filo mais frequente, representando entre 26,5 e 76,8% das sequências em amostras de uma mesma época e entre as amostras de épocas e áreas diferentes. Observa-se também que todas as amostras apresentaram, em proporções menores, o filo *Acidobacteria*, e entre 3,3 e 27,9% das sequências das diferentes amostras, não puderam ser classificadas ao nível de filo (Tabela 2, Figura 13).

Dentro dos oito filos detectados, as sequências foram afiliadas a doze classes (Figura 14). No PECB-S, as amostras 1S, 2S e 3S apresentaram certa heterogeneidade na distribuição das classes. Em 1S e 3S, a classe mais frequente foi *Alphaproteobacteria* (38,1 e 32,5%, respectivamente) e em 2S foi *Gammaproteobacteria* (39,2%). As classes *Acidobacteria*, *Sphingobacteria*, *Cyanobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria* foram detectadas nas três amostras, porém em menores frequências. Além disso, a classe *Actinobacteria* foi detectada nas amostras 1S e 3S e *Ktedonobacteria* somente na amostra 1S (1,1%) (Figura 14). Nas amostras da época chuvosa (1C, 2C e 3C), as classes com maior frequência foram também *Alphaproteobacteria* para as amostras 1C (26%) e 2C (44,8%) e *Gammaproteobacteria* para a amostra 3C (38,5%). Além dessas classes, nas três amostras, foram detectadas *Acidobacteria*, *Sphingobacteria* e *Deltaproteobacteria* com frequências entre 1,1 e 14,1% aproximadamente. As classes *Ktedonobacteria* e *Betaproteobacteria* somente foram detectadas na amostra 2C (1% para ambas as classes) e *Cyanobacteria* na amostra 1C (27%) (Figura 14).

Figura 14 - Frequência relativa de sequências de rRNA 16S de *Bacteria* classificadas em diferentes classes nos diferentes tratamentos. PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca. PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa. PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca. PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa. EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca e EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa (C), ND = não detectado

Em relação à distribuição das classes nas amostras 4S, 5S e 6S do PEIC-S, nas três amostras foram detectadas as classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Sphingobacteria*, sendo *Alphaproteobacteria* a que apresentou maior frequência (53, 29,5 e 31,1%, respectivamente). A classe *Actinobacteria* foi detectada nas amostras 4S (1,2%) e 5S (5,1%) e *Cyanobacteria* nas amostras 5S (11,6%) e 6S (4,9%). A classe *Ktedonobacteria* somente foi detectada na amostra 5S (5,1%) e *Bacteroidia* na amostra 6S (1,6%) (Figura 14). Na época chuvosa, as amostras 4C, 5C e 6C do PEIC-C, apresentaram uma distribuição de classes semelhante ao PEIC-S. A classe *Alphaproteobacteria* foi a observada em maiores frequências (42,6, 49,4 e 37,4%, respectivamente). Foram detectadas também as classes *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* com frequências entre 1,1 e 27,4% das sequências analisadas. A classe *Sphingobacteria* foi detectada nas amostras 4C e 6C, em ambos os casos representando 1,1% das sequências. Além disso, na amostra 4C foram detectadas as classes *Actinobacteria* (4,3%) e *Bacilli* (2,1%) e na amostra 5C a classe *Ktedonobacteria* (5,3%) (Figura 14).

Nas amostras 7S e 9S da EEA-S, a classe com maior frequência foi *Proteobacteria* (60,9 e 43,8%, respectivamente), enquanto que na amostra 8S foi *Cyanobacteria* (25%). As classes *Acidobacteria*, *Sphingobacteria* e *Gammaproteobacteria* foram detectadas nas três amostras, com frequências entre 2,4 e 20,8% das sequências analisadas. A classe *Deltaproteobacteria* foi detectada nas amostras 8S (1,5%) e 9S (7,3%). A classe *Actinobacteria* somente foi detectada na amostra 8S (16,2%), e *Betaproteobacteria* na amostra 9S (1,2%) (Figura 14). Na EEA-C, a classe *Alphaproteobacteria* foi detectada com maior frequência, representando 57,2, 68,7 e 30,7% nas amostras 7C, 8C e 9C, respectivamente. Nestas amostras também foram detectadas as classes *Acidobacteria*, *Sphingobacteria* e *Deltaproteobacteria* com frequências entre 1,1 e 11,3%. Além destas classes, na amostra 7C foram detectadas *Actinobacteria* (2,2%), *Ktedonobacteria* (2,2%), *Cyanobacteria* (11%) e *Betaproteobacteria* (3,3%). Na amostra 8C foram detectadas as classes *Gammaproteobacteria* (2,3%) e *Candidate division TM7* (1,2%). Na amostra 9C estas duas classes foram também detectadas, representando 25,1 e 1,2% das sequências, além de *Bacteroidia* (1,1%) e *Betaproteobacteria* (2,2%) (Figura 14).

De modo geral, a distribuição de classes nas diferentes amostras revela comunidades bacterianas únicas para cada árvore analisada, sendo *Alphaproteobacteria* a classe dominante. Como no caso da distribuição dos filos, o padrão de distribuição das classes variou entre as

amostras de uma mesma época e entre as amostras de épocas e áreas diferentes (Tabela 2, Figura 14).

Do total de sequências classificadas, dezenove ordens foram detectadas nos diferentes tratamentos (Figura 15). Ordens como *Rhizobiales*, *Sphingomonadales* e *Acidobacteria Gp1*, foram detectadas em todas as amostras com frequências entre 1,3 e 26,8% do total das sequências. Em menor número de amostras foram detectadas *Enterobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Sphingobacteriales*, *Burkholderiales*, *Actinomycetales* e *Myxococcales*, com frequências variando entre 1,1 e 36,8%. As ordens *Rhodospirillales*, *Ktedonobacterales*, *Acidobacteria Gp3*, *Xanthomonadales*, *Bacteroidales*, *Caulobacterales*, *Rhodobacterales*, *Bacillales* e *Acidobacteria Gp6* foram detectadas com frequências menores que 6%.

Analisando as sequências do gene RNA 16S dos diferentes tratamentos, verificou-se que as comunidades de bactérias encontradas na filosfera de *Maytenus robusta* foram diferentes entre si, sugerindo sua participação em diferentes processos biogeoquímicos.

O filo *Proteobacteria* representa o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas. Todas são gram negativas, com uma parede celular formada principalmente de lipopolissacarídeos. Têm uma grande variedade de tipos de metabolismo. A maioria são anaeróbias e a nutrição é geralmente heterotrófica, mas existem dois grupos que realizam fotossíntese, as bactérias púrpuras (MADIGAN; MARTINKO, 2006). Está constituído de cinco subdivisões: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*. Com exceção de *Epsilonproteobacteria* todos os demais grupos foram detectados nas amostras dos diferentes tratamentos. Este filo é reportado por Andrade (2007) na filosfera de *Ocotea dispersa*, *O. teleiandra*, *Mollinedia schottiana*, *M. uleana*, *Eugenia cuprea*, *E. melanogyna* e *Tabebuia serratifolia*. Da mesma forma, Lambais et al. (2006) detectaram este filo em *Trichilia clausenii*, *T. catigua* e *Campomanesia xanthocarpa*, Kadivar e Stapleton (2003) em milho, Redford e Fierer (2009) em *Populus deltoides*, Delmotte et al. (2009) em *Arabidopsis*, soja e trevo e Redford et al (2010) em 56 espécies de plantas da América do Norte. Todos estes trabalhos descrevem este filo como mais representativo da filosfera.

Figura 15 - Frequência relativa de sequências de rRNA 16S de *Bacteria* classificadas em diferentes ordens nos diferentes tratamentos. PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca. PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa. PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca. PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa. EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca e EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa (C), ND = não detectado

A classe *Alphaproteobacteria* foi a de maior representatividade, representando entre 18 e 69% do total das sequências (Figura 14). Esta classe compreende a maioria das bactérias púrpuras não-sulfurosas e organismos não-fotossintéticos com metabolismo diverso, destacando-se os grupos das nitrificantes e denitrificantes, os organismos com capacidade de fixação de nitrogênio assim como os parasitas intracelulares de células eucarióticas (CANHOS et al., 1997).

