Robinson Moresca de Andrade

Biólogo

**Diversidade e biogeografia de bactérias da filosfera, casca e solo sob a projeção da copa
de espécies arbóreas da mata Atlântica**

Orientador:

Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Andrade, Robinson Moresca de
Diversidade e biogeografia de bactérias da filosfera, casca e solo sob a
projeção da copa de espécies arbóreas da mata Atlântica / Robinson Moresca de
Andrade. -- Piracicaba, 2007.
126 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Cascas – Planta 3. Comunidades vegetais – Mata Atlântica
4. Ecologia microbiana 5. Filogenia 6. Folhas – Plantas 7. Solos I. Título

CDD 576.15

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

DEDICATÓRIA

A **DEUS** pela minha vida e oportunidades;

À minha esposa **FABIULA** pela paciência e compreensão;

Às filhas, **LAURA** (*in memorian*) e **LUIZA** pela alegria que traz;

À minha família pela ajuda e estímulo.

"O que mais preocupa não é nem o grito dos violentos, dos corruptos, dos desonestos, dos sem-caráter, dos sem-ética. O que mais preocupa é o silêncio dos bons"

(Luther King)

"Podemos escolher o que semear, mas somos obrigados a colher aquilo o que plantamos."

(Provérbio Chinês)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pela orientação.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Rodrigues pela coordenação do projeto BIOTA – Parcelas Permanentes que possibilitou o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Vinícius Castro Souza pela colaboração na identificação e seleção das plantas coletadas.

À coordenação do PPG Microbiologia Agrícola e à ESALQ/USP pela oportunidade.

À Prof^a. Dr^a. Helaine Carrer pela permissão do uso das instalações do CEBETC para seqüenciamento das amostras e a Fátima pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório: Adriano, Bruna, Carolina, Christie, Denise, Eduardo, Gisele Lopes, Giselle Gomes, Hélio, Marcela, Marcio Morais, Rafael, Soraya e Winston.

Aos amigos do departamento Ciência do Solo: Célia Regina, Denise Mescolotti, Dorival, Fernando Baldesin, Luis Silva e Wlademir que foram fundamentais em alguns momentos do trabalho e convivência.

Aos amigos Alexandre, Ricardo e Marco pela amizade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 Revisão de literatura	14
2.1.1 Filosfera	14
2.1.2 Casca	18
2.1.3 Solo	19
2.1.4 Diversidade e Abundância microbiana	23
2.2 Objetivos	25
2.3 Material e métodos	26
2.3.1 Local de amostragem	26
2.3.2 Amostragem	26
2.3.3 Desalojamento dos microrganismos da filosfera e casca	30
2.3.4 Extração de DNA total da filosfera e casca	30
2.3.5 Extração do DNA total do solo	31
2.3.6 Amplificação do gene rRNA por PCR	32
2.3.7 Caracterização das estruturas das comunidades bacterianas por DGGE	32
2.3.8 Síntese de bibliotecas de clones dos genes rRNA 16S	34
2.3.9 Extração do DNA plasmidial	34
2.3.10 PCR de seqüenciamento utilizando “Big Dye Terminator”	36
2.3.11 Purificação da PCR e seqüenciamento	36
2.3.12 Análise das seqüências de rRNA 16S	37
2.3.13 Morfotipos microbianos na filosfera	38
2.4 Resultados e discussão	39
2.4.1 Filosfera	39
2.4.1.1 Estrutura da comunidade bacteriana avaliada por DGGE	39
2.4.1.2 Agrupamento hierárquico dos amplicons	42
2.4.1.3 Análise de componentes principais com base nos amplicons	43

2.4.1.4 Afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S de filosfera	45
2.4.1.5 Abundância relativa de UTOs de <i>Bacteria</i> na filosfera.....	57
2.4.1.6 Diversidade de UTOs de <i>Bacteria</i> na filosfera.....	60
2.4.1.7 Morfotipos presente na filosfera	66
2.4.2 Casca	68
2.4.2.1 Estrutura da comunidade bacteriana avaliada por DGGE	68
2.4.2.2 Agrupamento hierárquico dos amplicons	70
2.4.2.3 Análise de componentes principais com base nos amplicons	72
2.4.2.4 Afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S da casca	74
2.4.2.5 Abundância relativa de UTOs de <i>Bacteria</i> na casca.....	79
2.4.2.6 Diversidade de UTOs de <i>Bacteria</i> na casca.....	80
2.4.3 Solo	84
2.4.3.1 Estrutura da comunidade bacteriana avaliada por DGGE	84
2.4.3.2 Agrupamento hierárquico dos amplicons	87
2.4.3.3 Análise de componentes principais com base nos amplicons	88
2.4.3.4 Afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S de solo sob a copa das árvores	90
2.4.3.5 Abundância relativa de UTOs de <i>Bacteria</i> no solo.....	98
2.4.3.6 Diversidade de UTOs de <i>Bacteria</i> no solo.....	100
2.5 Análise comparativa entre os ambientes	106
2.5.1 Análise de correspondência canônica entre os ambientes	106
2.5.2 Diagrama de Venn baseado nas UTOs de <i>Bacteria</i>	107
2.6 Considerações finais	108
3 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112
ANEXO	124

RESUMO

Diversidade e biogeografia de bactérias da filosfera, casca e solo sob a projeção da copa de espécies arbóreas da mata Atlântica

A diversidade e a biogeografia de bactérias nas superfícies da folha, casca e no solo sob a projeção da copa das árvores da Mata Atlântica são pouco conhecidas. Inúmeros fatores ambientais e mesmo a própria espécie vegetal podem influenciar na estrutura dessas comunidades. O objetivo deste trabalho foi determinar a variabilidade espacial das comunidades de bactérias associadas à filosfera, casca e solo sob a projeção da copa de diferentes espécies arbóreas da mata Atlântica no Parque Estadual “Carlos Botelho” (PECB), bem como estabelecer uma relação entre as estruturas das comunidades de bactérias e a filogenia das espécies vegetais. Para isso foi utilizado PCR-DGGE de amplicons da região V3 do gene rRNA 16S e seqüenciamento de clones da região V1-V3 do gene rRNA 16S. A estrutura das comunidades de bactérias com base nos amplicons detectados após DGGE mostra que na filosfera, foi possível agrupar comunidades bacterianas específicas para cada espécie vegetal. Na casca ocorreu um agrupamento semelhante, no entanto para solo não ocorreu semelhança entre as espécies vegetais. A localização das plantas na floresta não influenciou a estrutura das comunidades de bactérias na filosfera e casca das plantas de mesma espécie, apresentando um certo grau de variabilidade, sendo essa variabilidade menor do que entre as diferentes espécies de plantas. A diversidade e riqueza de UTOs são maiores em solo, se comparado a filosfera e casca. A abundância de UTOs demonstrou a ocorrência de grupos específicos para cada espécie vegetal, no entanto, na filosfera não ocorreram UTOs comuns entre as plantas, ao contrário do que ocorreu em casca e solo. Quando comparadas as UTOs entre os ambientes, observou-se que cada ambiente seleciona grupos específicos, sendo maior a presença de UTOs comuns entre a filosfera e a casca. Foram observados UTOs comuns entre os três ambientes. De maneira geral, pode-se concluir que a diversidade e estrutura das comunidades de *Bacteria* na filosfera, casca e solo podem ser determinadas pela planta.

Palavras-chave: Filosfera, Casca, Solo, Comunidade bacteriana, Diversidade e riqueza de bactérias, Mata Atlântica.

Abstract

Bacterial diversity and biogeography from Atlantic Forest trees phyllosphere, bark and soil under the canopy area

Bacterial diversity and biogeography from Atlantic Forest trees phyllosphere, bark and soil under the canopy area are little known. Additionally, countless environmental factors and the plant specie itself can influence the bacterial community structure. Therefore, the goals of this work were to determine the bacterial community variability associated to phyllosphere, bark and soil under canopy area of different tree species from Atlantic Forest in the “Parque Estadual Carlos Botelho” (PECB) as well as to set a relationship between the community structure and the plant species phylogeny. For this aim, PCR-DGGE of amplicons and clones sequencing of 16S V3 region rRNA gene were used. DGGE results showed that bacterial community structure was grouped by plant species in phyllosphere and bark, but not in the soil under canopy area. Same plant species from different points of the forest were assayed resulting in little variability among them and, consequently, without influence over the bacterial community structure in phyllosphere and bark. For that reason, divergences in phyllosphere and bark communities among plant species were higher than the divergences of the same species from different points at the forest. OTUs diversity and richness were greater in soil than in phyllosphere and bark. OTUs abundance showed the presence of specific groups in phyllosphere to each single plant species, instead of bark and soil communities that revealed the presence of some common OTUs by different plant species. Comparison amongst the OTUs from phyllosphere, bark and soil suggest a selection of structure related groups, although the presence of common groups, mainly between phyllosphere and bark. Concluding, the phyllosphere, bark and soil Bacteria community structure and diversity can be determined by the plant.

Keywords: Phyllosphere, Bark, Soil, Bacterial community, Diversity and bacteria's richness, Atlantic Forest.

LISTA DE ABREVIATURAS

EC – *Eugenia cuprea*

EM – *Eugenia melanogyna*

MS – *Mollinedia schottiana*

MU – *Mollinedia uleana*

OD – *Ocotea dispersa*

OT – *Ocotea teleiandra*

TS – *Tabebuia serratifolia*

PECB – Parque Estadual “Carlos Botelho”

UTOs – Unidades Taxonômicas Operacionais

F – filosfera

C – casca

S - solo

1 Introdução

A mata Atlântica é uma formação vegetal Brasileira, que acompanhava o litoral do país do Rio Grande do Sul ao Piauí, chegando ao Paraguai e a Argentina nas regiões Sul e Sudeste. Diferentes formas nas características climáticas, relevo e paisagens são características deste bioma. Encontra-se hoje extremamente reduzida em função do desmatamento, principalmente a partir do século XX, sendo uma das florestas tropicais mais ameaçadas (SOS MATA ATLÂNTICA, 2007).

Apesar de reduzida a poucos fragmentos, a biodiversidade de seu ecossistema é uma das maiores do planeta. A área original cobria 15% do território brasileiro (1.290.692,46 km²). Atualmente o remanescente é 7,3% (95.000 km²). (BRASIL, 2007; SOS MATA ATLÂNTICA, 2007).

Na busca da preservação e do conhecimento sobre a diversidade nestes fragmento remanescentes da Mata Atlântica, foram criados diversas áreas de preservação ambiental.

Um dos parques localizado no sul do estado de São Paulo, é o Parque Estadual “Carlos Botelho”. O levantamento florístico identificou aproximadamente 8000 indivíduos com 150 morfoespécies, sendo que foram encontrados um grande número de indivíduos da família Myrtaceae, com grande complexidade taxonômica (RODRIGUES, 2005).

A vida se multiplica no alto das copas das árvores, que se tocam, formando uma camada contínua. Desde animais silvestres que transitam pelas copas, a microrganismos epifíticos. Esta cobertura forma uma região de sombra que cria um microclima típico da mata, sempre úmido e sombreado, dando condições suficientes para o desenvolvimento da microbiota.

A superfície aérea de plantas demonstra potencial na formação da estrutura de microrganismos. Os microrganismos epifíticos presente nas copas das árvores podem ser caracterizadas por parasitismo, competição por nutrientes, produção de antibióticos e estimulação da respostas de defesa vegetal contra invasores (LINDOW; LEVEAU, 2002).

A comunidade microbiana sobre as folhas é diversa, incluem diversos gêneros de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas, protozoários e nematóides (LINDOW; BRANDL, 2003).

As populações de bactérias epifíticas podem diferir no desenvolvimento da colônia em pequena escala de tempo (HIRANO; HUPPER, 2000) e em relação à estação do ano (ERCOLANI, 1991), dependendo do ambiente. As variações nas comunidades bacterianas podem ser causadas pela idade das folhas, estação do ano, disponibilidade nutricional, temperatura, radiação solar, umidade relativa, bem como variações na umidade livre devido à chuva e/ou orvalho, composição da cera, variações morfológicas das folhas (eretas, espessura da folha, cutícula, estômatos, tricomas, nervuras e outras) e genótipo da planta (LINDOW; BRANDL, 2003; JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; ANDREWS; KENERLEY; NORDHEIM, 1980).

Em cascas de espécies arbóreas os estudos da comunidade microbiana está concentrada nas espécies causadoras de doenças ou controle biológico e indicadores da poluição do ar. Aos patógenos, diversos trabalhos demonstram os danos causados em áreas de reflorestamento (CAMBOURS et al., 2005), causando danos à saúde das plantas e criando problemas econômicos. Em relação ao controle da poluição ambiental, alguns trabalhos identificaram alguns organismos que podem ser denominados indicadores ambientais, como é o caso dos líquens epifíticos que são utilizados para medir o nível da poluição ambiental (IHLEN, GJERDE, SÆTERSDAL, 2001; van HERK, 2001).

O solo é complexo e influencia o crescimento, a multiplicação, a sobrevivência e outras atividades dos organismos (RANGASWAMI; OBLISAMI, 1967). As comunidades microbianas em solos rizosféricos podem variar em relação ao tipo de solo, espécies vegetais, condições nutricionais da planta, idade do vegetal, estresse, doenças e outros (YANG; CROWLEY, 2000). As raízes influenciam diretamente a microbiota, e ocorrem diversas interações entre microrganismos e entre microrganismos e plantas (LYNCH, 1982).

As comunidades bacterianas residentes na filosfera diferem das comunidades encontradas no solo, sendo que possivelmente esta particularidade entre os ambientes filosfera e solo, reflete entre casca e solo. O ambiente casca recebe influências

ambientais próximas a filosfera e possivelmente demonstre uma similaridade maior entre as comunidades bacterianas epifíticas. Como exemplo, as bactérias pigmentadas, que são adaptadas e apresenta maior tolerância a radiação solar, presente na filosfera e provavelmente na casca, são raramente encontradas em solos (LINDOW; BRANDL, 2003). Ao contrário, as raízes são colonizadas comumente por *Rhizobium* (OTT et al., 2001) e *Azospirillum* (JURKEVITCH; SHAPIRA, 2000), o que não acontece nas folhas e provavelmente nas cascas.

Na mata Atlântica são estimadas aproximadamente 20000 espécies vegetais e a caracterização das comunidades bacterianas em solo de florestas tem demonstrado uma correlação positiva entre a riqueza de espécies vegetais, e tem sido evidenciada a relação entre comunidades bacterianas específicas sobrevivendo sob influência de espécies vegetais, sendo controladas por exsudados destes vegetais (BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT. 2003).

Vista tal diversidade vegetal, pode-se atentar a complexidade da diversidade de procariotos nestes ambientes, estima-se que um grama de solo pode abrigar 2000 e 8,3 milhões de espécies de bactérias por grama de solo (ØVREÅS; TORSVIK, 1998; VALINSK et al., 2002; ROESCH et al., 2007), enquanto que na filosfera pode variar de 1 a 10 milhões de células cm^{-2} de folha (ANDREWS; HERRIS, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003). Nas cascas não há dados sobre a comunidade total de bactérias epifíticas, apenas informações isoladas. Segundo estimativas, aproximadamente 4,5 a 6,5% dos procariotos ocorrem na superfície de ambientes terrestres (WHITMAN et al., 1998).