Entre as ordens desta classe, *Rhizobiales* foram detectadas com maior frequência. Essa ordem inclui membros com grande variedade de características morfológicas, fisiológicas e biológicas que podem estar envolvidas no ciclo do N (LEE et al., 2005). Foram detectados os gêneros *Methylovirgula* no PECB-S, *Agromonas* no PECB-C e *Bradyrhizobium* no PEIC-S. Além de *Methylobacterium* no PECB-S, PECB-C, PEIC-C, EEA-S e EEA-C, *Devosia* no PECB-S e *Rhizobium* na EEA-S. Na ordem *Sphingomonadales* foram detectados os gêneros: *Sphingobium* na EEA-S, *Novosphingobium* no PECB-S, PEIC-S e PEIC-C e *Sphingomonas* detectada em todos os tratamentos. Nas espécies arbóreas de *T. catigua*, *T. clausenii* e *C. xanthocarpa* da EEC (LAMBAIS et al., 2006) e *O. dispersa*, *O. teleiandra*, *M. schottiana*, *M. uleana*, *E. cuprea*, *E. melanogyna* e *T. serratifolia* do PECB (ANDRADE, 2007), as ordens *Rhizobiales* e *Sphingomonadales* também foram predominantes.

Pela ampla presença deste grupo na filosfera poderia se supor que estaria ocorrendo fixação biológica do nitrogênio na superfície das plantas avaliadas, contribuindo assim com um dos principais processos ecológicos dos ecossistemas. Fűrnkranz et al. (2008) avaliaram a fixação de N₂ associada a folhas de uma série de plantas da floresta da Costa Rica. A fixação de N₂ pelas comunidades bacterianas da filosfera de *Carludovica drudei*, *Cauliflora grias* e *Costus laevis* foi determinada utilizando o isótopo estável ¹⁵N e análises do gene *nifH*. Já a identificação das bactérias associadas às folhas foi realizada por sequenciamento do gene rRNA 16S. As taxas de fixação de N₂ variaram em função das espécies de plantas, condições ambientais e exposição à luz. Comunidades diazotróficas associadas às folhas detectadas em *C. laevis* e *C. drudei* estiveram compostas basicamente por cianobactérias (*Nostoc* spp.) e nas folhas de *G. cauliflora*, por *Gammaproteobacteria*, além de cianobactérias. De acordo com as análises das sequências do gene rRNA 16S, os pesquisadores sugerem que complexas comunidades microbianas nas folhas estariam contribuindo na fixação biológica do nitrogênio em ecossistemas de florestas tropicais.

No presente trabalho bactérias do gênero *Methylobacterium* foram detectadas em todas as áreas. Estas bactérias de coloração rósea, metilotróficas facultativas, podem também fixar

nitrogênio e nodular a planta hospedeira, além de produzir o fitohormônio citocinina e as enzimas pectinase e celulase, podendo dessa forma promover o crescimento vegetal devido à disponibilidade de nitrogênio e à indução de resistência sistêmica (DOURADO, 2010). Nos estudos realizados na filosfera de *T. catigua* e *C. xanthocarpa* da EEC (LAMBAIS et al. 2006) e *E. melanogyna*, *M. uleana* e *O. teleiandra* do PECB (ANDRADE, 2007) esta bactéria também foi detectada com frequências semelhantes às detectadas no presente estudo. Na filosfera de algodão, milho e girassol (BALACHANDAR; RAJA; SUNDARAM, 2008), soja, trevo e *Arabidopsis* (DELMOTTE et al., 2009), *Methylobacterium* também foi detectada.

Jourand et al. (2005) avaliaram a expressão e o papel de bactérias metilotróficas durante a simbiose entre *Methylobacterium nodulans* cepa SRO 2060^T e a leguminosa *Crotalaria podocarpa*. Utilizando o gene repórter *lacZ* fusionado ao gene *mxoF* (um dos 14 genes relacionados com a oxidação do metanol), os pesquisadores observaram que genes metilotróficos são expressos nos nódulos da raiz, sugerindo atividade metilotrófica durante a simbiose. Além disso, a perda da função metilotrófica bacteriana afetou significativamente o desenvolvimento da planta. Isto foi determinado quando *C. podocarpa* foi inoculado com mutantes *M. nodulans* não metilotróficos, diminuindo em até 60% o número total de nódulos de raízes e a capacidade de fixação de nitrogênio da planta quando comparado a cepas do tipo selvagem.

Entre as principais residentes da filosfera se encontram também as *Sphingomonas* (DELMOTTE et al., 2009), as quais são caracterizadas como aeróbias não-patogênicas, capazes de produzir pigmentos de coloração rósea ou laranja (BUSSE et al., 2003; RIVAS et al., 2004). Presume-se que a pigmentação das células microbianas confere proteção às radiações UV, cuja variação nos fluxos é uma das características mais proeminentes do ambiente da superfície foliar, ao qual os microrganismos epífitos tiveram que se adaptar. Recentemente foi observado que *Sphingomonas* têm capacidade para degradar pesticidas organofosforados (NING et al., 2010), a qual poderia ser uma característica para degradar compostos voláteis nocivos para as bactérias. Gases emitidos pelas folhas de *Ficus benjamina*, uma espécie abundante na região da cidade de São Paulo, foram coletados em sistemas fechados e vários compostos orgânicos voláteis oxigenados, tais como ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido acético), aldeídos (formaldeído, acetaldeído e hexanal) e álcoois (mentol, 1- butanol, 1-pentanol) foram identificados através de técnicas cromatográficas (SOUZA et al., 2002).

No estudo realizado por Delmotte et al. (2009), visando entender a fisiologia de bactérias na filosfera de soja, os gêneros *Methylobacterium* e *Sphingomonas* foram predominantes. Através da análise combinada da metagenômica e proteômica, os autores detectaram, nestas bactérias, proteínas relacionadas com o transporte transmembrânico, metabolismo do carbono e nitrogênio e as de resistência ao estresse, sugerindo que bactérias apresentam mecanismos envolvidos na assimilação dos poucos nutrientes disponíveis na filosfera assim como adaptações para a proteção do estresse oxidativo. No presente trabalho *Methylobacterium* e *Sphingomonas* foram detectadas em menor frequência (entre 1 e 7% das sequências) em relação ao detectado em soja, onde ambos os gêneros representaram aproximadamente 20% das sequências (DELMOTTE et al., 2009).

Os regimes de luz contribuem de forma importante para diferenciar a dinâmica e os mecanismos de manutenção da biodiversidade das áreas estudadas. O PEIC apresenta uma grande nebulosidade e chuvas abundantes, resultando numa insolação, que em média não passa de 4,3 horas por dia. O PECB, embora situado no continente, sofre influências da nebulosidade litorânea, apresenta uma insolação um pouco maior do que a da Ilha do Cardoso, em média 4,8 horas por dia. A região da EEA, também continental, mas situada distante do litoral, apresenta uma insolação maior que chega a uma média anual de 6,3 horas por dia (RODRIGUES et al., 2008a). A incidência diferenciada de luz nas áreas influi nos diversos microclimas, originando diferenças na vegetação e na composição da comunidade microbiana da filosfera.

Membros da classe *Deltaproteobacteria*, envolvidos em processos de redução dissimilatória do sulfato, redução de ferro e metabolismo fermentativo, foram representados pelos gêneros *Cystobacter* no PECB-S, EEA-S e EEA-C e *Byssovorax* no PECB-S, PECB-C, EEA-S e EEA-C, ambos da ordem *Myxococcales*. Representantes deste grupo são bastonetes gram-negativos, com capacidade de deslizamento e formação de corpos de frutificação. Usando exoenzimas podem lisar diferentes macromoléculas biológicas bem como microrganismos tais como bactérias e leveduras (DAWID, 2000). *Mixococcales* podem também sintetizar metabólitos secundários biologicamente ativos, tais como antibióticos, úteis para a medicina. Kundim et al. (2004) isolaram três metabólitos com atividade antifúngica de *Cystobacter fuscus*, bactéria que poderia estar presente na filosfera de *Maytenus robusta* do PECB e da EEA onde foi detectado o gênero *Cystobacter*. Por sua vez, *Bissovorax*, detectado também no PECB e EEA, foi caracterizado como decompositor de celulose (REICHENBACH et al., 2006).

Na classe *Gammaproteobacteria* foram detectados representantes da ordem *Enterobacteriales*, a qual é constituída por bactérias patogênicas e simbióticas (CLEVELAND et al., 2007) distribuídas em diferentes ambientes, sendo muitas identificadas como potenciais solubilizadores de fosfato. Foram detectados os gêneros *Erwinia* no PECB-C, *Klebsiella* no PEIC-C e *Pantoea* no PECB-C, PEIC-C, EEA-S e EEA-C. Já a ordem *Pseudomonadales* foi representada por *Acinetobacter* no PECB-S, PECB-C, PEIC-S e PEIC-C, *Enhydrobacter* no PECB-C e *Pseudomonas* no PECB-S, PECB-C, EEA-S e EEA-C. As *Pseudomonas* são bactérias aeróbias descritas como residentes comuns na filosfera de inúmeras plantas (ERCOLANI, 1991; THOMPSON et al., 1993; DELMOTTE et al. 2009), onde podem estabelecer relações de protocooperação ou mutualismo. São usadas em controle biológico protegendo as plantas contra fungos e nematóides fitoparasitas. Delmotte et al. (2009) detectaram nesta bactéria proteínas relacionadas com a mobilidade, o transporte transmembrânico e de resistência ao estresse. Um baixo nível de disponibilidade de água e nutrientes são fatores limitantes para o crescimento microbiano na filosfera. *Pseudomonas* sp. pode também liberar surfactantes, os quais poderiam incrementar a umidade da superfície das folhas, favorecendo a solubilização, difusão e disponibilidade dos nutrientes para as bactérias (BUNSTER; FOKKEMA; SCHIPPERS, 1989).