Estima-se que apenas uma pequena fração de bactérias pode ser cultivada utilizando métodos convencionais (0,1 a 10%) (THERON; CLOETE, 2000). Recentemente os estudos em ecologia microbiana passou a utilizar ferramentas moleculares aliadas à estatística e a bioinformática para estimar a diversidade bem como a estrutura de comunidades dos microrganismos em diversos ambientes (MUYZER; SMALLA, 1998, ARMANN; LUDWIG, 2000). O pioneiro nos estudos da comunidade microbiana utilizando métodos moleculares foi Pace et al. (1986) que utilizou informações de seqüências do gene codificador do RNA ribossômico 16S, que é altamente conservado em procariotos.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) é utilizada para avaliar as estruturas das comunidades microbianas, através da variabilidade das seqüências de rRNA 16S, porém, a identificação dos microrganismos pela DGGE revela apenas a microbiota dominante, (YANG et al., 2001).

Atualmente o seqüenciamento do rRNA 16S de amostras ambientais tem demonstrado que a diversidade microbiana é ampla (PACE, 1997) e que tem contribuído para o conhecimento da diversidade e da estrutura das comunidades dos procariotos (LAMBAIS et al., 2005).

Com esses avanços, foi necessário criar bancos de dados onde seqüências são depositadas. Essas seqüências podem ser comparadas com as comunidades obtidas de um determinado ambiente, para isso é necessário a utilização de programas específicos onde é possível determinar as similaridades entre duas ou mais seqüências ou bibliotecas (LAMBAIS et al., 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Para estimar a riqueza de espécies microbianas em pequenas amostras ambientais da comunidade considerando as espécies raras, são utilizados métodos não-paramétricos (CHAO, 2006) e para avaliar a diversidade de espécies microbianas, são utilizados os estimadores não-paramétricos Chao1 e ACE (CHAO, 2006; CHAO; LEE, 1992).

Vários estudos têm sido desenvolvidos sobre a composição das comunidades bacterianas nesses ambientes, no entanto são limitados, onde a maioria das populações bacterianas aeróbias até o momento foi detectada com base nos meios de cultivos. Poucos estudos são exaustivos a variações das comunidades bacterianas em escala de tempo e espaço utilizando o gene rRNA 16S, sendo importante o conhecimento dos detalhes sobre a identidade e ecologia destas bactérias que vivem nestes ambientes (ERCOLANI, 1991).

Estes ambientes devem ser estudados primeiramente para entender as relações entre a planta e os microrganismos residentes e posteriormente identificar possíveis bactérias capazes de controlar doenças em plantas, estratégias no controle da contaminação de culturas com patógenos entéricos e bactérias com potencial biotecnológico e que possam servir como indicadores ambientais.

2 Desenvolvimento

2.1 Revisão da literatura

2.1.1 Filosfera

A superfície das folhas é chamada de filosfera onde colônias microbianas se desenvolvem podendo criar um biofilme. A comunidade microbiana presente neste biofilme é chamada epifítica e vive sob a planta.

A filosfera representa um habitat terrestre importante para fungos filamentosos, bactérias, leveduras, algas, protozoários e fitopatógenos, porém não uniforme. A sobrevivência é limitada pela disponibilidade de nutrientes e condições ambientais como flutuações na temperatura na folha a qual pode variar entre 40-50 °C sobre intensa luz solar de verão e 5-10 °C à noite, estresse osmótico e exposição à radiação ultravioleta (UV) (LINDOW; BRANDL, 2003; MORRIS; MONIER; JACQUES, 1997).

A idade e nutrição das folhas, estação do ano, bem como repetidas alterações entre presença e ausência de umidade livre devido à chuva e/ou orvalho, composição da cera, variações morfológicas das folhas e genótipo vegetal podem influenciar no desenvolvimento microbiano (BEATTIE; LINDOW, 1999; CAPE; PERSY, 1993; COLLINS; JACOBSEN, 2003; INÁCIO et al., 2002; JONES et al., 1985; KINKEL, 1997; KINKEL; WILSON; LINDOW, 1996; MERCIER; LINDOW, 1999; ELLIS; THOMPSON; BAILEY, 1999). A densidade populacional de bactérias na filosfera pode variar de 1 a 10 milhões de células cm^{-2} (100 milhões de células g^{-1}) de folha (ANDREWS; HERRIS, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003).

Os organismos encontrados na filosfera podem se originar do solo, água, sementes, plantas vizinhas, sendo limitada por condições físicas ambientais, disponibilidade de imigração e emigração do inóculo por meio de vetores, como animais e especialmente insetos (BEATTIE; LINDOW, 1999; INÁCIO et al., 2002, JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; LINDOW; BRANDL, 2003; PLUMMER; HALL; WATT, 1992; MONIER; LINDOW, 2005).

O crescimento e manutenção da comunidade microbiana na filosfera dependem da composição e nível de nutrientes liberados pela exsudação da própria folha e de injúrias do tecido foliar incluindo carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, bem como o *status* da fisiologia da planta colonizada (TUKEY, 1970; YANG et al., 2001), de outras fontes nutricionais que são depositadas sobre a folha pela atmosfera, como os grãos de pólen trazidos pelos insetos, vento e outros organismos (INÁCIO et al., 2002; KINKEL, 1997).

Vários estudos têm revelado que nutrientes sobre a superfície das folhas são escassos (MERCIER; LINDOW, 1999; LEVEAU; LINDOW, 2001; WILSON; LINDOW, 1994) com distribuição heterogênea, sugerindo que apenas um número limitado de sítios pode oferecer condições para o crescimento microbiano.

Pelos fatores físicos e químicos limitantes ao crescimento bacteriano na filosfera, é esperado a seleção de algumas bactérias capazes de transpor esses limites. Algumas bactérias podem apresentar a habilidade de modificar seu microhabitat, com intuito em aumentar a disponibilidade nutricional. Como exemplo, algumas bactérias podem produzir compostos com propriedades surfactantes para aumentar a permeabilidade sobre as folhas (BUNSTER; FOKKEMA; SCHIPPERS, 1989), sendo que 50% das linhagens de *Pseudomonas* testadas apresentaram essa habilidade. Esse biosurfactante pode facilitar a movimentação da bactéria pela cutícula, que apresenta uma hidrofobicidade natural. A toxina “tolaasin” produzida pela *Pseudomonas tolaasi* (HUTCHISON; JOHNSTONE, 1993) e a toxina “syringomycin” secretada pela *P. syringae* (QUIGLEY; GROSS, 1994) podem auxiliar na exploração de sítios mais abundantes em nutrientes com a solubilização do substrato.

Enquanto a produção do biosurfactantes “syringomycin” é restrita às espécies de *Pseudomonas*, a biosíntese do regulador de crescimento vegetal ácido 3-indol-acético (AIA) é difundida entre bactérias epifíticas (BRANDL; QUINONES; LINDOW, 2001; LINDOW; BRANDL, 2003). O AIA está envolvido em diversos aspectos no desenvolvimento vegetal, e tem sido produzido pela *Pantoea agglomerans* em períodos secos sobre as plantas (MANULIS et al., 1998; LINDOW; BRANDL, 2003). A hipótese é que com a presença da auxina ocorre liberação de sacarídeos pelas células vegetais, o que ocasiona um sítio de nutrição para as bactérias (FRY, 1989; GOLDBERG, 1980).

A síntese de citoquinina por *Methylobacterium* spp. em soja demonstrou um aumento na liberação de metanol por parte da célula vegetal, ocasionando uma disponibilidade para a nutrição bacteriana, porém mais estudos com mutantes deficientes na produção da citoquinina é necessário para elucidar esta hipótese (LINDOW; BRANDL, 2003).

As bactérias geralmente são colonizadoras primárias e dominantes em novas folhas, sendo que leveduras e fungos filamentosos podem dominar em períodos subseqüentes conforme encontrado no trabalho de Jacques e Morris (1995).

Alguns autores consideram os fungos filamentosos como habitantes transientes na superfície das folhas, sendo as leveduras mais rápidas na colonização (ANDREWS; HERRIS, 2000). Alguns autores acreditam que bactérias epifíticas sejam mais abundantes na filosfera, diferindo nitidamente entre o crescimento das comunidades conforme a espécie vegetal, em pequenas escalas de tempo, bem como seu crescimento dependente da estação do ano (ERCOLANI, 1991; THOMPSON et al., 1993). Essas consideráveis variações no crescimento populacional são causadas em grande parte pela flutuação das condições físicas e nutricionais da filosfera (LINDOW; BRANDL, 2003).

Foi observado que a mesma espécie bacteriana quando inoculada em espécies de plantas diferentes e condições ambientais similares, apresentou desenvolvimento da colônia distinta, evidenciando uma possível seleção entre a bactéria e a espécie vegetal (KINKEL; WILSON; LINDOW, 1996; LINDOW; ARNY; UPPER, 1978; O'BRIEN; LINDOW, 1989).

A diversidade bacteriana na filosfera é bastante complexa, em folhas coletadas de trigo, cana-de-açúcar, oliveira e centeio foram identificadas 85 espécies de bactérias em 37 gêneros, (HIRANO; HUPPER, 2000).

O trabalho de Lambais et al. (2006) demonstrou a presença de procariotos epifíticos sobrevivendo sobre a folha da copa de árvores da mata Atlântica, onde foi possível observar que a composição das espécies bacterianas foi significativamente diferente entre três espécies vegetais. Com isso, reforça a hipótese de seleção dos microrganismos pela espécie vegetal.

Em análise microscópica tem-se observado que bactérias são encontradas em pequenas fendas entre células epidérmicas, próximas à base dos tricomas, nas proximidades dos estômatos e ao longo das nervuras (MORRIS; MONIER, 1997).

A dinâmica de populações bacterianas na filosfera pode ter grande variação temporal, no caso da *Erwinia* foi observado um aumento no tamanho da comunidade à noite e declínio durante o dia (THOMPSON et al., 1995).

Em trabalho anterior pelos mesmos autores, a análise de ácidos graxos específicos de bactérias, revelou que a comunidade de *Arthrobacter* e leveduras foram constantes ao longo do tempo e após as chuvas, e indicou que não ocorreu variação temporal significativa em curto prazo (THOMPSON et al., 1993).

Fatores como a variação posicional da folha, a densidade populacional inicial, a acessibilidade da folha aos microrganismos transportados pelo ar, o microclima, condições fisiológicas da planta e atividade de vetores de patógenos foliar podem proporcionar influência na colonização microbiana (ANDREWS; KENERLEY; NORDHEIM, 1980).

A idade da folha é raramente utilizada em procedimentos para determinar o crescimento da população microbiana em sua superfície. Porém, alguns trabalhos têm mostrado que a idade da folha afeta a densidade populacional microbiana epifítica em *Cichorium endivia* var. *latifolia* e a imigração populacional de epifíticas fluorescentes e pectolíticas, é menor em folhas jovens do que folhas mais velhas (JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995), portanto evidenciou que a idade da folha aumenta a densidade populacional de bactérias, mas a maturidade da planta também contribui significativamente para o desenvolvimento populacional.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado que alguns patógenos humanos como a *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. foram detectados em torno de 4% das amostras em tomate e laranjeiras, o que se torna uma questão de saúde pública (LINDOW; BRANDL, 2003). A *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* demonstra habilidade em colonizar milho, feijão e cilantro sobre condições de umidades favoráveis, embora em menores porcentagens que as comunidades bacterianas epifíticas (BRANDL; MANDRELL, 2002). Outros patógenos entéricos como *P. syringae*, *S. enterica* (BRANDL; MANDRELL, 2002), *Enterococcus* spp. (MILLER et al., 2001),

Pseudomonas aeruginosa (CHO et al., 1975) e *Burkholderia cepacia* (BALANDREAU et al., 2001) também foram encontrados na filosfera.

Tem sido demonstrado que bactérias podem proporcionar um controle biológico no congelamento das células vegetais das folhas em árvores frutíferas decíduas, flores, espécies de plantas tropicais e herbáceas sensíveis ao congelamento durante geadas e em ambientes com temperaturas baixas, é o caso da *P. syringae*, que contribui para a redução dos danos causados pela formação de gelo (LINDOW, 1987).

Alguns trabalhos evidenciam que procariotos sobre a superfície foliar podem estar relacionados à atividade antimicrobiana, e podem ocasionar proteção as plantas colonizadas, ou seja, os chamados de biopesticidas como é o caso da bactéria do gênero *Bacillus* (NAIR; SINGH; SEKAR, 2002; HIRANO; UPPER, 2000).

Uma doença que pode ter um controle biológico eficaz é a ferrugem de fogo, que devasta as plantações de pêra e maçã. O agente causador desta doença é a bactéria *Erwinia amylovora* e esta pode ser controlada pelas bactérias *P. fluorescens* linhagem A506 e linhagens de *Pantoea agglomerans* (LINDOW; MCGOURTY; ELKINS, 1996; JOHNSON; STOCKWELL, 1998).

Alguns microrganismos como leveduras, fungos filamentosos, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* e *Erwinia*, foram utilizados em trabalhos com folhas de beterraba, e demonstraram que podem ter a função de indicadores na dinâmica da comunidade microbiana e variação espacial (THOMPSON et al., 1993).

2.1.2 Casca

A superfície da casca abriga uma ampla variedade de organismos, que podem ser patógenos ou não. A comunidade pode sofrer influência ambiental, como disponibilidade de nutrientes, flutuações na temperatura, estresse osmótico, exposição à radiação ultravioleta (UV), nutrição das plantas, estação do ano, alternâncias entre presença e ausência de umidade livre devido à chuva e/ou orvalho, variações morfológicas das cascas e genótipo da planta.

Os organismos encontrados na casca provavelmente originam-se do solo, plantas vizinhas e disponibilidade de imigração e emigração do inóculo por vetores, como animais e insetos.

Os microrganismos epifíticos, que habitam a superfície da caca, devem depender de fontes de nutrientes que são depositadas sobre a casca, como os grãos de pólen trazidos pelos insetos, vento e outros organismos.

É possível que a composição vegetal possa interferir nas comunidades bacterianas, isso se compararmos com trabalhos relacionados aos líquens, que usados como indicadores ambientais demonstram que a comunidade de líquen epifítico é determinada pela qualidade do substrato, tal como a idade, textura da casca, composição química e condições ambientais (IHLEN, GJERDE, SÆTERSDAL, 2001).

Na casca não há trabalhos relacionados à diversidade e variação espacial ou temporal da comunidade bacteriana na própria planta e em relação à espécie vegetal, apenas relatos de bactérias patogênicas, líquens e controle biológico. Provavelmente, a colonização e distribuição devem seguir o mesmo padrão de colonização e manutenção evidenciado para a filosfera.

O modelo de colonização e manutenção das comunidades bacterianas nas cascas não foi estudado, onde pesquisas futuras devem relatar estes fatos.

2.1.3 Solo

A microbiota do solo tem sido caracterizada em diferentes níveis, sobretudo em ecossistemas de clima temperado. Através da análise da cinética de reassociação de DNA, tem sido estimado que o solo possa conter mais de 10.000 genomas microbianos, e que mais de 95% dos microrganismos do solo não podem ser cultivados (TORSVIK; SØRHEIM; GOKSØYR, 1996).

Em trabalhos mais recentes, estima-se que o número de espécies de bactérias por grama de solo pode variar entre 2000 e 8,3 milhões (GANS; WOILINSK; DUNBAR, 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006a).

O estudo da diversidade microbiana dos solos é essencial para: a) aumentar o conhecimento dos recursos genéticos disponíveis e entendimento da distribuição da

diversidade sobre a Terra; b) aumentar o conhecimento do papel funcional dos microrganismos do solo e c) identificar alterações na diversidade microbiana associadas com distúrbios ou técnicas de manejo específicas (KENNEDY; SMITH, 1995).

O solo é um meio natural complexo que influencia o crescimento, a multiplicação, a sobrevivência e outras atividades dos organismos (RANGASWAMI; OBLISAMI, 1967). Os microrganismos não vivem no solo na forma de culturas puras, mas sim, na forma de uma comunidade complexa, onde uma grande variedade de interações é desenvolvida.

O solo recebe influência direta das raízes, é um dos microssítios mais abundantes, e ocorrem diversas interações entre diferentes microrganismos e entre microrganismos e plantas (LYNCH, 1982). Apresenta uma grande variabilidade temporal e espacial, sendo que a sua composição química e as estruturas das comunidades de microrganismos nela presentes são determinadas principalmente pelo desenvolvimento e metabolismo vegetal.

Os exsudados radiculares contêm uma miscelânea de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e outros compostos biologicamente ativos que podem servir de fontes de carbono e/ou energia para os microrganismos. Estima-se que do total de massa seca produzida pela planta, de 1 a 20% é liberado pelas raízes na forma de exsudados (MENCH et al., 1988).

Os microrganismos têm desenvolvido diversas estratégias para se adaptarem ao ambiente vegetal, incluindo as interações benéficas ou não. Essas interações podem ser ocasionadas por fungos, bactérias e vírus (MONTESINOS et al., 2002).

Quanto às interações benéficas, as micorrizas são bastante caracterizadas, que formam associações mutualistas entre raízes e certos fungos do solo, e ocorrem na maioria das espécies vegetais (FISCHER et al., 1994). Já as bactérias podem estabelecer uma associação simbiótica com a planta ou sobreviver como epifítica ou endofítica (MONTESINOS et al., 2002).

Bactérias de vida livre ou não simbióticas podem ser importantes para as plantas, como as bactérias promotoras de crescimento vegetal, tais como bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Bacillus* e como agentes de biocontrole (MONTESINOS et al., 2002). A região próxima as raízes é chamada de rizosfera, e

sofre influências pelo exsudados radiculares, onde são secretados compostos orgânicos que favorece a população microbiana (YANG; CROWLEY, 2000).

Quanto aos fitopatógenos, das 11.000 doenças descritas às plantas, são causadas aproximadamente por 120 gêneros de fungos, 30 tipos de vírus e 8 gêneros de bactérias e a perda na agricultura devido a doenças vegetais pode chegar a 13%, provocando uma diminuição na produção de alimentos (AGRIOS, 1997).

Os agentes de controle biológico são encontrados na parte aérea da planta ou no sistema radicular, contudo poucos microrganismos têm sido identificados. Em alguns casos, os agentes de controle biológico são capazes de competir por sítios de nutrientes com os patógenos e podem sintetizar compostos antimicrobianos como as bactericinas e antibióticos (GUTTERSON, 1990).

Em outros casos, esses agentes podem induzir a resistência sistêmica adquirida em plantas (PRESTON; BERTRAND; RAINEY, 2001). Algumas linhagens não-patogênicas de espécies de *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* e *Bacillus* são descritos como agentes de controle biológico (KUNST, 1997), no entanto os estudos demonstram que sob condições controladas, esses agentes apresentam excelentes resultados, porém não em condições de campo, devido à baixa sobrevivência dos agentes de controle biológico e pela necessidade da alta concentração necessária desses organismos para apresentarem efeito positivo. O mesmo fato também é apresentado pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal (MONTESINOS et. al., 2002).

As doenças também são dependentes das condições ambientais, principalmente os patógenos que apresentam uma fase da vida epifiticamente, sendo principalmente dependente da disponibilidade da água durante as chuvas para migrarem ao solo (AGRIOS, 1997; MONTESINOS et. al., 2002).

Inúmeros fatores bióticos e abióticos do ambiente podem influenciar na estrutura das comunidades microbianas em solos. Esse ambiente apresenta um sistema complexo, com variedade de microhabitats caracterizados por propriedades físicas, químicas e biológicas específicas. Fatores como quantidade e qualidade da matéria orgânica presente em determinado solo, saturação hídrica, granulometria,

características químicas e vegetação podem controlar a atividade, diversidade e estrutura das comunidades microbianas (De LEIJ; WHIPPS; LYNCH, 1994).

Fierer e Jackson (2006) coletaram amostras de solo na América do Sul e do Norte e relataram que a diversidade bacteriana não teve relação com a temperatura, latitude e outras variáveis e a composição da comunidade foi em grande parte independente da distância geográfica. A diversidade e a riqueza das comunidades bacterianas em solo diferiram pelo tipo de ecossistema e principalmente pelo pH do solo, sendo maiores em pH neutro quando comparado com solos em pH ácido. Os autores sugeriram que a biogeografia dos microrganismos é controlada por variáveis edáficas.

Outra atividade desenvolvida pelos microrganismos no solo é a diminuição do CH_4 na atmosfera, sendo capaz de consumir entre 10 a 40 toneladas por grama de solo ano, onde o metano é oxidado pelas bactérias metanotróficas *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* que atenuam as taxas de emissão deste gás em solos (MOHANTY; BODELIER; CONRAD, 2007).

A caracterização das comunidades microbianas do solo sob a projeção da copa de plantas tropicais poderá auxiliar na identificação de microrganismos ainda desconhecidos, contribuindo para a caracterização da biodiversidade microbiana em ecossistemas florestais, servindo como fonte de inóculo em mudas e locais de reflorestamento e demonstrar se a comunidade microbiana recebe influência da espécie vegetal em floresta.

A relação que existe entre a estrutura das comunidades microbianas no solo sob a copa de diferentes espécies vegetais ainda não está esclarecida. A organização dos microrganismos no solo, e como essa organização é afetada pela planta e as condições ambientais são essenciais. Com essas informações, será possível o desenvolvimento de técnicas mais precisas de manipulação da microbiota do solo para o aumento da absorção e ciclagem de nutrientes limitantes ao desenvolvimento vegetal e controle biológico de doenças.

2.1.4 Diversidade e abundância microbiana

A diversidade e a abundância de procariotos em ambientes terrestres, seja em superfícies ou sub-superficiais é pouco conhecida.

O estudo da diversidade microbiana durante muito tempo foi limitada pelos métodos convencionais, com base no cultivo, demonstrando uma pequena porcentagem da microbiota (0,1% a 0,5%) (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990).

A biodiversidade tem sido definida pelos microbiologistas como o número de diferentes espécies em uma comunidade para um ambiente específico e para a ecologia molecular como o número de seqüências de DNA divergentes presentes no DNA total extraído de uma amostra para um ambiente específico (GARBEVA et al., 2004).

Nos últimos anos, com avanço das técnicas moleculares, possibilitou investigar pelo DNA total extraído diretamente de ambientes naturais sem a necessidade de cultivar os microrganismos (ØVREÁS, 2000). Através da análise do DNA metagenômico de procariotos tornou-se possível investigar a diversidade e taxonomia em comunidades complexas, aliado à estatística e a bioinformática, em estudos de ecologia (TORSVIK; ØVREÁS, 2002).

Em diversos ambientes, a estrutura da comunidade de procariotos pode ser avaliada pela seqüência do gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossômico (rRNA 16S). Algumas características deste gene são fundamentais, tais como: presença em todos os procariotos; regiões com seqüência de nucleotídeos hipervariáveis entre regiões conservadas; e tamanho considerável satisfatório para estudos filogenéticos (cerca de 1500 nucleotídeos) (AMANN; LUDWIG, 2000).

Com a utilização da técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) é possível a identificação na variação da seqüência em diversos organismos, sendo possível avaliar a variabilidade do rRNA 16S. A DGGE consiste na separação de fragmentos de mesmo tamanho, obtidas pela amplificação de uma região específica de um gene codificador pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear dos desnaturantes formamida e uréia. O comportamento de migração no gel é determinado pelas

variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA, fazendo com que fragmentos migrem em posições diferentes com base nas diferenças de concentrações de G + C (MUYZER; WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

O seqüenciamento do rRNA 16S tem sido utilizado em diversos estudos da diversidade, caracterização de comunidades complexas e taxonomia de procariotos (LAMBAIS et al., 2005).

As seqüências geradas precisam ser processadas com o auxílio de algoritmos específicos (LAMBAIS et al., 2005) e posteriormente comparadas com seqüências de banco de dados públicos utilizando o GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou Ribossomal Database Project (RDP – <http://rdp.cme.msu.edu/>), sendo possível inferir sua filiação taxonômica. Para isto foi criado o programa RDPquery (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.html), que permite a classificação taxonômica de seqüências de rRNA 16S *Bacteria*.

Para estimar e comparar a diversidade de procariotos, bem como as estruturas de suas comunidades, diversas abordagens estatísticas têm sido utilizadas. A diversidade e a estrutura de comunidades microbianas são analisadas em função da ocorrência de filotipos ou unidades taxonômicas operacionais (UTOs), que podem ser bandas detectadas após a DGGE (DUNBAR et al., 1999) ou seqüências de rRNA 16S (BOND et al., 1995).

Scholoss e Handelsman (2005) desenvolveram o DOTUR (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>), um programa de agrupamento utilizado para definir UTOs de um conjunto de seqüências. Os critérios para definição de UTOs não são consensuais, principalmente quando se discute a distância evolutiva limite para que uma seqüência represente uma UTO, normalmente consideram-se seqüências com similaridade >97% são da mesma espécie, >95% do mesmo gênero e >80% do mesmo filo (BOND et al., 1995), no entanto não é considerada ainda para uma classificação hierárquica precisa, mesmo sendo considerada adequada a taxonomia histórica (SCHOLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Utilizando o programa SPADE (<http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>) é possível calcular os índices de Shannon e recíproco de Simpson, e para a estimativa de

riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao 1 (CHAO; LEE, 1992) (<http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>), além da estimativa da cobertura de amostragem. Para estimar a riqueza é utilizado o Chao 1 (CHAO, 1987), que utiliza o número de espécies raras para estimar a riqueza de UTOs, considerando os filotipos que aparecem uma ou duas vezes em uma biblioteca. Com o algoritmo ACE, as UTOs são separadas em grupos raros e abundantes, e somente os grupos raros são utilizados para estimar a diversidade desconhecida (CHAO; LEE, 1992).

A comparação entre bibliotecas de seqüências e determinar se as comunidades as quais elas representam são ou não estatisticamente diferentes, é proporcionada pelo programa S-LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001 - <http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-libshuff.html>).

Este trabalho tem caráter inovador nos estudos da variação e diversidade da composição bacteriana em ambientes, filosfera, casca e solo sob a copa das árvores amostradas, da Floresta Atlântica de Encosta.

2.2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

1. determinar a variabilidade das estruturas das comunidades de bactérias associadas à filosfera, casca e solo sob a copa de diferentes espécies arbóreas do Parque Estadual “Carlos Botelho” (PECB);
2. estabelecer a relação entre as estruturas das comunidades de bactérias e filogenia das espécies vegetais;
3. determinar as relações entre as comunidades de bactérias da filosfera, casca e solo sob a projeção da copa de diferentes espécies arbóreas;
4. determinar as relações filogenéticas entre UTOs que ocorrem em filosfera, casca e solo sob a projeção da copa das árvores através do seqüenciamento de clones de rRNA 16S.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Local de Amostragem

A coleta do material biológico foi realizada no Parque Estadual de “Carlos Botelho” (PECB) (Floresta Atlântica de Encosta) na região sul do Estado de São Paulo, em uma área de 37.793 ha, com altitudes que variam de 30 a 1003 metros. A área do parque engloba os municípios de Sete Barras, Capão Bonito e São Miguel Arcanjo (DOMINGUES; SILVA, 1988).

No PECB foi instalada uma parcela permanente de 320 x 320 m, totalizando 10,24 ha, subdividida em 256 sub-parcelas contíguas de 20 x 20 m (400 m²), (projeto “Diversidade, Dinâmica e Conservação em Florestas do Estado de São Paulo: 40 ha de parcelas permanentes”, do Programa Biota/Fapesp).

Os indivíduos arbóreos contidos em cada sub-parcela foram numerados e georeferenciados, permitindo a precisa localização de indivíduos das espécies vegetais em estudo.

A diversidade vegetal nesta região é vasta, portanto foram escolhidas espécies relativamente abundantes, com representação em pelo menos três quadrantes. As espécies vegetais foram também escolhidas com base em suas relações filogenéticas, de modo que houvesse espécies da mesma ordem, família e gênero.

2.3.2 Amostragem

As folhas, casca e solo sob a projeção da copa foram amostrados de sete espécies vegetais (Tabela 1) e a descrição das espécies pode ser vista na Tabela 2. Foram coletadas 12 amostras de plantas de cada espécie, com exceção de *T. serratifolia* (11 plantas) e *O. dispersa* (09 plantas). A localização das plantas amostradas pode ser vista na Figura 1. De cada planta foram retiradas 30 folhas, aproximadamente 300g de casca e 400g de solo.

As amostras de folhas foram retiradas da parte média da copa (aproximadamente 8m de altura). Foram retirados 3 ramos com o auxílio do podão e

com a tesoura de poda foram retiradas as folhas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos devidamente identificados e mantidas em caixas térmicas com gelo. As amostras foram manuseadas com luvas de látex e a tesoura de poda lavada com água destilada esterilizada e álcool 70% entre as amostragens, para evitar possíveis contaminações.

Fragmentos de aproximadamente 5x25 cm de cascas foram retirados das árvores com auxílio de uma faca a 1 metro do solo. Sob a projeção da copa das árvores selecionadas, foi coletada uma amostra de aproximadamente 400g a 20 cm da base do tronco e a uma profundidade de 0-20 cm, após a remoção da serrapilheira.

No final da coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento Ciência do Solo da ESALQ e processadas imediatamente.

Tabela 1 - Espécies vegetais amostradas no Parque Estadual "Carlos Botelho"

Ordem	Família	Gênero	Espécies
Laurales	Lauraceae	Ocotea	<i>O. dispersa</i>
			<i>O. teleiandra</i>
	Monimiaceae	Mollinedia	<i>M. schottiana</i>
			<i>M. uleana</i>
Myrtales	Myrtaceae	Eugenia	<i>E. cuprea</i>
			<i>E. melanogyna</i>
Lamiales	Bignoniaceae	Tabebuia	<i>T. serratifolia</i>

Tabela 2 – Descrição das espécies vegetais amostradas no Parque Estadual "Carlos Botelho"

(continua)

N. científico	Nome vulgar	Descrição	Observações
<i>Ocotea dispersa</i> (Nees) Mez 1889	Canela-sassafrás, canelinha, canela-sabão, canela-pimenta.	Árvore de até 18m de altura. Ramos estriados, acinzentados, nas partes jovens densamente pubescentes. Folhas simples, alternas, cartáceas, elípticas a obovais, ápice acuminado, base aguda. Inflorescências em panículas, axilares, densamente pubescentes, castanhas, de 1,8-15 cm de comprimento. Flores alvas a creme-esverdeadas medindo cerca de 3mm de comprimento. Fruto drupa, elíptica, com tépalas persistentes na borda, 1,0-1,3x0,6-0,8 cm.	Perenifólia

Tabela 2 – descrição das espécies vegetais coletadas no Parque Estadual “Carlos Botelho”

N. científico	Nome vulgar	Descrição	(conclusão)
			Observações
<i>Ocotea teleiandra</i> (Meisn.) Mez 1889	Canela-iacuí, canela-limão, canela-pimenta	Não descrito	Utilizadas na medicina popular, relacionando as partes utilizadas, forma de uso e as suas propriedades medicinais
<i>Mollinedia schottiana</i> (Spreng.) Perkins 1900	Capixim, espínheira santa.	Arbusto de 3,0 m de altura. Casca externa lenticelada, cinza-clara, levemente escamosa. Ramos cilíndrico, glabro ou piloso. Folhas oblanceoladas, elíptico-lanceoladas a obovais, face adaxial esparsamente pilosa, face abaxial pubescente, ápice agudo a acuminado, margem com alguns dentes no terço superior, base aguda, 6,0 a 11,0 cm de comprimento por 2,0 a 4,0 cm largura. Inflorescência triflora, às vezes em pares opostos nos râmulos, tomentosas. Fruto, drupa ovóide, amarelo-esverdeado quando maduro e castanho quando seco, com 1,2 cm de comprimento e 0,9 de largura.	Raiz gemífera A madeira é muito elástica e flexível apropriada para arcos de barricas e obras similares, tem, entretanto, o defeito de rachar com facilidade.
<i>Mollinedia uleana</i> Perkins 1900	Capixim, pimenteira.	Árvore de 6 a 7 m de altura. Folhas elípticas a lanceoladas ou oblongas, pecioladas, de 8 a 14 cm de comprimento e 3 a 5,5 cm de largura, tomentosas na face inferior, ápice agudo-acuminado, base aguda. Flores díclinas de 0,6 a 1 cm de diâmetro, reunidas em inflorescências do tipo cimeira, multifloras. Fruto do tipo drupa, ovóide, alongado de 2 cm de comprimento.	Perenifólia
<i>Eugenia cuprea</i> (O.Berg) Mattos 1989	Murturana.	Árvoreta de até 5m de altura. Folhas discolores, verde-foscas na face superior e ócreas na face inferior, com 5,5-10 cm de comprimento por 2-3,2 cm de largura. Flores solitárias, botões florais globosos, medindo 8 por 7 mm. Frutos globosos, lisos, de coloração alaranjada quando maduros, com aproximadamente 10-12 mm de diâmetro.	Sinonímia botânica- <i>Eugenia grandisepala</i>

Fonte: Laboratório de ecologia e restauração vegetal (http://143.107.209.124/lcb/esp_regio.asp).
<http://www.arvores.brasil.nom.br>. Instituto de Botânica <http://www.ibot.sp.gov.br>.
<http://www.plantamed.com.br>. <http://herbario.iac.sp.gov.br>.