Representantes do filo *Acidobacteria*, acido-tolerantes a maioria deles (GARRITY; HOLT, 2001) são capazes de crescer em diferentes ambientes (BARNS et al. 2007; KIELAK et al., 2009). Foram detectadas em todas as amostras e afiliadas aos grupos *Gp1*, *Gp3* e *Gp6*. Este filo já foi encontrado na filosfera de árvores da Mata Atlântica (PECB) entre eles: *Ocotea dispersa*, *Mollinedia schottiana*, *Eugenia cuprea* e *E. melanogyna* (ANDRADE, 2007) assim como em *Populus deltoides* (REDFORD; FIERER, 2009). Estudos da estrutura genômica de linhagens deste grupo (entre elas, *Acidobacterium capsulatum*) em amostras de solo, determinaram que estão relacionadas filogeneticamente com membros de *Proteobacteria* (*Rhizobiales*), cianobactérias e fungos, devendo-se essa relação à provável transferência horizontal de genes entre ambos os grupos (QUAISER, 2003; WARD et al., 2009). No presente estudo, *Acidobacteria* foi o segundo grupo em abundância, sugerindo sua participação nos processos ecológicos, tais como os ciclos de carbono e nitrogênio, na filosfera de *Maytenus robusta*.

Representantes do filo *Actinobacteria*, caracterizados como gram-positivas, com alto conteúdo de G+C e estrutura filamentosa (CAVALIER-SMITH, 2002; GAO; GUPTA, 2005) foram encontrados na maioria dos tratamentos, sendo detectados quatro gêneros: *Kineosporia* no

PEIC-C, *Mycobacterium* na EEA-S, *Actinomycetospora* na EEA-S e EEA-C e *Amycolatopsis* no PEIC-C. A estrutura filamentosa deste grupo de bactérias poderia estar relacionada com sua participação nos agregados e biofilmes na filosfera, importantes para o desenvolvimento da comunidade bacteriana. Este filo também foi detectado na filosfera de *Campomanesia xantocarpa* (LAMBAIS et al., 2006), *O. dispersa*, *O. teleiandra*, *M. schottiana*, *E. cuprea*, *E. melanogyna* e *Tabebuia serratifolia* (ANDRADE, 2007), assim como de *Populus deltoides* (REDFORD; FIERER, 2009), alface (ZWIELEHNER et al., 2007), *Arabidopsis*, soja e trevo (DELMOTTE, et al., 2009) e em 56 espécies de plantas da América do Norte (REDFORD et al., 2010).

Distribuídos em diferentes ambientes como solo, sedimentos e habitats aquáticos (O'SULLIVAN et al., 2006), quatro gêneros do filo *Bacteroidetes* foram detectados, entre eles: *Dysgonomonas* (1,3%, no PECB-C), *Hymenobacter* (3,9% no PECB-S; 2,4% na EEA-S e 1,2% na EEA-C), *Spirosoma* e *Mucilaginibacter* (em pelo menos uma amostra dos diferentes tratamentos, com exceção do PEIC-C). Este filo é descrito na maioria dos trabalhos relacionados com filosfera. Assim, Andrade (2007) reporta este filo em *O. dispersa*, *M. schottiana*, *M. uleana* e *E. melanogyna*; Lambais et al. (2006) em *T. clausenii*, *T. catigua* e *C. xanthocarpa*; Kadivar e Stapleton (2003) em milho; Redford e Fierer (2009) em *Populus deltoides*; Zwielehner et al. (2007) em alface; Delmotte et al. (2009) em *Arabidopsis*, soja e trevo; e Redford et al. (2010) em 56 espécies de árvores da América do Norte. Membros deste filo são heterotróficos importantes envolvidos no ciclo do carbono orgânico em habitats aquáticos (COTTRELL; KIRCHMAN et al., 2000) e poderiam estar participando também nas transformações deste elemento na filosfera.

O *Candidate division TM7*, é um dos vários grupos recentemente descritos, sendo detectados em habitats aquáticos e terrestres (HUGENHOLTZ et al., 2001). Representantes deste grupo foram detectados somente nas amostras da EEA-S. Delmotte et al. (2009) reportaram este grupo como importante residente na filosfera de *Arabidopsis*, soja e trevo; e Redford et al. (2010) de 56 espécies de árvores da América do Norte, não conhecendo-se ainda as funções nas quais participa.

O filo *Firmicutes*, constituído por bactérias aeróbias e anaeróbias gram-positivas, somente foi detectado em uma amostra do PEIC-C (2,1%), correspondendo à classe *Bacilli*, cujos representantes podem ser termofílicos, aeróbios e halofílicos. Nos trabalhos de Lambais et al.

(2006) e Andrade (2007), este filo também foi detectado somente em *M. uleana* e *C. xanthocarpa*.

As cianobactérias são organismos fotoautotróficos oxigênicos, compreendendo espécies unicelulares e formadoras de filamentos (GARRITY; HOLT, 2001). Estão organizadas em cinco subdivisões que compreendem gêneros encontrados em ambientes aquáticos e terrestres. No presente estudo foram detectados representantes da família *Family I*, gênero *GPI* (2,6% no PECB-C e 1,3% no PEIC-S). Como já foi descrito, Fűrnkranz et al. (2008) estudaram a fixação de nitrogênio na filosfera de espécies arbóreas na floresta da Costa Rica e observaram que cianobactérias (*Nostoc* spp.) foram as principais fixadoras de nitrogênio nas folhas.

Grupos de afiliação incerta também foram detectados, entre eles representantes da família *Ktedonobacteraceae* com o gênero *Ktedonobacter*, em pelo menos uma amostra dos diferentes tratamentos, com exceção da EEA-S. Bactérias deste gênero são gram-positivas, filamentosas, formadoras de esporos e foram reportadas em solos florestais (CAVALETTI et al., 2006).

2.3.4.2 Estimativas de riqueza e índices de diversidade

Na Tabela 3 são apresentados o número de sequências analisadas em cada uma das três amostras de cada tratamento (PECB-S, PECB-C, PEIC-S, PEIC-C, EEA-S e EEA-C), assim como o número das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) estimadas, os índices de riqueza (ACE e Chao1), os índices de diversidade (Shannon e Simpson) e a estimativa de cobertura de amostragem, considerando-se a distância evolutiva de 0,03 para a definição das UTOs. O número total de sequências analisadas foi de 1.470 e a riqueza das UTOs em cada uma das amostras esteve compreendida entre 50 e 78 UTOs, sendo que o número de filotipos estimados segundo o estimador não paramétrico Chao1 foi de 92 a 1.401 filotipos. No trabalho de Lambais et al. (2006) na filosfera de árvores da Mata Atlântica (*T. catigua*, *T. clausenii* e *C. xanthocarpa*), a riqueza das UTOs ($D = 0,03$) esteve compreendida entre 40 e 83 UTOs e a estimativa de riqueza pelo estimador Chao1 foi de 54 a 265 filotipos.

Os cálculos da estimativa de riqueza de UTOs pelos métodos não-paramétricos de ACE e Chao1, assim como dos índices de diversidade (Shannon e recíproca de Simpson) mostraram que não houve diferença significativa entre as amostras dos diferentes tratamentos considerando a elevada amplitude encontrada nos intervalos de confiança (95% de probabilidade) (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativa de riqueza de UTOs, índices de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas do gene rRNA 16S de *Bacteria* dos tratamentos: Parque Estadual Carlos Botelho época seca (PECB-S), Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa (PECB-C), Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca (PEIC-S), Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa (PEIC-C), Estação Ecológica de Assis época seca (EEA-S) e Estação Ecológica de Assis época chuvosa (EEA-C)

Tratamentos	A	NS	NU	Estimativa de Riqueza		Índices de diversidade		ECA
				ACE	Chao1	Shannon	1/D	
PECB-S	1S	89	62	243,3(142,3;471,1)	219,8(126,2;449,8)	3,98(3,86;4,10)	45,27(57,60;37,27)	0,47
	2S	82	61	218,9(136,0;393,3)	194,4(118,7;369,2)	3,96(3,82;4,09)	41,52(59,77;31,79)	0,40
	3S	77	63	239,2(147,2;431,7)	213,2(128,7;406,4)	4,07(3,97;4,16)	52,46(68,82;42,39)	0,33
PECB-C	1C	77	50	178,1(105,7;344,8)	158,6(92,7;326,3)	3,56(3,33;3,79)	18,58(64,22;10,86)	0,49
	2C	89	64	283,1(162,0;554,0)	257,1(143,9;531,0)	3,97(3,83;4,12)	40,62(59,42;30,86)	0,42
	3C	78	62	257,0(152,5;482,4)	231,0(134,1;458,1)	4,01(3,88;4,13)	44,74(68,02;33,32)	0,33
PEIC-S	4S	85	78	473,6(259,1;942,2)	438,1(233,3;912,6)	4,33(4,27;4,38)	72,99(91,82;60,53)	0,17
	5S	78	61	184,9(122,3;311,4)	161,4(105,7;286,6)	4,03(3,94;4,13)	51,54(64,72;42,84)	0,40
	6S	61	51	266,6(136,7;593,2)	244,6(122,4;576,3)	3,85(3,74;3,96)	41,80(58,31;32,58)	0,28
PEIC-C	4C	94	59	155,9(106,1;258,3)	135,4(92,0;236,0)	3,87(3,74;4,01)	37,43(50,86;29,63)	0,56
	5C	75	52	177,6(108,8;329,4)	157,1(94,9;309,2)	3,73(3,55;3,90)	28,84(53,39;19,76)	0,45
	6C	88	57	200,0(122,2;370,5)	178,0(107,1;349,2)	3,76(3,57;3,94)	27,10(59,20;17,55)	0,50
EEA-S	7S	82	77	631,4(304,8;1.426,3)	595,4(279,9;1.401,7)	4,32(4,27;4,37)	73,10(92,76;60,27)	0,12
	8S	68	50	314,0(147,1;767,6)	292,0(133,2;753,5)	3,60(3,36;3,84)	19,43(73,90;11,18)	0,35
	9S	82	62	289,1(163,7;569,1)	262,6(145,2;545,7)	3,90(3,72;4,08)	30,84(85,76;18,80)	0,35
EEA-C	7C	91	65	307,3(168,3;632,9)	281,8(150,9;611,8)	4,03(3,91;4,15)	46,79(60,75;38,04)	0,44
	8C	86	72	282,0(176,4;494,6)	252,0(154,4;465,2)	4,22(4,14;4,30)	62,70(78,62;52,11)	0,30
	9C	88	69	300,6(177,3;564,1)	272,1(156,9;538,0)	4,12(4,00;4,23)	50,94(73,70;38,94)	0,35
TOTAL		1.470	1.115					

(A), Amostras de cada tratamento, números iguais correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) ou chuvosa (C). NS = Número de seqüências. NU = Número de UTOs determinado pelo DOTUR. Shannon = Estimador de máxima semelhança. 1/D = Recíproca do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança). ECA = Estimativa de cobertura de amostragem. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança

Embora as estimativas de diversidade tenham mostrado que não há diferença significativa entre as áreas, as comparações das bibliotecas do gene rRNA 16S usando o programa S-LIBSHUFF mostram que as comunidades de *Bacteria* na maioria dos tratamentos estudados são estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,05$, Tabelas 04, 05 e 06).

A Tabela 4 mostra as comparações múltiplas entre os tratamentos PECB-S e PECB-C. Todas as comparações entre pares de amostras do mesmo tratamento assim como entre as amostras dos dois tratamentos foram significativamente diferentes, com exceção do par 1S e 3S do tratamento PECB-S ($P = 0,05$).

Tabela 4 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas do gene rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* do Parque Estadual Carlos Botelho época seca (PECB-S) e Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa (PECB-C) usando o S-LIBSHUFF

X	A	Y					
		PECB-S			PECB-C		
		1S	2S	3S	1C	2C	3C
PECB-S	1S	-	0,0000	0,0111	0,0011	0,0000	0,0000
	2S	0,0000	-	0,0100	0,0000	0,0000	0,0000
	3S	0,9092	0,0001	-	0,0330	0,0000	0,0000
PECB-C	1C	0,0001	0,0000	0,0000	-	0,0000	0,0000
	2C	0,0320	0,0000	0,0388	0,0050	-	0,0000
	3C	0,0000	0,0000	0,0024	0,0000	0,0000	-

X = homólogo na coluna e Y = homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0003 e 0,0017, para 1 e 5% de probabilidade, respectivamente. A = Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore mas em épocas diferentes (S, seca e C, chuvosa)

Em relação aos tratamentos PEIC-S e PEIC-C (Tabela 5), da mesma maneira que no caso anterior, todas as comparações entre pares de amostras do mesmo tratamento assim como entre as amostras dos dois tratamentos foram significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Tabela 5 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas do gene rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* do Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca (PEIC-S) e Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa (PEIC-C) usando o S-LIBSHUFF

X	A	Y					
		PEIC-S			PEIC-C		
		4S	5S	6S	4C	5C	6C
PEIC-S	4S	-	0,0741	0,0018	0,8002	0,0134	0,0353
	5S	0,0000	-	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
	6S	0,0000	0,0119	-	0,0000	0,0000	0,0000
PEIC-C	4C	0,0000	0,0001	0,0000	-	0,0000	0,0000
	5C	0,0000	0,0108	0,0000	0,0004	-	0,0892
	6C	0,0000	0,0002	0,0001	0,0006	0,0001	-

X = homólogo na coluna e Y = homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0003 e 0,0017, para 1 e 5% de probabilidade, respectivamente. A = Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore mais em épocas diferentes (S, seca e C, chuvosa)

Em relação aos tratamentos EEA-S e EEA-C (Tabela 6), ao se realizar as comparações de pares entre as amostras de um mesmo tratamento, assim como entre as amostras dos dois tratamentos, estas foram significativamente diferentes, com exceção do par 9S e 8C, amostras dos tratamentos EEA-S e EEA-C, respectivamente ($P \leq 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas do gene rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* da Estação Ecológica de Assis época seca (EEA-S) e Estação Ecológica de Assis época chuvosa (EEA-C) usando o S-LIBSHUFF

X	A	Y					
		EEA-S			EEA-C		
		7S	8S	9S	7C	8C	9C
EEA-S	7S	-	0,0005	0,2346	0,5778	0,6879	0,0043
	8S	0,0000	-	0,0000	0,0203	0,0000	0,0000
	9S	0,0000	0,0000	-	0,0006	0,0036	0,0002
EEA-C	7C	0,0000	0,0002	0,0000	-	0,0000	0,0000
	8C	0,0000	0,0000	0,0040	0,0000	-	0,0001
	9C	0,0000	0,0000	0,0033	0,0000	0,0000	-

X = homólogo na coluna e Y = homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0003 e 0,0017, para 1 e 5% de probabilidade, respectivamente. A = Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore mais em épocas diferentes (S, seca e C, chuvosa)

Os resultados obtidos são consistentes com o trabalho de Lambais et al. (2006), os quais observaram que as comunidades de bactérias na filosfera das três espécies arbóreas estudadas (*T. catigua*, *T. clausenii* e *C. xanthocarpa*) foram diferentes em suas composições. O semelhante padrão de comportamento observado no presente estudo, utilizando uma mesma espécie vegetal (*Maytenus robusta*) localizada em três áreas diferentes, pressupõe que, a espécie vegetal não é determinante na composição da estrutura das comunidades de bactérias na filosfera e sim fatores ambientais próprios de cada área. Os dados obtidos pela avaliação filogenética, baseada nos dados de sequenciamento (Tabela 2), bem como as diferenças encontradas pelo análise do DGGE, evidenciam complexas estruturas das comunidades nas três áreas estudadas.

Complementando as análises dos dados e com a finalidade de determinar a presença de UTOs comuns entre os tratamentos, foi realizada a quantificação da frequência relativa de UTOs para os diferentes tratamentos, tentando obter maiores informações que nos ajudem a compreender o comportamento da distribuição e diversidade das bactérias nos diferentes ecossistemas avaliados. Assim, na Figura 16 observa-se que as três amostras do PECB-S (1S, 2S e 3S), apresentam aproximadamente 90% de UTOs únicas, e só 1,2% de UTOs comuns, as quais foram afiliadas às classes *Acidobacteria* e *Alphaproteobacteria*. Já, no PECB-C não se observam UTOs comuns entre as três amostras (1C, 2C e 3C), embora existam algumas UTOs comuns entre os pares (entre 1,2 e 3%; Figura 16). A baixa frequência de UTOs comuns às amostras em cada um dos tratamentos (PECB-S e PECB-C) demonstra que cada indivíduo apresenta sua própria comunidade bacteriana, sugerindo que existam populações bacterianas adaptadas a condições ambientais típicas de locais diferentes dentro da parcela.