Figura 1 - Mapa com a localização das plantas amostradas na parcela permanente do Parque Estadual de "Carlos Botelho". Os números e letras identificam as sub-parcelas e os números em negrito identificam os quadrantes. As amostras marcadas com Δ foram usadas para a análise das comunidades bacterianas por seqüenciamento de clones do gene rRNA 16s

2.3.3 Desalojamento dos microrganismos da filosfera e casca

Sob condições assépticas, entre 25 e 50 folhas e fragmentos de casca com aproximadamente 5x25 cm de cada espécie arbórea, dependendo da área foliar, foram acondicionadas em béqueres autoclavados (500 mL) contendo solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e sonicadas por 10 minutos a 22.5 kHz num disruptor de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA).

A solução tampão contendo a suspensão de células resultante foi centrifugada a 30.000g por 15 minutos a 4°C. O pélete resultante foi ressuspenso em 1,0 mL de solução tampão e as amostras foram armazenadas a -20°C até o processo de DNA.

2.3.4 Extração de DNA total da filosfera e casca

O DNA total da filosfera e casca foi extraído utilizando o kit “Fast DNA” (MP Biomedicals, Solon, USA) Em microtubos contendo granada finamente moída e 2 esferas, foi adicionado 200 µL da solução tampão contendo a suspensão de células e 1 mL da solução CLS-TC.

Estes tubos foram agitados horizontalmente por 30 segundos a 4 m s⁻¹, utilizando o equipamento Fast Prep FP120 instrument (MP Biomedicals, Solon, USA), conforme as orientações do fabricante. Em seguida, foi centrifugado por 5 minutos a 13000g (mod. 5415D, Eppendorf do Brasil, São Paulo, BR). Do sobrenadante, 600 µL foi transferido para um tubo limpo. A essa solução foi adicionado 600 µL de “Binding matrix”, agitando-se os tubos lentamente 5 minutos por inversão.

Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 13000g e o sobrenadante foi descartado. Com ajuda de uma ponteira, o pellet foi ressuspenso gentilmente com 500 µL de “SEWS-M”. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 13000g e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso gentilmente por 2 a 3 minutos adicionando 100 µL de “DES”. As amostras foram armazenadas em freezer (-20°C).

A integridade do DNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando TBE 0,5x (1xTBE: 44 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0), e coloração com SYBR Green (GE Healthcare, São Paulo, BR).

A concentração de DNA foi determinada através de densitometria utilizando o marcador “Low Mass Ladder” (Invitrogen, São Paulo, BR) como padrão, um densitômetro laser FluorImager (GE Healthcare, São Paulo, BR) e o Programa “Fragment Analyses” (GE Healthcare, São Paulo, BR).

2.3.5 Extração do DNA total do solo

Para a extração do DNA total do solo, foi utilizado o “kit FastDNA Spin for Soil” (MP Biomedicals, Solon, USA). Em microtubos contendo granada finamente moída, foi adicionado 0,5g de solo, 978 μL de tampão fosfato e 122 μL de tampão MT.

Estes tubos foram agitados horizontalmente por 30 segundos a 4 m s^{-1} , em um Fast Prep FP120 instrument (MP Biomedicals, Solon, USA). Em seguida, foi centrifugado por 1 minuto a 13000g (mod. 5415D, Eppendorf do Brasil, São Paulo, BR). O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. A essa solução foi adicionado 250 μL de tampão PPS, agitando-se os tubos 10 vezes por inversão.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 13000g e o sobrenadante coletado transferido em um microtubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 2 minutos por inversão.

Em seguida os tubos foram incubados por 3 minutos a matriz de ligação será transferida para um filtro acoplado a um microtubo (Spin Filter, MP Biomedicals, Solon, USA), e os tubos centrifugados por 2 minutos a 13000g. A matriz de ligação retida no filtro foi lavada com 500 μL de uma solução (SEWS), e o filtro centrifugado 2 vezes por 2 minutos a 13000g.

Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 50 μL de água ultrapura ao filtro e centrifugado por 2 minutos a 13000g. O DNA puro foi recolhido em um tubo limpo e sua quantificação feita por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X (1xTBE: 44 mM Tris-borato, 1 mM EDTA

pH 8,0), utilizando-se um densitômetro laser FluorImagem (GE Healthcare, São Paulo, BR) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare, São Paulo, BR).

Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, BR).

2.3.6 Amplificação do gene rRNA por PCR

A região V3 do gene rRNA 16S foi amplificada pela PCR utilizando-se o DNA total como molde e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREAS et al., 1997).

A amplificação foi realizada em solução contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 X; 0,2 mM dNTP; 3,0 mM MgCl₂; 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen, São Paulo, BR); 10 ng de DNA total; 5 pmol de cada iniciador; água ultra pura esterilizada para um volume final de 25 µL.

Em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf do Brasil, São Paulo, BR) foi realizada a amplificação dos fragmentos do gene rRNA 16s nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto; pareamento à 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto; extensão final à 72°C durante 10 minutos.

A quantificação dos amplicons resultantes foi realizada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X, e coloração com SYBR Green (GE Healthcare, São Paulo, BR), utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (GE Healthcare, São Paulo, BR) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare, São Paulo, BR). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, BR).

2.3.7 Caracterização das estruturas das comunidades bacterianas por DGGE

Os amplicons do gene rRNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). A DGGE consiste na separação de

fragmentos de DNA de mesmo tamanho em um gel de poliacrilamida contendo gradiente desnaturante (formamida e uréia) (ØVREAS et al., 1997).

As variações na migração dos fragmentos de nucleotídeos no gel são referentes as diferenças na concentração de G + C. Os géis de acrilamina:bisacrilamida (37,5 : 1; m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante variando de 15 a 55%, utilizando duas soluções: solução desnaturante 100%, contendo 40% (v/v) formamida e 7 M uréia, e solução desnaturante 0%, sem uréia e formamida (ØVREAS et al., 1997).

A eletroforese foi realizada a 60°C e 200 V constantes por 4 horas, em um sistema de eletroforese vertical DCode (Bio-Rad Laboratories, Rio de Janeiro, BR), utilizando solução tampão TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato, 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Após eletroforese, o gel foi fixado em uma solução 10% de ácido acético glacial por 15 minutos. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com água destilada, imerso em solução de metanol 50% por 15 minutos, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução de VISTRA-Green I (1:10000; v/v) (GE Healthcare, São Paulo, BR) por 30 minutos. Após a coloração, o gel foi lavado três vezes com água destilada e analisado por densitometria, utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (GE Healthcare, São Paulo, BR) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare, São Paulo, BR).

Os géis foram analisados utilizando o programa Diversity Database (Bio-Rad Laboratories, Rio de Janeiro, BR), para determinação da riqueza dos amplicons das amostras, em função das repetições das amostras para cada espécie vegetal. Também foi analisada a estrutura das comunidades entre as espécies vegetais.

A análise de similaridade entre as estruturas das comunidades bacterianas das amostras foi realizada através de concordância simples ("simple matching"), usando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como medida, através do programa Systat 12, com base em dados binários para presença ou ausência (1 ou 0) das bandas detectadas após a DGGE..

2.3.8 Síntese de bibliotecas de clones dos genes rRNA 16S

As bibliotecas de clones da região V1-V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria* foram sintetizados a partir da amplificação por PCR, utilizando-se o DNA total extraído e os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREAS et al., 1997).

Os amplicons obtidos foram quantificados em gel de agarose 0,8% por densitometria conforme demonstrado acima. Esses fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega/Prodimol Biotecnologia S.A. Belo Horizonte, BR), conforme especificações do fabricante. A reação de ligação dos produtos da PCR ao plasmídeo pGEM-T Easy foi realizada em tampão de ligação rápida 1X (30 mM de Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM de MgCl₂; 10 mM de DTT; 1 mM de ATP; e 5% de polietileno glicol) e 3U de T4 DNA ligase. O material foi incubado a 4°C durante a noite.

Em seguida, células competentes de *E. coli* DH5 α (100 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 e em seguida foi acrescido 300 μ L de meio CG (Circlegrow, MP Biomedicals, Solon, USA) e incubado sob agitação em agitador (Innova 4300, Incubator Shaker, LabX, Midland, Canada) a 37°C por 1 hora a 150 rpm. Após o plaqueamento das células transformadas em meio líquido CG contendo ampicilina (50 μ g mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactoside), os clones foram incubadas a 37°C por 14 horas.

2.3.9 Extração do DNA plasmidial

Após o desenvolvimento das colônias, foram selecionadas aquelas que continham plasmídeos recombinantes. Estas foram cultivadas em placas alta de crescimento (96 poços) contendo 1 mL de meio CG líquido com ampicilina (50 μ g mL⁻¹), a 37°C sob agitação (300 rpm) durante 22 horas e seladas com adesivo. O meio foi centrifugado a 2250g por 5 minutos a 4°C. O pélete foi lavado com 240 μ L de uma

solução contendo 1M de Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M de EDTA pH 8,0; 0,9% de glicose e agitado em vórtex por 2 minutos para ressuspender o pélete.

Em seguida, as suspensões bacterianas foram centrifugadas por 6 minutos a 2250g para sedimentação das células. A solução foi descartada e as placas foram invertidas sobre papel absorvente por 5 minutos. Após este período, foi adicionado 80 µL da mesma solução de lavagem e as suspensões foram agitadas em vórtex por 2 minutos.

Em uma placa com 96 poços de fundo U, foi adicionada 60 µL de uma solução contendo SDS 1% e NaOH 0,2 N acrescido em cada poço 1 µL de RNase (10 mg/mL) (Qiagen, São Paulo, Brasil) e 60 µL da solução contendo o plasmídeo recombinante (passo anterior). A placa foi selada com adesivo, homogeneizada por inversão e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente.

As placas foram centrifugadas rapidamente e adicionada 60 µL de uma solução contendo acetato de potássio 5 M (60 mL), ácido acético glacial 10% (11,5 mL) e água ultra pura (28,5 mL), misturou-se por inversão, incubou-se em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se rapidamente. As placas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e resfriada em gelo por 10 minutos. O adesivo foi recolocado e as placas centrifugadas a temperatura ambiente por 4 minutos a 2250g. Transferiu-se 100 µL para a placa de filtro acondicionada sobre a placa de fundo V e centrifugou-se por 4 minutos a 2250g.

O DNA foi precipitado adicionando-se isopropanol gelado (100 µL) e misturando-se por inversão. Centrifugou-se a 2250g por 45 minutos a 4°C e lavou-se o pélete em etanol 70% gelado (200 µL). Centrifugou-se por 5 minutos a 2250 g, descartou-se o sobrenadante. As placas foram centrifugadas por 1 minuto, invertidas sobre papel absorvente, a 560g e parâmetros de aceleração e freio do rotor em escala 1 (mod 5415R, Eppendorf do Brasil, São Paulo, BR). As placas foram secas por 1 hora em temperatura ambiente e o pélete foi ressuspensionado em água ultra pura esterilizada. As placas foram estocadas a freezer -20°C.

2.3.10 PCR de seqüenciamento utilizando “Big Dye Terminator”

Para o seqüenciamento utilizou-se uma alíquota de 100 ng de DNA plasmidial. A concentração do DNA foi determinada por comparação de massa pGEM (Promega/Prodinol Biotecnologia S.A. Belo Horizonte, BR) e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% - TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green I (Invitrogen, São Paulo, BR) após varredura, utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (GE Healthcare, São Paulo, BR).

Ao DNA plasmidial foi adicionado 10 pmol do iniciador M13f, 1 µL de “DYEnamic ET Terminator” (GE Healthcare, São Paulo, BR), 3 µL de Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) e água ultra pura para um volume final de 10 µL.

A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) nas seguintes condições: 25 ciclos a 95°C por 20 segundos, 54°C por 15 segundos e 60°C durante 1 minuto.

2.3.11 Purificação do DNA e seqüenciamento

Em cada amostra (poço) foi adicionado 2 µL de uma solução de acetato de potássio 3 M e EDTA 0,5 M pH 8,0 e homogeneizada em vórtex. Em seguida foi adicionado etanol absoluto (60 µL/amostra) e novamente homogeneizada em vórtex.

Centrifugou-se por 45 minutos a 2250g por 4°C. Descartou-se o sobrenadante centrifugou-se por 1 minuto as placas invertidas sobre papel absorvente a 560g e parâmetros de aceleração e freio do rotor em escala 1.

Adicionou-se etanol 70% gelado (150 µL/amostra), centrifugou-se por 5 minutos a 2250g por 4°C. Descartou-se o sobrenadante centrifugou-se por 1 minuto as placas invertidas sobre papel absorvente a 560g e parâmetros de aceleração e freio do rotor em escala 1.

As placas foram acondicionadas em local protegido da luz a temperatura ambiente e deixadas para secar durante a noite. O DNA foi resolubilizado em formamida e seqüenciadas em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems do Brasil, São Paulo, BR) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.3.12 Análise das seqüências de rRNA 16S

As seqüências foram inicialmente processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade > 20, menos de um erro em 100 nucleotídeos) e seqüências do vetor.

Para a classificação taxonômica das seqüências obtidas utilizou-se o programa RDPquery “release 9_52” de 05 de julho de 2007 (http://simo.marshci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm), que compara cada seqüência do gene rRNA 16S com as seqüências depositadas no Ribossomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), e com base na distância evolutiva entre as seqüências classificadas, define a possível afiliação em diferentes níveis taxonômicos.

O alinhamento das seqüências foi realizado pelo programa ClustalX 1.83 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>), com definições de parâmetros padrão, exceto “gap-opening penalty” (10.0) e “gap-extension penalty” (0.1) (THOMPSON, et al., 1997).

Para o agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005) (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur.html>). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada com o DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) Phylip 3.63 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>) (CHAO; SHEN; HWANG 2006).

A abundância das diferentes UTOs foi computada e utilizando-se o programa SPADE (<http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>) foram calculados com base na distância evolutiva 0,03 os índices de Shannon, recíproco de Simpson, a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; LEE, 1992) (<http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>), além da estimativa da cobertura de amostragem. Foram utilizados as definições de parâmetros padrão do programa.