Figura 16 - Diagramas de Venn representando a frequência relativa das diferentes UTOs identificadas pelo DOTUR nos tratamentos: PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca e PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa. Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) e chuvosa (C). Os dados são expressos em % de UTOs

No tratamento PEIC-S não se observam UTOs comuns entre as três amostras (4S, 5S e 6S) mas sim entre os pares, 4S e 5S, 5S e 6S e 4S e 6S (Figura 17). O tratamento PEIC-C apresenta também o mesmo padrão de distribuição já que não se observam UTOs comuns entre as três amostras (4C, 5C e 6C) mas sim entre os pares, 4C e 5C, 5C e 6C e 4C e 6C (Figura 17). As UTOs comuns aos pares das amostras de cada um dos tratamentos foram afiliadas às classes *Acidobacteria*, *Sphingobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, verificando-se o comportamento cosmopolita de algumas UTOs e o endemismo da maioria delas.

Figura 17 - Diagramas de Venn representando a frequência relativa das diferentes UTOs identificadas pelo DOTUR nos diferentes tratamentos: PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca, PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa. Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) e chuvosa (C). Os dados são expressos em % de UTOs

Em relação à distribuição de frequências de UTOs no tratamento EEA-S, observa-se que não existem UTOs comuns entre as amostras 7S, 8S e 9S (Figura 18). A presença de UTOs comuns é observada somente entre os pares das amostras 7S e 9S e entre 8S e 9S. Estas UTOs foram afiliadas às classes *Acidobacteria*, e *Alphaproteobacteria*. No tratamento EEA-C, também não se observam UTOs comuns entre as três amostras (7C, 8C e 9C; Figura 18) mas sim entre os pares. Essas UTOs foram afiliadas às classes *Acidobacteria*, *Sphingobacteria* e *Alphaproteobacteria*.

Figura 18 - Diagramas de Venn representando a frequência relativa das diferentes UTOs identificadas pelo DOTUR nos diferentes tratamentos: EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca e EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. Números iguais dos tratamentos correspondem a amostras de folhas coletadas da mesma árvore na época seca (S) e chuva (C). Os dados são expressos em % de UTOs

No geral, a baixa frequência de UTOs comuns a mais de um indivíduo da mesma espécie sugere a existência de endemismo da grande maioria das bactérias, sendo que os poucos representantes de comportamento cosmopolita correspondem às classes *Acidobacteria* e *Alphaproteobacteria*.

2.3.4.3 Distribuição espaço temporal de UTOs da Filosfera

Para observar o comportamento da distribuição de UTOs em relação ao espaço e ao tempo, uma análise NMDS foi realizada a partir dos dados de frequências de UTOs gerada pelo DOTUR e baseado numa matriz de presença e ausência de UTOs para os diferentes tratamentos. Na Figura 19A, observa-se que os diferentes tratamentos apresentam uma ampla distribuição, não revelando, na maioria dos casos, agrupamento das três amostras que correspondem a cada um dos tratamentos avaliados (PECB-S, PECB-C, PEIC-S, PEIC-C, EEA-S e EEA-C; Figura 19A). No entanto, a análise realizada para comparar as áreas (EEA, PECB e PEIC), sem ter em consideração as épocas, determinou uma clara separação dos tratamentos PECB e PEIC do tratamento EEA (Figura 19B).

Figura 19 - Análise NMDS da distribuição dos grupos de 916 UTOs gerados pelo DOTUR de 1.470 sequências dos diferentes tratamentos a uma distância evolutiva de 0,03. (A), distribuição entre diferentes unidades e épocas. (B), distribuição só entre as unidades. PECB-S, Parque Estadual Carlos Botelho época seca; PECB-C, Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa; PEIC-S, Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca; PEIC-C, Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa; EEA-S, Estação Ecológica de Assis época seca; EEA-C, Estação Ecológica de Assis época chuvosa

Complementando a representação gráfica obtida pela NMDS, uma ANOSIM foi aplicada com o objetivo de determinar a significância das interações entre os tratamentos, testando as diferenças entre os valores médios de similaridade entre as amostras dentro de uma mesma unidade e entre amostras de épocas diferentes. Após a avaliação realizada entre os diferentes tratamentos a ANOSIM não revelou diferenças significativas entre as épocas, seca e chuvosa, de uma mesma unidade (PECB-S e PECB-C, PEIC-S e PEIC-C e EEA-S e EEA-C) segundo o teste *Pairwise* (R global = 0,112; $p < 0,001$; Tabela 7), sugerindo não existir influência temporal sobre a comunidade bacteriana ao nível de UTOs. É interessante indicar que semelhante resultado foi obtido com a análise de DGGE, de menor resolução molecular, verificando-se que a composição da comunidade bacteriana entre uma época e outra se mantém independentemente do tempo, pelo menos nos períodos de tempo em que foram realizadas as avaliações (seis meses).

Tabela 7 – Resultado do teste *Pairwise* (pareamento) baseado nas UTOs das diferentes áreas e épocas PECB-S = Parque Estadual Carlos Botelho época seca; PECB-C = Parque Estadual Carlos Botelho época chuvosa; PEIC-S = Parque Estadual Ilha do Cardoso época seca; PEIC-C = Parque Estadual Ilha do Cardoso época chuvosa; EEA-S = Estação Ecológica de Assis época seca; EEA-C = Estação Ecológica de Assis época chuvosa. (R global = 0,112; $*p < 0,001$). O R global para os tratamentos referidos as unidades (PECB, PEIC e EEA) é de 0,19 ($p < 0,001$). ($*p < 0,001$)

Tratamentos	Teste <i>Pairwise</i>
PECB-S, PECB-C	-0.296
PECB-S, PEIC-S	0.037
PECB-S, PEIC-C	0.519*
PECB-S, EEA-S	0.130*
PECB-S, EEA-C	0.593*
PECB-C, PEIC-S	-0.259
PECB-C, PEIC-C	0.111
PECB-C, EEA-S	-0.037
PECB-C, EEA-C	0.259*
PEIC-S, PEIC-C	0.111
PEIC-S, EEA-S	-0.093
PEIC-S, EEA-C	0.296*
PEIC-C, EEA-S	0.148*
PEIC-C, EEA-C	0.704*
EEA-S, EEA-C	-0.037
PECB, PEIC	0.094
PECB, EEA	0.262*
PEIC, EEA	0.231*

Resultados diferentes foram encontrados por Redford e Fierer (2009) ao estudar a dinâmica temporal da comunidade bacteriana na filosfera de *Populus deltoides*, observando diferenças na estrutura das comunidades entre as épocas de inverno e verão no hemisfério norte. Deve-se ter em conta, no entanto, que a espécie utilizada pelos pesquisadores é uma planta decídua de ambientes temperados, características diferentes às utilizadas no presente estudo.

No entanto, quando se avaliam as diferenças entre os pares de tratamentos das diferentes unidades e épocas, observam-se diferenças significativas entre a maioria delas (PECB-S e PEIC-C, PECB-S e EEA-S, PECB-S e EEA-C, PECB-C e EEA-C, PEIC-S e EEA-C, PEIC-C e EEA-S e PEIC-C e EEA-C) ($R_{\text{global}} = 0,112$; $p < 0,001$; Tabela 7), sendo mais evidente entre as unidades PECB e EEA e PEIC e EEA ($R_{\text{global}} = 0,19$; $p < 0,001$; Tabela 7). Os resultados semelhantes obtidos através de DGGE foram novamente confirmados pela análise de UTOs, indicando portanto, influência espacial na comunidade bacteriana da filosfera de *Maytenus robusta*. Características florísticas e condições ambientais próprias de cada formação florestal estudada, estariam influenciando na estrutura e composição da comunidade bacteriana presente na filosfera. Por outro lado, fenômenos ambientais como chuva e vento poderiam estar favorecendo a dispersão da microbiota da filosfera entre determinados ambientes (KINKEL, 1997) gerando baixa influência espacial entre eles, fato evidenciado entre as áreas do PECB e PEIC nas quais não foi observado significância estatística pela ANOSIM. Nos trabalhos de Rodrigues et al. (2008a) nestas áreas, foram observados gradientes bem definidos em relação à velocidade média do vento, com menores velocidades no litoral (PEIC) e maiores no interior do Estado (PECB). Outra característica a ser considerado é o fato de que as formações florestais destas unidades se encontram muito mais preservadas que a formação florestal da EEA. A mínima influência espacial observada por Redford et al (2010) entre as comunidades bacterianas na filosfera de *Pinus ponderosa* de diferentes locais de América do Norte e a evidente influência espacial observada na maioria dos tratamentos avaliados neste estudo, tanto por DGGE e sequenciamento, estaria relacionada às diferentes condições ambientais presentes em cada ecossistema, considerando que um deles é temperado com baixa diversidade vegetal e outro tropical com maior diversidade.