A comparação entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/S-libshuff.html>), após o alinhamento das seqüências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima (SINGLETON et al., 2001).

A matriz de abundância das diferentes UTOs foi também utilizada para definir UTOs comuns entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S pelo programa SONS (<http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/sons.html>), utilizando a distância evolutiva 0,03 (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006b).

2.3.13 Morfotipos microbianos na filosfera

Fragmentos de folhas (0,5 x 0,5 cm) foram selecionados e acondicionados em frascos com solução fixadora de Karnovisk durante a noite (NOGUEIRA et al., 2007). Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato por três vezes e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período, foram lavadas por três vezes em água destilada e desidratadas em acetona (25, 50, 75 e 90% por 10 minutos cada concentração e 3 vezes 100% por 10 minutos cada).

Em seguida, o material foi seco ao ponto crítico com CO₂, utilizando Balzers Critical Point Dryer CPD 030 (BAL-TEC/ELMI-TEC, São Paulo, Brasil). O material foi revestido em ouro utilizando um evaporador Balzers Union Med 010 (Balzers Union, Balzers, Liechtenstein). Os fragmentos de folhas foram analisados utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM940A (Sigma Chemical Company, St Louis, USA) com voltagem de aceleração entre 10,0-15,0 kV.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram comparadas as estruturas das comunidades de bactérias da filosfera, casca e solo sob a projeção da copa de sete espécies vegetais de uma parcela permanente instalada no Parque Estadual “Carlos Botelho”. Os resultados são apresentados a seguir.

2.4.1 Filosfera

2.4.1.1 Estrutura das comunidades bacterianas avaliada por DGGE

As estruturas das comunidades bacterianas com base nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S detectados após DGGE na filosfera de sete espécies arbóreas, são mostradas na Figura 2, onde é possível verificar as repetições de plantas de mesma espécie, no entanto distribuídas dentro da mata. Para a análise dos géis foi utilizado o programa Diversity Database, sendo possível determinar a riqueza dos amplicons com base no total de bandas detectáveis em função da espécie vegetal e distribuição espacial das amostras das plantas.

As bandas foram detectadas por amostras e no total das espécies vegetais, onde foi possível observar variações no comportamento da estrutura das comunidades de bactérias, demonstrando a complexidade das amostras.

As diferenças demonstradas pela DGGE entre as repetições das amostras podem ser atribuídas a fatores ambientais, como exemplos, a altura das plantas, ou dos vegetais que rodeiam a planta amostrada e presença de algumas clareiras abertas naturalmente, fatos que pode ocasionar uma diferença na intensidade luminosa, a alteração da umidade e temperatura sendo possível alterar a estrutura das comunidades bacterianas (LINDOW; BRANDL, 2003; JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; ANDREWS; KENERLEY; NORDHEIM, 1980).

Outros fatores também podem influenciar neste resultado, o *status* da fisiologia da planta que libera nutrientes pela exsudação (YANG et al., 2001) e patógenos foliar também podem proporcionar influência na colonização microbiana (ANDREWS;

KENERLEY; NORDHEIM, 1980). Conforme alguns autores, a colonização bacteriana pode estar relacionada com a nutrição da planta (LINDOW; BRANDL, 2003; YANG et al., 2001) que deve estar relacionada aos fatores químicos e físicos do solo (De LEIJ; WHIPPS; LYNCH, 1994), sendo possível alterar as estruturas das comunidades na filosfera, visto que o local da amostragem é bastante irregular, com diferença na altitude entre uma amostra e outra, presença de água em abundância no solo em algumas amostras e ausência em outras e diferenças química e física do solo (RODRIGUES, 2005).

Para verificar se a estrutura das comunidades de bactérias da filosfera de plantas de mesma espécie geograficamente mais próximas entre si apresentam maior similaridade do que com plantas geograficamente mais distantes, foi feita uma análise discriminante em função do quadrante onde a planta amostrada se localiza (Tabela 3). Os resultados indicaram que a localização das plantas dentro da área de coleta não influenciou a estrutura das comunidades de bactérias da filosfera em relação à espécie vegetal, evidenciando uma relação entre a planta e as bactérias epifíticas.

Figura 2 - DGGE de amplicons do rRNA 16S de *Bacteria*, com base nos perfis de amplicons detectados em filosfera das árvores amostradas, onde Q1, Q2, Q3 e Q4 indicam os quadrantes onde as plantas se encontram na floresta

Tabela 3 – Análise discriminante de comunidades bacterianas associadas com os quadrantes onde as plantas se encontram na floresta

Quadrantes	1	2	3	4
1	14	1	1	1
2	0	21	1	1
3	1	1	23	0
4	0	0	0	15
Total de N	15	23	25	17
N correct	14	21	23	15

2.4.1.2 Agrupamento hierárquico dos amplicons

A análise de agrupamento hierárquico ilustrado na Figura 3, com base no perfil dos amplicons mostra o agrupamento das amostras, obtendo uma classificação ao nível de ordem das espécies vegetais. Esses resultados indicam que a variação das estruturas das comunidades de microrganismos recebe influência das plantas e são dependentes da espécie vegetal, provavelmente pela dificuldade encontrada para obtenção de nutrientes, tendo os microrganismos que se adaptarem as condições oferecidas pela espécie vegetal, como disponibilidade e composição dos exsudados, morfologia da folha e *status* nutricional da planta (LINDOW; BRANDL, 2003; JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; ANDREWS; KENERLEY; NORDHEIM, 1980). Outro fator que deve ser investigado é a presença de patógenos específicos, que podem ser competidores por nutrientes e podem alterar a microbiota (LINDOW; McGOURTY; ELKINS, 1996; JOHNSON; STOCKWELL, 1998).

Figura 3 - Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rRNA 16S de *Bacteria* por DGGE em filosfera das espécies vegetais

2.4.1.3 Análise de componentes principais com base nos amplicons

Para confirmar os resultados obtidos por agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de *Bacteria* a partir da DGGE, foi feita uma análise de componentes principais (PCA), os resultados indicaram que as comunidades bacterianas foram mais similares entre si do que entre plantas de espécies diferentes (Figura 4).

Com base nos resultados as comunidades bacterianas são mais dependentes as espécies vegetais do que sítios localizados dentro da mata onde determinados grupos de bactérias poderiam ser dominantes. Baudoin; Benizri; Guckert, (2003) evidenciaram em seu trabalho uma possível relação entre comunidades bacterianas específicas sobrevivendo sob influência de espécies vegetais, sendo o exsudado um dos principais controladores desta relação. O estabelecimento de comunidades específicas pode estar relacionado também às estruturas morfológicas específicas para cada espécie vegetal, como por exemplo, a presença de tricomas, composição da cera e ângulo foliar (MERCIER; LINDOW, 1999; LINDOW; BRANDL, 2003).

Esses dados corroboram com os resultados de Lambais et al., (2006), os quais observaram a variação dos amplicons entre as espécies vegetais coletadas na Estação Ecológica de Caetetus, onde os autores observaram que as comunidades bacterianas em três espécies vegetais foram estatisticamente diferente.

Estes resultados confirmam a hipótese que a espécie vegetal foi mais importante para seleção de organismos residentes na filosfera em espécies vegetais dentro da floresta e os resultados relacionados à distribuição espacial das plantas de mesma espécie vegetal não foram relevantes para influenciar e alterar a comunidade bacteriana na filosfera. Fato também discutido no trabalho de Yang et al. (2001), quando observaram a diversidade de amplicons pela DGGE em diversas plantas indicando uma possível pressão de seleção dos microrganismos epifíticos em relação às espécies vegetais amostradas.

Figura 4 - Análise de componentes principais (PCA) obtidos pela DGGE com base nos amplicons de filosfera. Os dados são referentes à dispersão das espécies vegetais nos quadrantes dentro da área de coleta. *Ocotea dispersa* - ○; *Ocotea teleiandra* - □; *Mollinedia schottiana* - ◇; *Mollinedia uleana* - ◻; *Eugenia cuprea* - ●; *Eugenia melanogyna* - ■; *Tabebuia serratifolia* - ◆

2.4.1.4 Afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S de filosfera

A afiliação filogenética com base nas seqüências de nucleotídeos dos clones do gene rRNA 16S de filosfera foi feita utilizando o programa RDPquery, indicaram bactérias de 8 filos e 13 classes na filosfera das sete espécies vegetais (Figura 5).

Bactérias do filo *Proteobacteria*, foram as mais abundantes na filosfera das espécies vegetais coletadas, e representam aproximadamente 60 a 90% do total das seqüências analisadas. As *Proteobacteria* são todas Gram⁻, com representantes de diversos grupos de organismos como bactérias púrpuras fototróficas, bactérias nitrificadoras, metanotróficas e outras (MADIGAN; MARTINKO, 2005). Este filo é morfologicamente e metabolicamente diversificado (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998), subdivide-se em 5 classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*.

Deste filo, foram detectadas seqüências de quatro classes, onde estão presente em todas as espécies vegetais a *Alphaproteobacteria* que representam entre 3,95 e 77,22%, *Betaproteobacteria* entre 1,11 e 9,21% e *Gammaproteobacteria* 5,06 e 69,74% do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, e *Deltaproteobacteria* presente apenas em *E. melanogyna* 1,11% e *M. uleana* 4,65%.

O filo *Bacteroidetes* foi o segundo filo mais abundante encontrado na filosfera de *O. dispersa* (6,41%), *M. schottiana* (8,96%), *M. uleana* (16,28%) e *E. melanogyna* (10%) do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, e foram encontradas duas das três grandes classes, as *Flavobacteria*, que representam entre 1,32 e 8,89%, porém ausente nas plantas de *O. teleiandra* e *E. cuprea*, e *Sphingobacteria*, que representam entre 0,50 e 6,98%, no entanto ausente nas plantas de *O. dispersa* e *T. serratifolia*. Colônias de *Flavobacterium* freqüentemente exibem pigmentação amarelada e são organismos fisiologicamente restritos, utilizando glicose como fonte de carbono e energia (MADIGAN; MARTINKO, 2005). As bactérias pigmentadas são adaptadas e demonstram maior tolerância a radiação solar, sendo um dos fatores ambientais que podem ser limitantes aos organismos epifíticos (LINDOW; BRANDL, 2003).

Bactérias do filo *Cyanobacteria* representam 3,21% para *O. dispersa*, 5,97% *M. schottiana*, 13,95% *E. cuprea*, 7,78% *E. melanogyna* e 3,95% *T. serratifolia* das seqüências de clones do gene rRNA 16S da filosfera das plantas amostradas, sendo a porcentagem do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, com exceção da *M. uleana* e *O. teleiandra* que não apresentaram este filo. São encontradas amplamente distribuídas na natureza, em ambientes terrestres, água doce e marinha, superfície de rochas ou solo e ambientes extremos. Compreendem um grande grupo de bactérias fototróficas oxigênicas (organismos emissores de oxigênio) e morfologicamente heterogêneas, desde unicelulares a filamentosas. As cianobactérias apresentam um tipo de clorofila (clorofila α), e todas apresentam pigmentos característicos do tipo biliproteína (ficobilinas), que atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese. A nutrição é simples, não requerem vitaminas, utilizando nitrato ou amônia como fonte de nitrogênio. Algumas espécies são fixadoras de nitrogênio e a maioria das espécies é incapaz de crescer na ausência de luz (MADIGAN; MARTINKO, 2005).

O filo *Acidobacteria* representa 0,64% para *O. dispersa*, 3,48% *M. schottiana*, 2,33% *E. cuprea* e 3,33% *E. melanogyna* das seqüências de clones do gene rRNA 16S da filosfera das plantas amostradas, sendo a porcentagem do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, com exceção da *M. uleana*, *O. teleiandra* e *T. serratifolia* que não apresentaram este filo. Este filo foi proposto em 1995 (HIRAISHI et al., 1995a) e possui apenas 3 representantes cultiváveis: *Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida* e *Geotrix fermentans*. A maioria das seqüências dos organismos que compõe esse filo tem origem de amostras ambientais e são amplamente distribuídas pelo planeta, no entanto a qualidade das seqüências não foi satisfatória, impossibilitando identificar ao nível de espécie.

Bactérias do filo *Actinobacteria* representam 0,64% para *O. dispersa*, 2,53% *O. teleiandra*, 1% *M. schottiana*, 4,65% *E. cuprea*, 1,67% *E. melanogyna* e 1,32% *T. serratifolia* das seqüências obtidas da filosfera das plantas amostradas, sendo a porcentagem do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, com exceção da *M. uleana* que não apresentou este filo. São do grupo de bactérias gram-positivas, é amplamente distribuída em áreas terrestres, água doce e marinha, onde

estão envolvidas com os compostos orgânicos e xenobióticos. Algumas são patógenos de animais, homens e plantas, onde outras fixam o nitrogênio em associações com plantas não leguminosas (STACH et al., 2003).

O filo *Gemmatimonadetes* representa 0,64% das seqüências obtidas da filosfera da espécie vegetal *O. dispersa*, sendo que as demais espécies vegetais não apresentaram este filo. Este filo foi proposto com base em seqüências de rRNA 16S detectadas em ambientes marinhos, sedimentos, solos e lodo industrial, existindo apenas uma espécie isolada, (*Gemmatimonas aurantiaca*), descrita como Gram⁻, aeróbica, mesófila e acumula polifosfatos (ZHANG et al., 2003).

O filo *Firmicutes* esta representado somente nas plantas de *M. uleana* (3,49%) das seqüências obtidas. Este filo foi descrito como Gram⁺, baixo GC, os dois gêneros mais conhecidos são os *Bacillus* e *Clostridium*, produzem endósporos, tornando-os resistentes ao calor e a dissecação sendo importante para a sobrevivência na filosfera (MADIGAN; MARTINKO, 2005).

O filo *Nitrospira* esta representado apenas nas plantas de *O. teleiandra*, com 1,27% das seqüências obtidas para esta espécie vegetal. São quimiolitotróficos ou quimiorganotróficos, podendo variar de mesófilos a termófilos e oxidam NO₂⁻ a NO₃⁻ e cresce autotroficamente (MADIGAN; MARTINKO, 2005).

Na Figura 6 é demonstrada a afiliação filogenética com base nas seqüências de nucleotídeos dos clones do gene rRNA 16S de filosfera foi feita utilizando o programa RDPquery, indicaram bactérias de 6 filos e 10 classes na filosfera das quatro amostras de *E. melanogyna* que estão distribuídas na floresta. Esta comparação teve como objetivo de verificar se ocorrem diferenças na biogeografia de bactérias epifíticas presente na filosfera de mesma espécie vegetal.

Bactérias do filo *Proteobacteria*, foram as mais abundantes na filosfera das espécies vegetais coletadas, e representam aproximadamente 73 a 89% do total das seqüências analisadas para as quatro plantas.

Deste filo, foram detectadas seqüências de quatro classes, onde estão presente em todas as espécies vegetais a *Alphaproteobacteria* que representam entre 10,53 e 25,77%, *Betaproteobacteria* entre 1,11 e 8,59% e *Gammaproteobacteria* 46,63 e

71,05% do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, e *Deltaproteobacteria* presente apenas duas amostras 35F 1,11% e 32F 5,52%.

O filo *Bacterioidetes* foi o segundo filo mais abundante encontrado na filosfera da amostra 32F (9,82%), 41F (13,16%) e 35F (10%) do total das seqüências específicas para cada amostra, e foram encontradas duas das três grandes classes, as *Flavobacteria*, que representam entre 1,23 e 8,89%, porém ausente na amostra 41F, e *Sphingobacteria*, que representam entre 1,11 e 13,16%.