De acordo aos resultados obtidos pode-se dizer que, as árvores de locais diferentes, mesmo sendo da mesma espécie, mantém uma comunidade bacteriana única na filosfera, embora existam algumas UTOs comuns que possam estar presentes em diferentes árvores, como foi

observado nos tratamentos avaliados. Assim, o estabelecimento dos microrganismos na superfície das folhas pode ser dependente de fatores ambientais próprios de cada região e de características genóticas da planta, determinando conjuntamente condições para o desenvolvimento da comunidade microbiana. Seria interessante determinar, se em um mesmo ambiente, plantas que apresentem baixa variabilidade genética (com reprodução clonal, por exemplo) também possuem comunidades bacterianas na filosfera mais similares entre si, se comparado a plantas com reprodução sexual e alta variabilidade genética infraespecífica.

A hipótese de que a estrutura da comunidade bacteriana de indivíduos de uma mesma espécie em áreas diferentes é semelhante, não foi confirmada. Resta saber, no entanto, qual o nível de variabilidade genética infraespecífica dos indivíduos amostrados, o que poderia ser um fator determinante para a variação da estrutura da comunidade bacteriana na filosfera. Estudos detalhados da superfície foliar, considerando a influência das estruturas epidérmicas sobre a formação de biofilmes poderiam contribuir também para o entendimento das interações entre os microrganismos e seus hospedeiros.

3 CONCLUSÕES

- A estrutura das comunidades de *Bacteria* na filosfera de *Maytenus robusta* em cada uma das áreas (PECB, PEIC e EEA) e épocas de coleta foi diferente, existindo influência espacial, mas não temporal sobre a comunidade bacteriana.
- A correlação negativa apresentada entre a distância geográfica das árvores e a similaridade da estrutura da comunidade bacteriana da filosfera, fornece evidências para suportar a hipótese de que indivíduos mais próximos geograficamente apresentam comunidades bacterianas na filosfera mais similares, pelo menos em níveis filogenéticos mais abrangentes.
- O sequenciamento de clones do gene rRNA 16S mostrou que as comunidades de bactérias da filosfera de uma mesma espécie vegetal, localizada em diferentes áreas, são diferentes, sugerindo a existência de endemismo, altos níveis de especiação e baixa dispersão de populações bacterianas nas áreas avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.R. **Diversidade e biogeografia de bactérias da filosfera, casca e solo sob a projeção da copa de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 2007. 126 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ANDRADE, S.F.; LEMOS, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V.F.; FILHO, V.C.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 5; p. 252-257, 2007.
- BALACHANDAR, D.; RAJA, P.; SUNDARAM, S.P. Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 68-73, 2008.
- BALDOTO, L.E.B.; OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 918-931, 2008.
- BARNES S.M.; CAIN E.C.; SOMMERVILLE L.; KUSKE C.R. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3113–3116, 2007.
- BARROS, F.; MELO, M.M.R.F.; CHIEA, S.A.C.; KIRIZAWA, M.; WANDERLEY, M.G.L.; JUNG-MENDAÇOLLI, S.L. Caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes. IN: MELO, M.M.R.F.; BARROS, F.; WANDERLEY, M.G.L.; KIRIZAWA, M.; JUNG-MENDAÇOLLI, S.L.; CHIEA, S.A.C. (Ed.). **Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso**, São Paulo: Instituto de Botânica, 1991, v.1, 184p.
- BRANDO, P.M.; DURIGAN, G. Changes in cerrado vegetation after disturbance by frost (São Paulo State, Brazil). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 175, p. 205-215, 2004.
- BUNSTER, L.; FOKKEMA, H.J.; SCHIPPERS, B. Effect of surface - Active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1340–1345, 1989.
- BUSSE, H.-J.; DENNER, E. B. M.; BUCZOLITS, S.; SALKINOJA-SALONEN, M.; BENNASAR, A; KÄMPFER, P. *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1253-1260, 2003.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; VAZOLLER, R.F.; PELLIZARI, V.H. Diversidade no domínio bactéria. IN: BRITO, M.C.W.; JOLY, C.A. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século**. São Paulo: Fapesp, 1997. p. 1-9.

CAVALETTI, L.; MONCIARDINI, P.; BAMONTE, R.; SCHUMANN, P.; ROHDE, M.; SOSIO, M.; DONADIO, S. New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 4360-4369, 2006.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 1, p. 52-76, 2002.

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Washington, v. 43, p. 783-791, 1987.

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

CHAO, A.; SHEN, T.-J. (2009) Program SPADE (Species prediction and diversity estimation). Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>.

CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5448-5456, 2000.

CLEVELAND, C.C.; NEMERGUT, D.T.; SCHMIDT, S.K.; TOWNSEND, A.R. increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 82, p. 229-240, 2007.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; MONTECCHIA, M.S.; SORIA, M.A. Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 781– 786, 2007.

COSTA; D.M.; SAMARASINGHE, S.S.T.; DIAS; H.R.D.; DISSANAYAKE, D.M.N. Control of rice sheath blight by phyllosphere epiphytic microbial antagonists. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 36, p. 52-65, 2008.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711–745, 1995.

COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1692-1697, 2000.

COUTINHO, L.M. O conceito de Mata Atlântica. In: LOPES, M.I.M.S.; KIRIZAWA, M.; MELO, M.M.R.F. (Orgs.). Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba: a antiga Estação da Rocha do Alto da Serra. São Paulo: Instituto de Botânica, 2009. Cap. 6, p. 99-104.

COX, C.B.; MOORE, P.D. Biogeography: an ecological and evolutionary approach. 7th ed. Boston: Blackwell Publishing, 2005. 428p.

DAWID, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 24, p. 403-427, p. 2000.

DELMOTTE, N.; KNIEF, C.; CHAFFRON, S.; INNEREBNER, G.; ROSCHITZKI, B.; SCHLAPBACH, R.; MERING, C.V.; VORHOLT, J.A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 16428-16433, 2009.

DIAS, A.C.; CUSTÓDIO FILHO, A.; FRANCO, G.A.D.C.; COUTO, H.T.Z. Estrutura do componente arbóreo em um trecho de floresta secundária no Parque Estadual Carlos Botelho, S.P. **Revista de Instituto Florestal**, São Paulo, v. 1, p.125-155, 1995.

DICKINSON, C.H.; B. AUSTIN, B.; GOODFELLOW, M. Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne*. **Journal of General and Microbiology**, London, v. 91, p. 157-166, 1975.

DOURADO, M.N. **Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira**. 2010. 132 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

DURIGAN, G.; BACIC, M.C.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUEIRA, M.F.. Inventário florístico do cerrado na Estação Ecológica de Assis, SP. **Hoehnea**, São Paulo, v. 26, p. 149-172, 1999.

ERCOLANI, G.L. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. **Microbial Ecology**, New York, v. 21, p. 35-48, 1991.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling automated sequencer traces using phred. II Erros probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP 3.66**. (2006) Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> Acesso em: 8 dez. 2009.

FETT, W.F.; OSMAN, S.F.; DUNN, M.F. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 1839-1845, 1987.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 626-631, 2006.

FIERER, N.; CARNEY, K.M.; HORNER-DEVINE, M.C.; MEGONIGAL, J.P. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 435-445, 2009.

FOTI, M.; MA, S.; SOROKIN, D.Y.; RADEMAKER, J.L.W.; KUENEN, J.G.; MUYZER, G. Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio*. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 56, p. 95-101, 2006.

FRANKE, C.R.; ROCHA, P.L.B.; KLEIN, W.; GOMES, S.L. (Org.). Mata Atlântica e Biodiversidade. Salvador : Edufba, 2005. 461p.

FÜRNKRANZ, M.; WANEK, W.; RICHTER, A.; ABELL, G.; RASCHE, F.; SESSITSCH, A. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 561–570, 2008.

FRY, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, p. 532–536, 1989.

GAO, B.; GUPTA, R.S. Conserved indels in protein sequences that are characteristics of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 2401-2412, 2005.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic outline of the *Prokaryotes*. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004. Disponível em : <http://dx.doi.org/101007/bergeysoutline>. Acesso em: 15 out. 2007.

GLICKMANN, E.; GARDAN, L.; JACQUET, S.; HUSSAIN, S.; ELASRI, M.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, New York, v. 11, p. 156–162, 1998.

GOLDBERG, R. Cell wall polysaccharidase activities and growth processes: a possible relationship. **Physiologia. Plantarum**, Copenhagen, v. 50, p. 261–264, 1980.

GOMES, F.H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B.; PEREZ, X.L.O. Solos sob vegetação de restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização e classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 31, p. 1563-1580, 2007.

HIRANO, S.S.; BAKER, L.S.; UPPER, C.D. Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2560–2566, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W.; WEBB, R.I.; WAGNER, A.M.; BLACKALL, L.L. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 411-419, 2001.

HUTCHISON, M.L.; TESTER, M.A.; GROSS, D.C. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, New York, v. 8, p. 610–620, 1995.

JACQUES, M.A.; KINKEL, L.L.; MORRIS, C.E. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-growth endive (*Cichorium endive* var. *latifolia*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 899-906, 1995.

JOURAND, P.; RENIER, A.; RAPIOR, S.; FARIA, S.M.; PRIN, Y.; GALIANA, A.; GIRAUD, E.; DREYFUS, B. Role of methylotrophy during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St Paul, v. 18, p. 1061–1068, 2005.

JUHÁSZ, C.E.P.; CURSI, P.R.; COOPER, M.; OLIVEIRA, T.C.; RODRIGUES, R.R. Dinâmica físico-hídrica de uma topossequência de solos sob savana florestada (cerradão) em Assis, SP. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 30, p. 401-412, 2006.

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

KADIVAR, H.; STAPLETON, A.E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 353–361, 2003.

KIELAK, A.; PIJL, A.S.; Van VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Phylogenetic diversity of *Acidobacteria* in a former agricultural soil. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 378-382, 2009.

KIM, J.J.; SUNDIN, G.W. Regulation of the *rulAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *rulAB*-mediated mutability in vitro and in planta. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, p. 6137-6144, 2000.

KINKEL, L.L. Microbial population dynamics on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 327-347, 1997.

KINKEL, L.L.; WILSON, M.; LINDOW, S.E. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, p. 1-11, 2000.

KIRALY, Z.; EL-ZAHABY, H.M.; KLEMENT, Z. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. **Journal of Phytopathology**, Blackwell Verlag- Berlin, v. 145, p. 59–68, 1997.

KUNDIM, B.A.; ITOU, Y.; SAKAGAMI, Y.; FUDOU, R.; YAMANAKAC, S.; OJIKI, M. Novel antifungal polyene amides from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*: isolation, antifungal activity and absolute structure determination. **Tetrahedron**, Oxford, v. 60, p. 10217–10221, 2004.

- LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; BÜLL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.D.A.; CARDOSO, E.J. (Ed.). Tópicos em ciência do solo. **Sociedade Brasileira em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 43-84, 2005.
- LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- LEE, K.; LIU, C.; ANZAI, Y.; KIM, H.; AONO, T.; OYAIZU, H. The Hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of *Hyphomonadaceae* fam. Nov., *Xanthobacteraceae* fam. Nov. and *Erythrobacteraceae* fam. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 1907-1919, 2005.
- LEVEAU, J.H.; LINDOW, S.E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3446-3453, 2001.
- LILLEY, A.K.; BAILEY, M.J. The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phyllosphere is related to local environment conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1577-1583, 1997.
- LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.
- LINDOW, S.E.; DESURMONT, C.; ELKINS, R.; MCGOURTY, G.; CLARK, E.; BRANDL, M.T. Occurrence of indole-3-acetic acid-producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. **Phytopathology**, Baltimore, v. 88, p. 1149-1157, 1998.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. Brock biology of microorganisms. 11th ed., Englewood: Prentice-Hall, 2006. 992p.
- MARTINY, J.B.H.; BOHANNAN, B.J.M.; BROWN, J.H.; COLWELL, R.K.; FUHRMAN, J. A.; GREEN, J.L.; HORNER-DEVINE, M.C.; KANE, M.; KRUMINS, J.A.; KUSKE, C.R.; MORIN, P.J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.-L.; SMITH, V.H.; STALEY, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 102-112, 2006.
- MELO, M.M.R.F.; MONTOVANI, W. Composição florística e estrutura de trecho de mata atlântica de encosta, na ilha do Cardoso (Cananéia, SP, Brasil). **Boletim do Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 107-158, 1994.

- MERCIER, J.; LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 369- 374, 2000.
- MILLER, W.G.; BRANDL, M.T.; QUIÑONES, B.; LINDOW, S.E. Biological sensor for sucrose availability: relative sensitivities of various reporter genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p. 1308-1317, 2001.
- MO, Y.Y.; GROSS, D.C. Expression *in vitro* and during plant pathogenesis of the *syrB* gene required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, New York, v. 4, p. 28–36, 1991.
- MORI, S.A.; BOOM, B.M.; PRANCE, G.T. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest species. **Brittonia**, New York, v. 33, p. 233-245, 1981.
- MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JACQUES, M.A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4789–4795, 1998.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, K. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NEKOLA, J.C.; WHITE, P.S. The distance decay of similarity in biogeography and ecology. **Journal of biogeography**, Oxford, v. 26, p. 867-878, 1999.
- NING, J.; BAI, Z.; GANG, G.; JIANG, D.; HU, Q.; HE, J.; ZHANG, H.; ZHUANG, G. Functional assembly of bacterial communities with activity for the biodegradation of an organophosphorus pesticide in the rape phyllosphere. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 306, p. 135-143, 2010.
- O'BRIEN, R.D.; LINDOW, S.E. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. **Phytopathology**, Baltimore, v. 79, p. 619–627, 1989.
- O'MALLEY, M.A. The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, p. 647-651, 2007.
- O'SULLIVAN, L.A.; RINNA, J.; HUMPHREYS, G.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. Culturable phylogenetic diversity of the phylum '*Bacteroidetes*' from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family *Flavobacteriaceae*: *Epilithonimonas tenax* gen. nov., sp. nov. and *Persicivirga xylanidelens* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, p. 169-180, 2006.
- ØVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L. TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PAGALING, E.; WANG, H.; VENABLES, M.; WALLACE, A.; GRANT, W.D.; COWAN, D.A.; JONES, B.E.; MA, Y.; VENTOSA, A.; HEAPHY, S. Microbial Biogeography of Six Salt Lakes in Inner Mongolia, China, and a Salt Lake in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 5750-5760, 2009.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-739, 1997.

PAPKE, R.T.; RAMSING, N.B.; BATESON, M.M.; WARD, D.M. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 650-659, 2003.

PFEIFER, R.M.; CARVALHO, W.A.; SILVA, D.A.; ROSSI, M.; MEDICINO, L.F. Levantamento semidetalhado dos solos do Parque Estadual de Carlos Botelho (SP), **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, v.40, p. 75-109, 1986.

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S.C.; TREUSCH, A.H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 563-75, 2003.

QUIGLEY, N.B.; GROSS, D.C. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, New York, v. 7, p. 78-90, 1994.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution, **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 197-207, 2007.

REDFORD, A.J.; FIERER, N. Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 189-198, 2009.

REDFORD, A.J.; BOWERS, R.M.; KNIGHT, R.; LINHART, Y.; FIERER, N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental Microbiology**, Washington, 2010. (In press).

REICHENBACH, H.; LANG, E.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C. *Byssovorax cruenta* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: rediscovery of 'Myxococcus cruentus' Thaxter 1897. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 2357-2363, 2006.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Barking, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RIVAS, R.; ABRIL, A.; TRUJILLO, M.E.; VELÁZQUEZ, E. *Sphingomonas phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2147-2150, 2004.

RODRIGUES, R.R.; SOUZA, V.C.; IVANAUSKAS, N.M.; OLIVEIRA, A.A.; FRANCO, G.A.D.C.; DURIGAN, G. Diversidade, dinâmica e conservação em florestas do estado de São Paulo – 40 ha de parcelas permanentes. In: SANQUETTA, C.R. (Org.). **Experiências de monitoramento no Bioma Mata Atlântica com uso de parcelas permanentes**. Curitiba: C.R. Sanquetta, 2008a. cap. 3, p. 81-107.

RODRIGUES, R.R.; JOLY, C.A.; BRITO, M.C.W.; PAESE, A.; METZGER, J.P.; CASATTI, L.; NALON, M.A.; MENEZES, N.; IVANAUSKAS, N.M.; BOLZANI, V.; BONONI, V.L.R. Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no Estado de São Paulo. Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 2008b, 238 p.

ROSSELLÓ-MORA, R.; LUCIO, M.; PEÑA, A.; BRITO-ECHEVERRÍA, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; VALENS-VADELL, M.; FROMMBERGER, M.; ANTÓN, J.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 2, p. 242–253, 2008.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

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

SOININEN, J.; McDONALD, R.; HILLEBRAND, H. The distance decay of similarity in ecological communities. **Ecography**, Lund, v. 30, p. 3-12, 2007.