Bactérias do filo *Cyanobacteria* representam 0,89% para a amostra 28F e 7,78% para a amostra 35F das seqüências de clones do gene rRNA 16S da filosfera das plantas amostradas, sendo a porcentagem do total das seqüências específicas para cada amostra, com exceção das amostras 32F e 41F que não apresentaram este filo.

O filo *Acidobacteria* representa 0,61% para a amostra 32F e 3,33% para a amostra 35F das seqüências de clones do gene rRNA 16S da filosfera das repetições das amostras, sendo a porcentagem do total das seqüências específicas para cada planta, com exceção das amostras 28F e 41F que não apresentaram este filo.

Bactérias do filo *actinobacteria* representam 0,64% para *O. dispersa*, 2,53% *O. teleiandra*, 1% *M. schottiana*, 4,65% *E. cuprea*, 1,79% para a amostra 28F, 1,84% para 32F e 1,67% para 35F das seqüências obtidas da filosfera das plantas amostradas, sendo a porcentagem do total das seqüências específicas para cada planta. A amostra 41F não apresentou este filo.

O filo *Firmicutes* esta representado somente na planta de 28F (1,79%) das seqüências obtidas.

O filo *Gemmatimonadetes* e o filo *Nitrospira* não foram encontrados nas seqüências obtidas da filosfera das amostras comparativas.

Algumas classes também diferenciaram entre as espécies vegetais, e foram encontrados na filosfera da *M. uleana* 3,49% das seqüências obtidas da classe *Clostridia*, em *O. dispersa* 0,64% da classe *Gemmatimonadetes* e em *O. teleiandra* 1,27% da classe *Nitrospira*. Entre as plantas comparativas a amostra 28F seqüências da classe *Bacilli* (1,79%) foram encontradas.

A topografia foliar específica para cada espécie vegetal pode influenciar na estrutura das comunidades bacterianas e formação de biofilmes na filosfera, como

presença ou ausência de tricomas, formação de depressões cuticulares ou fendas, padrão de estômatos e contorno da junção das células epidérmicas, específicas para cada espécie coletada (ANDREWS; HERRIS, 2000).

O ângulo foliar característico de cada espécie vegetal amostrada pode contribuir para diferenciação dos grupos taxonômicos de microrganismos residentes, devido à umidade presente sobre a folha, fato que contribui para mudanças químicas da cera na superfície foliar, contribuindo para a fixação e o desenvolvimento da microbiota, principalmente de fungos filamentosos. Posteriormente aumentando a umidade da filosfera e favorecendo a formação do biofilme microbiano (CAPE, 1983; CAPE; PERSY, 1993).

Os nutrientes presentes sobre a superfície das folhas amostradas podem influenciar na instalação e/ou manutenção dessas comunidades bacterianas. Fontes nutricionais contendo carbono são os maiores determinantes para a colonização epifítica, sendo a glicose, frutose e sacarose fontes dominantes de carbono sobre as plantas. Recentes evidências sugerem que sobre as folhas a disponibilidade destes nutrientes seja altamente heterogênea espacialmente na superfície foliar (LINDOW; BRANDL, 2003; MERCIER; LINDOW, 1999), portanto, a fisiologia de cada espécie vegetal pode estar influenciando na diversidade bacteriana. A presença de insetos homópteros e pela atividade de afídeos, pode adicionar ao biofilme, grande quantidade de açúcares (STADLER; MÜLLER, 1996), dependendo do grau de parasitismo entre o inseto e a planta amostrada, influenciando a microbiota foliar, promovendo uma colonização especializada em determinadas espécies coletadas.

Embora a topografia e nutrientes presentes sobre a superfície das folhas sejam reconhecidos como importantes reguladores da comunidade microbiana da filosfera, raras pesquisas tem sido realizadas sobre a dinâmica e regulação destas características.

A presença de agentes considerados biocontroles na filosfera pode ocasionar diferenças na estrutura da comunidade em cada espécie vegetal em estudo, produzindo antibióticos, aumento na atividade glucanalítica e quitinolítica que são conhecidas e contribuem para a vida desses organismos epifíticos na filosfera (COLLINS; JACOBSEN, 2003).

Em relação às quatro amostras de mesma espécie vegetal serviu para verificar o grau de identidade entre as comunidades bacterianas na variação espacial dentro da floresta. O resultado obtido demonstrou que a comunidade bacteriana foi diferente entre elas, mesmo em plantas próximas, ou seja, sub-parcelas vizinhas (amostras 28F e 35F). Este fato sugere algumas hipóteses; a existência de uma variação interespecífica, ou ocasionada pelo ataque de insetos ou microrganismos fitopatogênicos, que estimulam o aumento da atividade da resposta de defesa vegetal, influenciando no perfil da comunidade; outra hipótese é que sejam de subespécies distintas, neste caso podem apresentar compostos químicos diferentes, alterando o perfil da comunidade. Lembrando que esta espécie é pouca estudada, e não tem relatos de identificação adequada a *E melanogyna*.

Insetos característicos fazem à disseminação de patógenos foliares, porém o ato de herbivoria por parte destes insetos pode ser específico, ocasionando dispersão localizada, fato que ajuda a explicar a especificidade entre a comunidade bacteriana e a espécie vegetal (IBEKWE; GRIEVE, 2004).

Outro fato importante, a planta referente à amostra 35F, apresenta idade inferior às outras repetições. Por este fato, a fisiologia desta planta pode ser diferente, se compararmos com as outras, a altura da copa desta planta não ultrapassava 4 metros, enquanto que outras ultrapassavam a altura de 10 metros, e como consequência, a copa desta planta recebe maior influência de plantas vizinhas, menor luminosidade, menor umidade proveniente do orvalho e maior visitação por parte dos insetos e outros pequenos animais.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados de afiliação dos clones do rRNA 16S obtidos da filosfera.

Tabela 4 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

Filio (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	(continua)									
						EC	EM	EM	EM	EM	MS	MU	OD	OT	TS
						02F	28F	28F	32F	35F	41F	09F	24F	78F	43F 57F
Acidobacteria	ND					2,33	0,00	0,61	3,33	0,00	3,48	0,00	0,64	0,00	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	ND				2,33	0,00	0,61	3,33	0,00	3,48	0,00	0,64	0,00	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales				2,33	0,00	0,61	3,33	0,00	3,48	0,00	0,64	0,00	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND			2,33	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND		2,33	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	ND	2,33	0,00	0,00	0,00	2,78	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00
Actinobacteria	ND					4,65	1,79	1,84	1,67	0,00	1,00	0,00	0,64	2,53	1,32
Actinobacteria	Actinobacteria	ND				4,65	1,79	1,84	1,11	0,00	1,00	0,00	0,64	2,53	1,32
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND			4,65	1,79	1,84	1,11	0,00	1,00	0,00	0,64	2,53	1,32
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinobacteriaceae	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	3,48	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinobacteriaceae	Acidobacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,48	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Kineosporiaceae	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Kineosporiaceae	Cryptosporangium	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	ND		4,65	1,79	0,61	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	ND	2,33	1,79	0,61	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	Propionibacterium acnes	0,00	0,89	0,61	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Bacteroidetes	ND					5,81	3,57	9,82	10,00	13,16	8,96	16,28	6,41	1,27	2,63
Bacteroidetes	Flavobacteria	ND				0,00	1,79	1,23	8,89	0,00	8,46	3,49	6,41	0,00	1,32
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	ND			0,00	1,79	1,23	8,89	0,00	8,46	3,49	6,41	0,00	1,32
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ND		0,00	1,79	1,23	8,89	0,00	8,46	3,49	6,41	0,00	1,32
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	ND	0,00	0,89	0,00	8,89	0,00	7,96	3,49	6,41	0,00	0,00
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Candidatus Chryseobacterium massiliiae	0,00	0,89	0,00	7,22	0,00	4,98	0,00	5,13	0,00	0,00
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND				5,81	1,79	7,98	1,11	13,16	0,50	6,98	0,00	1,27	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND			5,81	1,79	6,13	1,11	13,16	0,50	6,98	0,00	1,27	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Crenotrichaceae	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	ND		2,33	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	1,16	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	Hymenobacter	ND	2,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	ND		3,49	1,79	4,29	1,11	10,53	0,50	2,33	0,00	1,27	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	ND	1,16	0,00	1,84	0,00	10,53	0,00	2,33	0,00	1,27	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	ND	0,00	0,00	0,00	1,11	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Cyanobacteria	ND					13,95	0,89	0,00	7,78	0,00	5,97	0,00	3,21	0,00	3,95
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND				13,95	0,89	0,00	7,78	0,00	5,97	0,00	3,21	0,00	3,95

Tabela 4 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

(continuação)

Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC 02F	EM 28F	EM 32F	EM 35F	EM 41F	MS 09F	MU 24F	OD 78F	OT 43F	TS 57F
Firmicutes	ND					0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	3,49	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	Bacilli	ND				0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	ND			0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	ND		0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	ND	0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	Clostridia	ND				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,49	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	ND					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	ND				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Nitrospira	ND					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Nitrospira	Nitrospira	ND				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Proteobacteria	ND					58,14	89,29	86,50	73,89	86,84	77,61	76,74	83,33	91,14	82,89
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND				29,07	22,32	25,77	20,00	10,53	11,44	50,00	15,38	77,22	3,95
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	ND			1,16	0,00	1,84	1,11	0,00	1,49	1,16	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	ND		1,16	0,00	1,84	1,11	0,00	1,49	1,16	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	ND	0,00	0,00	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	rhizosphere soil bacterium BEM-709	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	ND	0,00	0,00	0,00	1,11	0,00	1,49	1,16	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND			13,95	9,82	8,59	4,44	2,63	1,99	6,98	3,21	37,97	1,32
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND		6,98	4,46	1,84	0,00	0,00	0,00	1,16	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa	ND	0,00	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocella	ND	4,65	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND		2,33	0,89	0,00	2,22	0,00	1,00	2,33	1,28	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	ND	2,33	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	2,33	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium sp. Ppar1-21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Rhodopseudomonas	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND		2,33	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	ND	2,33	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	ND		0,00	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00	3,49	0,00	30,38	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	ND	0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	30,38	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	uncultured Methylobacteriaceae bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,59	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium	unidentified bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	ND		0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	ND	0,00	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	ND		0,00	0,00	3,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	ND	0,00	0,00	2,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND			2,33	0,00	0,61	5,56	0,00	0,50	0,00	1,92	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND		2,33	0,00	0,61	5,56	0,00	0,50	0,00	1,92	0,00	0,00

Tabela 4 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

(continuação)															
Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC 02F	EM 28F	EM 32F	EM 35F	EM 41F	MS 09F	MU 24F	OD 78F	OT 43F	TS 57F
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	ND			6,98	11,61	0,00	8,89	7,89	7,46	37,21	9,62	39,24	1,32
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	ND		6,98	11,61	0,00	8,89	7,89	7,46	37,21	9,62	39,24	1,32
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Novosphingobium	ND	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Novosphingobium	uncultured freshwater bacterium	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Spingobium	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Spingomonas	ND	5,81	11,61	7,98	2,78	7,89	1,00	27,91	3,85	36,71	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Spingomonas	alpha proteobacterium BAL95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Spingomonas	Spingomonas sp. MK329	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND				3,49	7,14	8,59	1,11	2,63	4,48	6,98	3,21	8,86	9,21
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND			2,33	2,68	7,36	1,11	2,63	3,48	6,98	3,21	8,86	7,89
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	ND		0,00	0,00	1,23	1,11	0,00	1,99	2,33	0,64	1,27	3,95
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	ND	0,00	0,00	1,23	0,56	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	3,95
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia sp. 13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Wautersia	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	1,27	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	2,53	3,95
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	uncultured proteobacterium clone MT11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Curvibacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	0,00	3,95
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	1,28	5,06	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	3,80	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Roseateles	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Roseateles	uncultured beta proteobacterium	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Thiobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	1,27	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	ND		2,33	2,68	4,29	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Duganella	ND	2,33	1,79	3,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophiles	ND			0,00	3,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	ND		0,00	3,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Hydrogenophilus	ND	0,00	3,57	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	ND			0,00	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	ND		0,00	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Gallionellaceae	Gallionella	ND	0,00	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND				0,00	0,00	5,52	1,11	0,00	0,00	4,65	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	ND			0,00	0,00	5,52	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	ND		0,00	0,00	4,29	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	Cystobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	ND		0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	Chondromyces	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,33	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00

Tabela 4 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na filosfera das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	(conclusão)									
						EC	EM	EM	EM	EM	EM	MS	MU	OD	TS
						02F	28F	32F	35F	41F	09F	24F	78F	43F	57F
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND				23,26	59,82	46,63	50,00	71,05	58,71	15,12	64,74	5,06	69,74
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	ND			10,47	0,00	1,84	8,89	13,16	6,97	4,65	5,77	0,00	27,63
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	ND		10,47	0,00	1,84	8,89	13,16	6,97	4,65	5,77	0,00	27,63
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	ND	0,00	0,00	0,61	0,00	5,26	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Erwinia	ND	1,16	0,00	0,61	3,89	0,00	6,47	0,00	5,77	0,00	14,47
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Erwinia	Pantoea agglomerans	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Erwinia	unidentified bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Escherichia	ND	0,00	0,00	0,00	1,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Escherichia	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Serratia	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	Methylococcaceae	Methylobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	ND			12,79	59,82	44,79	40,56	57,89	50,75	9,30	57,69	2,53	35,53
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	ND		2,33	1,79	0,00	0,56	5,26	1,00	1,16	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	ND	2,33	1,79	0,00	0,56	2,63	1,00	1,16	0,00	2,53	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter junii (T)	0,00	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	Acinetobacter lwoffii	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	ND		10,47	58,04	44,79	40,00	52,63	49,75	8,14	57,69	0,00	35,53
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	ND	10,47	58,25	43,56	39,44	50,00	49,75	8,14	57,69	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	bacterium c22-17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	PAH-contaminated sludge bacterium PB-6	0,00	8,04	2,45	0,56	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	7,89
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens bv. C	0,00	0,00	0,00	6,11	0,00	8,46	0,00	10,26	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas plecoglossicida (T)	0,00	0,00	0,00	1,67	0,00	5,47	0,00	7,05	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas putida	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	6,47	0,00	7,05	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. AEBL3	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	1,16	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. BS	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. LAB-27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. MIS38	0,00	2,68	3,68	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. MSB2097	0,00	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,32
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	uncultured bacterium	0,00	0,00	2,45	3,33	0,00	2,49	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,64	0,00	5,26
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,64	0,00	5,26
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,64	0,00	0,00

Figura 5 - Ocorrência relativa de seqüências de rRNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, dos diferentes filos (A) e classes (B) em filosfera de árvores da Mata Atlântica

Figura 6 - Ocorrência relativa de seqüências de rRNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, dos diferentes filos (A) e classes (B) em filosfera de árvores da Mata Atlântica

2.4.1.5 Abundância relativa de UTOs de *Bacteria* na filosfera

Na Figura 7, os resultados demonstram a abundância relativa de UTOs específicas para cada espécie vegetal do total encontrada na filosfera, sendo *M. uleana* com a maior porcentagem de UTOs (10,1%) entre todas as espécies vegetais amostradas na floresta.

Os resultados mostram que ocorre UTOs específicas para cada espécie vegetal, sem a presença de UTOs comuns entre as plantas, indicando uma possível seleção destes organismos pela espécie vegetal.

As amostras comparativas (repetições) de *E. melanogyna* são apresentadas na Figura 8, é pode ser verificado que a amostra 32 apresentou maior abundância relativa de UTOs (38,6%) em relação às outras amostras.

Nas repetições entre a espécie vegetal *E. melanogyna* ocorreu UTOs específicas a cada planta, no entanto a presença de UTOs comuns entre as repetições (1,9%) indicam que a regulação da seleção de organismos epifíticos na filosfera entre plantas de mesma espécie pode ocorrer, no entanto quando comparadas entre espécies vegetais, não ocorre à presença de UTOs comuns.

Diferenças na comunidade entre plantas de mesma espécie vegetal podem depender do estado fisiológico, idade das folhas e da planta, radiação solar (UV), que pode alterar a comunidade bacteriana na filosfera (JACOBS; SUNDIN, 2001; KADIVAR; STAPLETON, 2003).

Figura 7 - Porcentagem total de UTOs por espécie vegetal obtidos pelo seqüenciamento de bactérias na filosfera das árvores amostradas da mata Atlântica

Figura 8 - Porcentagem total de UTOs das repetições de *E. melanogyna* obtidos pelo seqüenciamento de bactérias na filosfera das árvores da mata Atlântica

2.4.1.6 Diversidade de UTOs de *Bacteria* na filosfera

A riqueza de filotipos de *Bacteria* na filosfera foi estimada pelo método não-paramétrico Chao1 em diversas distâncias evolutivas (Figura 9). Os dados indicam que ao nível de espécie ($d=0,03$) as filosferas apresentaram riqueza entre 23 e 171, sendo que a filosfera de *O. teleiandra* apresentou menor riqueza (23 e 34) e diferiu das demais amostras com exceção da filosfera de *T. serratifolia*. Em relação ao nível de gênero ($d=0,05$) as amostras apresentam riqueza entre 20 e 210, sendo que a filosfera de *O. teleiandra* apresentou menor riqueza (20 e 30) e diferiu das demais amostras com exceção da filosfera de *T. serratifolia*. Em relação ao filo ($d=0,20$) as amostras apresentam riqueza entre 10 e 63, sendo que a filosfera de *O. teleiandra* apresentou menor riqueza (10 e 17) e as amostras não diferiram entre si.

O número de filotipos estimados nas amostras comparativas de *E. melanogyna* são mostrados na Figura 10. Os dados indicam que ao nível de espécie ($d=0,03$) as amostras apresentaram riqueza entre 42 e 240, sendo que a filosfera da amostra 32F apresentou maior riqueza (110 e 240) e diferiu da amostra 35F. Em relação ao nível de gênero ($d=0,05$) as amostras apresentam riqueza entre 27 e 157, sendo que a filosfera das amostras não diferiram. Em relação ao filo ($d=0,20$) as amostras apresentam riqueza entre 7 e 58.

Na tabela 5 são apresentados o número de seqüências, as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura da filosfera de cada espécie vegetal. Neste trabalho, foi considerada a distância evolutiva 0,03 para definição de UTOs.

As estimativas de riqueza de UTOs, utilizando métodos não-paramétricos ACE e Chao1, demonstraram que não ocorreu diferença significativa entre as encontradas em *T. serratifolia* com as demais espécies vegetais espécies. O mesmo fato ocorreu entre *M. schottiana* e *uleana*. No entanto, ocorreu diferença significativa entre espécies do gênero eugenia e entre espécies do gênero *Ocotea*. A estimativa de ACE demonstra que *O. dispersa* não diferiu estatisticamente de *E. melanogyna*, sendo que para Chao1 *O. dispersa* não diferiu estatisticamente espécies do gênero eugenia, considerando o intervalo com 95% de confiança.

Os índices de diversidade são demonstrados na tabela 5, sendo os resultados semelhantes para Shannon e recíproco de Simpson, e são observados que não diferem estatisticamente entre espécies vegetais do gênero *Ocotea* e entre espécie de *T. serratifolia*. Os índices de diversidade demonstram que não ocorreu diferença significativa entre a espécie vegetal *T. serratifolia* e *E. melanogyna*, *M. schottiana* e espécies vegetais do gênero *Ocotea*. As espécies vegetais do gênero *Eugenia* e *Mollinedia* diferiram entre si.

A análise das seqüências de clones de rRNA 16s de *Bacteria* das diferentes espécies vegetais, através do índice de Shannon, mostrou que a comunidade bacteriana é bastante diversa com filotipos específicos para cada espécie vegetal, levando em consideração um intervalo de 95% de confiança. Considerando-se a distância evolutiva (D), o número estimado de espécies bacterianas em filosfera é apresentado na tabela 5, sendo a estimativa de cobertura alta em todas as amostras.

Nas amostras comparativas de *E. melanogyna*, as estimativas de riqueza não diferiram estatisticamente entre elas.

Os índices de diversidade de Shannon, referente às amostras comparativas, somente a amostra 28 não diferiu estatisticamente da amostra 41. Quanto ao índice recíproco de Simpson, não diferiram a amostra 28 das amostras 32, 35 e 41 e entre a amostra 35 e 41, considerando o intervalo com 95% de confiança.

Estes resultados evidenciam que amostras de mesmas espécies vegetais ocorrem variação na comunidade bacteriana.

A tabela 6 mostra as comparações múltiplas entre as bibliotecas de filosfera usando o S-Libshuff. *E. cuprea*, *O. teleiandra*, *M. uleana* e *T. serratifolia* diferiram estatisticamente. *M. schottiana* também diferiu de *E. melanogyna* ($P \leq 0,05$). As demais espécies não discutidas, não diferiram entre as amostras.

Estes resultados indicam que a diversidade genética determinada pelo S-Libshuff esta relacionada com a espécie vegetal.

A tabela 7 mostra as comparações múltiplas entre as bibliotecas de amostras comparativas de filosfera usando o S-Libshuff. Estatisticamente todas as amostras foram diferentes.

Alguns autores (ANDREWS, 1992; KINKEL et al., 1995; HIRANO; UPPER, 2000; MERCIER; LINDOW, 2000) demonstraram em seus trabalhos que a variação e a densidade de microrganismos na folha podem variar dependendo da espécie vegetal, fisiologia, idade da folha e da planta, variações das propriedades morfológicas e físico-químicas na superfície da folha, o que pode explicar os resultados encontrados.

Figura 9 - Riqueza de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em filosfera de árvores da Mata Atlântica, utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade)

Figura 10 - Riqueza de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em filosfera de árvores da Mata Atlântica, utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade)

Tabela 5 - Índices de diversidade e estimativas de nº de UTOs de amostras de filosfera de espécies vegetais da Mata Atlântica

Amostra	Espécie vegetal	Nº de seq	Nº de UTOs	Estimativa de riqueza		Índice de diversidade		Est. de cobertura
				ACE		Shannon		
D 0,01%							Simpson 1/D	
02	Eugenia cuprea	85	45	51,0(47,1; 61,8)	46,6(45,3; 53,3)	3,752(3,682; 3,821)	75,930(63,775; 93,896)	0,882
35	Eugenia melanogyna	180	50	91,4(68,6; 142,3)	74,0(58,9; 114,7)	3,259(3,091; 3,428)	16,592(11,909; 27,3373)	0,867
78	Ocotea dispersa	156	35	123,9(69,7; 262,8)	107(57,3; 267,6)	2,328(2,083; 2,573)	4,739(3,112; 9,929)	0,846
43	Ocotea teleiandra	79	29	35,8(31,3; 48,8)	32,6(29,8; 44,5)	2,923(2,697; 3,149)	13,111(9,194; 22,841)	0,873
09	Mollinedia schottiana	201	44	90,5(62,6; 160,1)	85,1(58,4; 161,8)	2,905(2,728; 3,081)	10,697(7,238; 20,487)	0,881
24	Mollinedia uleana	86	52	86,4(66,9; 131,5)	75,4(61,5; 109,6)	3,804(3,684; 3,925)	66,445(47,551; 110,375)	0,663
57	Tabebuia serratifolia	71	71	77,7(50,9; 150,0)	92,6(53,8; 211,1)	3,087(2,838; 3,337)	15,246(10,211; 30,075)	0,662
	comparativos							
28	Eugenia melanogyna	112	51	120,5(81,4; 210,0)	133,6(82,5; 267,2)	3,282(3,031; 3,533)	11,8624(6,7549; 48,6381)	0,696
32	Eugenia melanogyna	163	100	574,0(356,0; 978,0)	398,2(245,4; 711,5)	4,200(4,037; 4,363)	45,8505(27,517; 137,174)	0,503
41	Eugenia melanogyna	38	31	198,5(85,0; 550,3)	152,5(66,3; 449,8)	3,316(3,138; 3,494)	54,083(25,503; 590,523)	0,289
	total	1171						

Amostra	Espécie vegetal	Nº de seq	Nº de UTOs	Estimativa de riqueza		Índice de diversidade		Est. de cobertura
				ACE		Shannon		
D 0,03%							Simpson 1/D	
02	Eugenia cuprea	85	41	45,3(42,3; 54,6)	42,1(41,2; 48,0)	3,605(3,499; 3,712)	50,276(36,469; 80,906)	0,906
35	Eugenia melanogyna	180	43	82,5(59,7; 136,7)	58,4(48,3; 85,5)	2,904(2,712; 3,096)	10,068(6,684; 20,395)	0,889
78	Ocotea dispersa	156	32	138,1(71,2; 319,0)	92,5(50,4; 231,4)	2,228(1,992; 2,465)	4,619(2,947; 10,678)	0,859
43	Ocotea teleiandra	79	23	27,3(24,2; 38,1)	25,4(23,5; 36,1)	2,553(2,303; 2,803)	8,304(6,634; 11,097)	0,911
09	Mollinedia schottiana	201	39	90,5(62,6; 160,1)	83,1(52,9; 178,6)	2,631(2,435; 2,827)	6,995(4,578; 14,819)	0,896
24	Mollinedia uleana	86	41	61,0(48,7; 93,0)	50,0(43,9; 69,4)	3,448(3,336; 3,639)	34,806(24,372; 60,864)	0,802
57	Tabebuia serratifolia	71	26	44,8(32,0; 84,9)	48,5(32,4; 105,3)	2,643(2,370; 2,915)	8,938(6,615; 13,779)	0,789
	comparativos							
28	Eugenia melanogyna	112	38	80,8(55,1; 144,8)	78,3(51,4; 159,6)	2,917(2,672; 3,162)	9,236(5,706; 24,224)	0,804
32	Eugenia melanogyna	163	74	204,6(140,3; 331,2)	159,8(113,9; 258,3)	3,707(3,513; 3,900)	20,990(12,283; 72,098)	0,669
41	Eugenia melanogyna	38	27	164,4(74,4; 226,4)	87,5(45,4; 226,4)	3,054(2,793; 3,314)	21,968(10,785; 59,523)	0,421
	total	1171						

02 - *Eugenia cuprea*; 09 - *Mollinedia schottiana*; 24 - *Mollinedia uleana*; 35, 28, 32 e 41 - *Eugenia melanogyna*; 43 - *Ocotea teleiandra*; 57 - *Tabebuia serratifolia*; 78 - *Ocotea dispersa*. Nº de UTOs determinado pelo DOTUR. Estimador de máxima semelhança. Reciproco de Simpson 1/D (estimador de máxima semelhança) Estimativa de cobertura. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade).

Tabela 6 - Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* em filosfera usando o S-Libshuff

X	Y						
	E. <i>cuprea</i>	M. <i>schottiana</i>	M. <i>uleana</i>	E. <i>melanogyna</i>	O. <i>teleiandra</i>	T. <i>serratifolia</i>	O. <i>dispersa</i>
<i>E. cuprea</i>	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M. schottiana</i>	0,0000	-----	0,0000	0,6597	0,0000	0,0000	0,1925
<i>M. uleana</i>	0,0000	0,0000	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>E. melanogyna</i>	0,0000	0,0008	0,0000	-----	0,0000	0,0000	0,0087
<i>O. teleiandra</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-----	0,0000	0,0000
<i>T. serratifolia</i>	0,0239	0,0219	0,0000	0,0971	0,0000	-----	0,0000
<i>O. dispersa</i>	0,0000	0,2411	0,0015	0,4550	0,0000	0,0000	-----

02 - *Eugenia cuprea*; 09 - *Mollinedia schottiana*; 24 - *Mollinedia uleana*; 35 - *Eugenia melanogyna*; 43 - *Ocotea teleiandra*; 57 - *Tabebuia serratifolia*; 78 - *Ocotea dispersa*. X homólogo na coluna e Y homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0002 e 0,0012 para 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente.

Tabela 7 - Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* em filosfera de *Eugenia melanogyna* usando o S-Libshuff

X	Y			
	28	32	35	41
28	-----	0,0000	0,0000	0,0015
32	0,0001	-----	0,0000	0,0016
35	0,0000	0,0000	-----	0,0000
41	0,8625	0,9994	0,8489	-----

28; 32; 35; 41 representam o nº da amostra coletada das folhas. X homólogo na coluna e Y homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0008 e 0,0043 para 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente.

2.4.1.7 Morfotipos presentes na filosfera

Foi observado um denso biofilme microbiano sobre as folhas, sendo composto por microrganismos diversos, que podem ser bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, Conforme Ruinen (1956), o biofilme é formado por uma matriz de exopolissacarídeos, e esta camada pode ser estimado em até 22µm de espessura sobre as folhas de plantas dos trópicos e na Indonésia,

Na maioria dos casos o biofilme é uma camada limosa, e a microbiota na face externa vive em condições aeróbicas, sendo que os da face interna vivem em condições anaeróbicas,

Na imagem 11A e B foi observado o biofilme sobre a folha, onde microrganismos distintos se desenvolvem,

Na imagem 11C observa-se na superfície foliar, a degradação da cera por uma espécie fúngica,

Na epiderme abaxial da folhas coletadas, foi observado uma colonização menor (imagem 11D), provavelmente pela baixa incidência solar e menor acúmulo de água. Neste ambiente, observa-se uma colonização principalmente sobre as nervuras e próxima aos estômatos, dados que corroboram com os trabalhos de Andrews & Harris, Na imagem 11E foi observado um esporo colonizado por bactérias, Na imagem 11F é possível observar um teliósporo e sua ornamentação (espinhos cônicos, grossos e longos) (HANLIN, 1989),

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície de folhas de diferentes espécies vegetais amostradas

2.4.2 Casca

2.4.2.1 Estrutura da comunidade bacteriana detectada pela DGGE

A estrutura das comunidades com base nos perfis de amplicons detectados pela DGGE do rRNA 16S de *Bacteria* em casca é demonstrada na Figura 12, foi possível observar variações no comportamento da estrutura das comunidades de bactérias, demonstrando a complexidade das amostras.

As diferenças demonstradas pela DGGE entre as repetições das amostras podem ser atribuídas a fatores ambientais, como exemplos, plantas vizinhas e presença de algumas clareiras abertas naturalmente, fatos que pode ocasionar uma diferença na intensidade luminosa, a alteração da umidade e temperatura sendo possível modificar a estrutura das comunidades bacterianas, como foi observado na filosfera (LINDOW; BRANDL, 2003; JACQUES; KINKEL; MORRIS, 1995; ANDREWS; KENERLEY; NORDHEIM, 1980).

Outros fatores também podem influenciar neste resultado, os patógenos também podem proporcionar influência na colonização microbiana.

Para verificar se a estrutura das comunidades de bactérias da casca de plantas de mesma espécie geograficamente mais próximas entre si apresentam maior similaridade do que com plantas geograficamente mais distantes, foi feita uma análise discriminante em função do quadrante onde a planta amostrada se localiza (Tabela 8). Os resultados indicaram que a localização das plantas dentro da área de coleta não influenciou a estrutura das comunidades de bactérias da casca.