SOUZA, S.R.; VASCONCELLOS, P.C.; MANTOVANI, W.; CARVALHO, L.R.F. Emissão por folhas de *Ficus benjamina* L. (Moraceae) de compostos orgânicos voláteis oxigenados. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, p.413-418, 2002.

STEWART, P.S.; ROE, F.; RAYNER, J.; ELKINS, J.G.; LEWANDOWSKI, Z.; OCHSNER, U.A.; HASSETT, D.J. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 836–838, 2000.

SUNDIN, G.W.; JACOBS, J.L. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 27–38, 1999.

SY, A.; TIMMERS, A.C.J.; KNIEF, C.; VORHOLT, J.A. Methylotrophic Metabolism Is Advantageous for *Methylobacterium extorquens* during Colonization of *Medicago truncatula* under Competitive Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v, 71, p. 7245–7252, 2005.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.; BEDÊ, L. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, Cambridge, v.19, p. 695-700, 2005.

THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J.; FENLON, J.S.; FERMOR, T.R.; LILLEY, A.K.; LYNCH, J.M.; MCCORMACK, P.J.; MCQUILKEN, M.P.; PURDY, K.J.; RAINEY, P.B.; WHIPPS, J.M. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 150, p. 177-191, 1993.

TUKEY, H.B. The leaching of substances from plants. **Annual Reviews of Plant Physiology**. Washington, v. 21, p. 305–324, 1970.

UPPER, C.D.; HIRANO, S.S.; DODD, K.K.; CLAYTON, M.K. Factors that affect spread of *Pseudomonas syringae* in the phyllosphere. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1082–1092, 2003.

VANDERHOEF, L.N.; DUTE, R.R. Auxin-regulated wall loosening and sustained growth in elongation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 67, p. 146–149, 1981.

WARD, D.M.; FERRIS, M.J.; NOLD, S.C.; BATESON, M.M. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 1353-1370, 1998.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.; DEBOY, R.T.; DETTER, J.C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROISOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2046-2056, 2009.

WHIPPS, J.M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G.D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.105, p.1744-1755, 2008.

WHITAKER, R.J.; GROGAN, D.W.; TAYLOR, J.W. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. **Science**, Washington, v. 301, p. 976-978, 2003.

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

ZWIELEHNER, J.; HANDSCHUR, M.; MICHAELSEN, A.; IREZ, S.; DEMEL, M.; DENNER, E.B.M.; HASLBERGER, A.G. DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 52, p. 614-623, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 - Informações relacionadas com as unidades de conservação, o número de amostra, a sub-parcela e os dados geodésicos dos indivíduos de *Maytenus robusta* coletados

	Unidade de Conservação	Nº da amostra	Sub-parcela	Plaqueta	UTM_X	UTM_Y
1	PEIC_Ago08	1	B14	2336	204260.51	7223225.66
2	PEIC_Ago08	2	E11	7795	204206.30	7223286.87
3	PEIC_Ago08	3	F10	7697	204178.66	7223304.74
4	PEIC_Ago08	4	G08	4961	204158.81	7223331.21
5	PEIC_Ago08	5	H07	9904	204133.21	7223359.45
6	PEIC_Ago08	6	I08	5092	204109.34	7223331.57
7	PEIC_Ago08	7	I08B	5207	204112.97	7223324.71
8	PEIC_Ago08	8	J04	21094	204075.11	7223396.37
9	PEIC_Ago08	9	J05	21216	204088.15	7223378.40
10	PEIC_Ago08	10	N02	113002	204003.22	7223439.46
11	PECB_Ago08	11	A03	1133	202893.83	7322622.27
12	PECB_Ago08	12	B12	9415	203058.59	7322681.72
13	PECB_Ago08	13	C07	3894	202984.43	7322617.66
14	PECB_Ago08	14	E10	8087	203060.15	7322609.88
15	PECB_Ago08	15	E11	7757	203072.90	7322635.58
16	PECB_Ago08	16	J00	782	202930.07	7322435.88
21	EEA_Fev09	31	A14	2496	564229.16	7501121.24
22	EEA_Fev09	32	C11	4173	564192.92	7501075.01
23	EEA_Fev09	33	E09	5978	564148.35	7501038.80
24	EEA_Fev09	34	F09	12276	564108.42	7501013.24
25	EEA_Fev09	35	F07	12054	564158.89	7501021.24
26	EEA_Fev09	36	G05	6773	564079.75	7500986.48
27	EEA_Fev09	37	H06	13277	564100.44	7500973.00
28	EEA_Fev09	38	I06	9170	564098.71	7500944.19
29	EEA_Fev09	39	M06	17470	564112.61	7500855.96
30	EEA_Fev09	40	M07	17608	564137.11	7500872.77
31	PECB_Mar09	42	A03	1133	202893.83	7322622.27
32	PECB_Mar09	43	B12	9415	203058.59	7322681.72
33	PECB_Mar09	44	C07	3894	202984.43	7322617.66
34	PECB_Mar09	45	E10	8087	203060.15	7322609.88
35	PECB_Mar09	46	E11	7757	203072.90	7322635.58
36	PECB_Mar09	47	J00	782	202930.07	7322435.88
37	PEIC_Mar09	50	B14	2336	204260.51	7223225.66
38	PEIC_Mar09	52	E11	7795	204206.30	7223286.87
39	PEIC_Mar09	53	F10	7697	204178.66	7223304.74
40	PEIC_Mar09	54	G08	4961	204158.81	7223331.21
41	PEIC_Mar09	55	H07	9904	204133.21	7223359.45
42	PEIC_Mar09	56	I08	5092	204109.34	7223331.57
43	PEIC_Mar09	57	I08B	5207	204112.97	7223324.71
44	PEIC_Mar09	58	J04	21094	204075.11	7223396.37
45	PEIC_Mar09	59	J05	21216	204088.15	7223378.40
46	PEIC_Mar09	60	N02	113002	204003.22	7223439.46
47	EEA_Fev09	61	A14	2496	564229.16	7501121.24
48	EEA_Fev09	62	C11	4173	564192.92	7501075.01
49	EEA_Fev09	63	E09	5978	564148.35	7501038.80
50	EEA_Fev09	64	F09	12276	564108.42	7501013.24
51	EEA_Fev09	65	F07	12054	564158.89	7501021.24
52	EEA_Fev09	66	G05	6773	564079.75	7500986.48
53	EEA_Fev09	67	H06	13277	564100.44	7500973.00
54	EEA_Fev09	68	I06	9170	564098.71	7500944.19
55	EEA_Fev09	69	M06	17470	564112.61	7500855.96
56	EEA_Fev09	70	M07	17608	564137.11	7500872.77

ANEXO 2 - Matrizes de distância geográfica (m) das diferentes áreas e sub-parcelas amostradas (PECB, PEIC e EEA)

PECB

	A03	B12	C07	E10	E11
B12	175,15				
C07	90,71	98,00			
E10	166,78	71,86	76,12		
E11	179,56	48,31	90,27	28,69	
J0	189,89	277,41	189,73	217,25	245,52

PEIC

	B14	E11	F10	G08	H07	I08	I08B	J04	J05
E11	81,76								
F10	113,81	32,91							
G08	146,57	64,97	33,09						
H07	184,68	103,00	71,13	38,12					
I08	184,58	106,77	74,33	49,47	36,70				
I08B	177,70	100,71	68,66	46,30	40,21	7,76			
J04	252,02	170,88	138,27	106,07	68,84	73,29	81,05		
J05	230,30	149,46	116,70	84,97	48,88	51,40	59,15	22,20	
N02	334,53	254,02	221,20	189,54	152,64	151,33	158,78	83,81	104,60

EEA

	A14	C11	E09	F07	F09	G05	H06	I06	M09
C11	58,74								
E09	115,44	57,43							
F07	161,99	104,67	47,41						
F09	122,22	63,63	20,48	51,10					
G05	201,21	143,68	86,27	39,22	86,44				
H06	196,33	137,69	81,39	41,02	75,79	24,69			
I06	219,92	161,21	106,84	69,73	97,77	46,35	28,86		
M06	289,75	233,31	186,30	157,34	171,64	134,59	117,67	89,32	
M07	264,97	209,80	166,41	143,37	150,06	127,36	106,73	81,09	29,71

ANEXO 3 – (A), Ponto de chegada a uma das unidades de conservação. (B), vegetação do PEIC. (C, D), vegetação do PECB. (E), forma de coleta e vegetação da EEA. (F), disposição das folhas de *Maytenus robusta* para o traslado ao laboratório