Figura 12 - DGGE de amplicons do rRNA 16S de *Bacteria*, com base nos perfis de amplicons detectados em casca das árvores amostradas, onde Q1, Q2, Q3 e Q4 indicam os quadrantes onde as plantas se encontram na floresta

Tabela 8 – Análise discriminante de comunidades bacterianas associadas com os quadrantes onde as plantas se encontram na floresta

Quadrantes	1	2	3	4
1	14	0	0	0
2	0	22	0	0
3	1	1	25	1
4	0	0	0	16
Total de N	15	23	25	17
N correct	14	22	25	16

2.4.2.2 Agrupamento hierárquico dos amplicons

No entanto, através do agrupamento hierárquico ilustrado na figura 13, com base no perfil dos amplicons ocorreu agrupamento das espécies vegetais, obtendo maior similaridade entre espécies do gênero *eugenia*, ocorrendo o mesmo para o gênero *Ocotea* das amostras coletadas. Plantas do gênero *Mollinedia* demonstraram uma proximidade com os amplicons obtidos de *Ocotea*. Plantas do gênero *tabebuia* formaram um agrupamento separado das demais espécies. Esses resultados indicam que a variação das comunidades de procariotos em casca são maiores que nas amostras da filosfera.

Os resultados mostram que a comunidade de procariotos epifíticos residentes na casca, sofre alterações dependendo da espécie vegetal, indicando que provavelmente exista uma relação entre determinados grupos de procariotos e a espécie vegetal, podendo ser exudados provenientes da folha, que escorre durante a chuva ou compostos presente no tecido vegetal que possam selecionar esses grupos.

O resultado demonstra uma tendência do comportamento destes filotipos em casca, serem próximos aos encontrados na filosfera, pois recebem influências ambientais de forma parecidas.

Figura 13 - Agrupamento hierárquico das espécies vegetais, com base nos perfis de amplicons detectados em casca

2.4.2.3 Análise de componentes principais com base nos amplicons

Pela PCA dos amplicons obtidos pela DGGE com base na espécie vegetal, ocorreu agrupamento das repetições de mesma espécie ao nível de ordem (Figura 14), no entanto algumas repetições de mesma espécie vegetal ficaram próximas, devido à similaridade de algumas repetições de espécies vegetais diferentes, confirmando o resultado obtido pelo agrupamento da DGGE e pelo agrupamento hierárquico.

Os resultados indicam uma possível pressão de seleção dos microrganismos epifíticos para as espécies vegetais amostradas, que podem ser influenciados por compostos presente na superfície da casca ou escorridos da folha pela chuva.

Estes resultados confirmam a hipótese que a espécie vegetal foi mais importante para seleção de organismos residentes na casca em espécies vegetais dentro da floresta e os resultados relacionados à distribuição espacial das plantas de mesma espécie vegetal não foram relevantes para alterar a comunidade bacteriana.

Figura 14 - Análise de componentes principais (PCA) obtidos pela DGGE com base nos amplicons de casca. Os dados são referentes à dispersão das espécies vegetais nos quadrantes dentro da área de coleta. OD - ○; OT - □; MS - ◇; MU - □; EC - ●; EM - ■; TS - ◆

2.4.2.4 Afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S de casca

Os resultados filogenéticos classificados pelo RDPquery, indicaram bactérias de 07 filos e 09 classes (figura 15), sendo que a ocorrência variou dependendo da espécie vegetal. Em anexo (tabela 9), encontra-se a tabela de frequência (%) dos diferentes táxons encontrados na casca.

Bactérias do filo Proteobacteria, foram as mais abundantes na casca das espécies vegetais coletadas e representando aproximadamente de 60 a 90% do total das seqüências analisadas.

Deste filo, apenas ocorreram de três classes: *Alphaproteobacterias* (7,7%), *Betaproteobacteria* (3,9%) e *Gammaproteobacteria* (65,4%).

O filo *Bacteroidetes* foi o segundo mais abundante me cascas de espécies vegetais da mata atlântica, sendo representado aproximadamente de 14%. Foram encontradas duas das três grandes classes, as *Flavobacterias* (12%) e *Sphingobacterias* (2,4%).

O filo *Cyanobacteria* foi encontrado em menor abundância na casca, aproximadamente 2,7%, se compararmos com a filosfera.

O filo *Acidobacteria* foi encontrado com aproximadamente 0,6% em cascas somente em duas espécies vegetais *O. teleiandra* e *T. serratifolia*.

Bactérias do filo *Actinobacterias* foram encontradas aproximadamente 0,5% somente no gênero *Mollinedia*.

O filo *Gemmatimonadetes* foi encontrado aproximadamente 0,8%, somente no gênero eugenia.

Os resultados demonstram a presença de procariotos específicos a cada espécie vegetal e filos comuns entre as amostras, sendo possível observar uma relação dos filotipos encontrados na filosfera e casca. Este fato evidencia que o filoplano de mesma espécie vegetal é comum, independentemente casca ou filosfera.

Tabela 9 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na casca das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

(continua)

Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC						
						02C	EM	MS	UM	OD	OT	TS
Acidobacteria	ND					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	3,37
Acidobacteria	Acidobacteria	ND				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	3,37
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	3,37
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	3,37
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	3,37
Actinobacteria	ND					0,00	0,00	1,05	2,76	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	ND				0,00	0,00	1,05	2,76	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND			0,00	0,00	1,05	2,07	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae			0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium	Propionibacterium acnes	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Pseudonocardiaceae			0,00	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Pseudonocardiaceae	Crossiella	ND	0,00	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	0,00
Bacteroidetes	ND					24,72	17,50	16,84	2,76	4,97	29,21	5,62
Bacteroidetes	Flavobacteria	ND				19,10	15,00	15,79	2,76	4,97	22,47	4,49
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	ND			19,10	15,00	15,79	2,76	4,97	22,47	4,49
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae			19,10	15,00	15,79	2,76	4,97	22,47	4,49
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	ND	19,10	15,00	15,79	2,76	4,97	22,47	4,49
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	Candidatus Chryseobacterium massiliae	11,24	5,00	7,37	1,38	2,21	13,48	4,49
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND				5,62	2,50	1,05	0,00	0,00	6,74	1,12
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND			5,62	2,50	1,05	0,00	0,00	6,74	1,12
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Crenotrichaceae	ND		1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Crenotrichaceae	Chitinophaga	ND	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	ND		3,37	2,50	1,05	0,00	0,00	6,74	1,12
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	ND	1,12	2,50	1,05	0,00	0,00	4,49	1,12
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	uncultured Sphingobacterium sp.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	0,00
Cyanobacteria	ND					0,00	2,50	1,05	8,28	1,66	4,49	1,12
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND				0,00	2,50	1,05	8,28	1,66	4,49	1,12
Gemmatimonadetes	ND					1,12	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	ND				1,12	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	ND			1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	ND		1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	ND	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Genera_incertae_sedis_TM7	ND					2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 9 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na casca das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	(continuação)									
						EC	EM	MS	UM	OD	OT	TS			
						02C	35C	09C	24C	78C	43C	57C			
Proteobacteria	ND					68,54	70,00	80,00	80,00	92,82	64,04	89,89			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND				11,24	0,00	8,42	18,62	4,42	4,49	6,74			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria		ND			1,12	0,00	3,16	0,69	1,10	0,00	2,25			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales				1,12	0,00	3,16	0,69	1,10	0,00	2,25			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales		ND		1,12	0,00	3,16	0,69	1,10	0,00	2,25			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	Caulobacter	ND	1,12	0,00	3,16	0,69	1,10	0,00	2,25			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Caulobacteraceae	Caulobacter	Caulobacter sp.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	1,12			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiacae	ND		4,49	0,00	1,05	13,10	0,00	0,00	1,12			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiacae	Methylocella	ND	0,00	0,00	0,00	2,76	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiacae	Methylocella	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiacae	ND		3,37	0,00	0,00	5,52	0,00	0,00	1,12			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	ND	3,37	0,00	0,00	4,83	0,00	0,00	1,12			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium sp. 10MP10	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium sp. Ppar1-21	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	1,12			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	uncultured eubacterium WD275	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	uncultured proteobacterium	0,00	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hypomicrobiaceae	ND		0,00	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hypomicrobiaceae	Hypomicrobium	ND	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hypomicrobiaceae	Rhodoplanes	ND	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	ND		1,12	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylosinus	ND	1,12	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylocystis	ND	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND			1,12	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND		1,12	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Acidisphaera	ND	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	ND			2,25	0,00	4,21	2,76	3,31	4,49	3,37			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	ND		2,25	0,00	4,21	2,76	3,31	4,49	3,37			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Sphingomonas	ND	1,12	0,00	1,05	2,07	0,00	1,12	0,00			
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Spingomonadales	Spingomonadaceae	Sphingomonas	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	5,52	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND				4,49	5,00	6,32	5,52	1,66	1,12	3,37			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND			2,25	5,00	6,32	5,52	1,66	1,12	3,37			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	ND		0,00	2,50	1,05	0,69	0,55	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	ND	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	ND		1,12	2,50	2,11	2,07	1,10	1,12	2,25			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Aquabacterium	ND	1,12	2,50	0,00	2,07	0,55	1,12	2,25			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Aquabacterium	uncultured Aquabacterium sp.	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Aquabacterium	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42	0,00	3,37			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Leptothrix	ND	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Roseateles	ND	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00			
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	ND		0,00	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	0,00			

Tabela 9 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados na casca das árvores de espécies vegetais da Mata Atlântica

(conclusão)														
Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC 02C	EM 35C	MS 09C	UM 24C	OD 78C	OT 43C	TS 57C		
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Duganella	ND	0,00	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND				52,81	65,00	64,21	53,10	86,74	57,30	78,65		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	ND			0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	ND		0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	ND			7,87	0,00	2,11	8,97	41,99	2,25	3,37		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND		7,87	0,00	2,11	8,97	41,99	2,25	3,37		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	ND	0,00	0,00	1,05	3,45	8,29	2,25	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia	uncultured Escherichia sp.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	ND	0,00	0,00	1,05	0,00	0,55	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Kluyvera	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Raoultella	ND	1,12	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Rahnella sp. IEGN17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	ND			43,82	65,00	60,00	40,69	44,20	55,06	75,28		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	ND		1,12	0,00	0,00	1,38	0,55	1,12	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	ND	1,12	0,00	0,00	1,38	0,55	1,12	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	5,52	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	ND		42,70	65,00	60,00	39,31	43,65	53,93	74,16		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	ND	42,70	65,00	60,00	39,31	43,09	51,69	74,16		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	bacterium c22-17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	obligately oligotrophic bacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	POCPN-71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	PAH-contaminated sludge bacterium PB-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens bv. C	8,99	15,00	12,63	2,07	6,08	11,24	14,61		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas plecoglossicida (T)	1,12	7,50	6,32	2,07	1,10	4,49	5,62		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas putida	3,37	5,00	8,42	2,76	3,87	5,62	10,11		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas putida (T)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. AEBL3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. D8	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. LAB-27	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	2,25		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. MIS38	0,00	0,00	0,00	3,45	2,21	0,00	2,25		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. PGNR1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas tolaasii (T)	1,12	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	rape rhizosphere bacterium m9055	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	uncultured bacterium	1,12	0,00	1,05	5,52	4,42	1,12	3,37		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	ND			1,12	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND		1,12	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Fulvimonas	ND	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Fulvimonas	ND	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Figura 15 - Ocorrência relativa de seqüências de rRNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, dos diferentes filos (A) e classes (B) em cascas de árvores da Mata Atlântica

2.4.2.5 Abundância relativa de UTOs de *Bacteria* na casca

Na figura 16, é observada a abundância de UTOs específicas para cada espécie vegetal do total encontrada na casca, onde a espécie *M. uleana* apresentou maior porcentagem de UTOs (27%) entre todas as espécies vegetais, e é possível verificar UTOs comuns a todas as repetições (2,7%).

Os resultados mostraram que ocorrem grupos de procariotos específicos a espécie vegetal, no entanto é possível observar UTOs comuns (2,7%) entre as diferentes espécies vegetais.

Figura 16 - Porcentagem total de UTOs por espécie vegetal obtidos pelo seqüenciamento de bactérias em casca das árvores amostradas da mata Atlântica

2.4.2.6 Diversidade de UTOs de *Bacteria* na casca

Na figura 18, é demonstrado o número de filotipos estimados de *Bacteria* em casca em diversas distâncias evolutivas calculadas pelo estimador não-paramétrico Chao1. Os dados indicam que ao nível de espécie ($d=0,03$) as amostras apresentaram riqueza entre 25 e 344, exceto *E. melanogyna* que apresentou riqueza entre 9 e 25, as demais amostras não diferiram estatisticamente. Em nível de gênero ($d=0,05$) as amostras apresentam riqueza entre 19 e 197 e não diferem estatisticamente, exceto *E. melanogyna* que apresentou riqueza entre 9 e 25. Em relação ao filo ($d=0,20$) as amostras apresentam riqueza entre 7 e 79.

Na tabela 10 são apresentados o número de seqüências, as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura das amostras de casca das espécies vegetais.

O número de UTOs da espécie vegetal *E. melanogyna* foi menor em relação às outras espécies vegetais, porém a estimativa de cobertura foi elevada (90%).

As estimativas de riqueza de UTOs, utilizando métodos não-paramétricos ACE e Chao1, demonstraram que para ACE, as UTOs da ordem *Laurales* não diferiram estatisticamente. As UTOs das espécies vegetais do gênero *eugenia* foram diferentes estatisticamente e a espécie vegetal *T. serratifolia* diferiu apenas de *E. melanogyna*. As estimativas calculadas pelo algoritmo de Chao1 demonstraram que as UTOs da ordem *Laurales* não diferiram estatisticamente, no entanto as do gênero *Eugenia* foram diferentes. A espécie vegetal *T. serratifolia* não diferiu quando comparada com as outras espécies vegetais, considerando o intervalo com 95% de confiança.

Pelos resultados, observa-se que a estimativa de riqueza foi maior para a espécie *E. cuprea*, no entanto, a abundância de UTOs entre as espécies amostradas, foi maior para a *M. uleana* (27%).

Os índices de diversidade para Shannon e recíproco de Simpson são apresentados na tabela 10. Os resultados obtidos pelo o índice de Shannon mostram que não ocorreu diferença significativa entre espécies vegetais de mesmo gênero. Com a espécie vegetal *T. serratifolia* as amostras de *E. cuprea*, *O. teleiandra* e *M. schottiana* não diferiram, no entanto para as outras amostras foram significativamente diferente.

O índice de diversidade calculado pelo recíproco de Simpson demonstrou que as UTOs das espécies vegetais do gênero *eugenia* não diferiram. O mesmo ocorreu para o gênero *Ocotea*. Para a espécie vegetal *T. serratifolia* diferiu apenas de *M. uleana*, considerando o intervalo com 95% de confiança.

A tabela 11 mostra as comparações múltiplas entre as bibliotecas de casca usando o S-Libshuff. *E. cuprea* foi estatisticamente diferente de *M. uleana* ($P \leq 0,01$) e *O. dispersa* ($P \leq 0,05$). *M. schottiana* também diferiu de *M. uleana* e *O. dispersa* ($P \leq 0,01$). As comunidades de *Bacteria* presente na amostra de *M. schottiana* diferiram de *E. melanogyna* e do gênero *Ocotea* ($P \leq 0,01$). Diferiram também as comunidades de *E. melanogyna* e *O. teleiandra* de *O. dispersa*. *T. serratifolia* estatisticamente não diferiu das outras espécies vegetais.

Pode ser observado na tabela 10 que, as amostras 02C e 24C, apresentam estimativa de riqueza (196,2 e 117,6 respectivamente) superior as demais espécies vegetais, levando em consideração o intervalo de 95% de confiança, no entanto pelas comparações múltiplas entre bibliotecas destas amostras, foram estatisticamente diferentes.

Figura 18 - Riqueza de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em cascas de árvores da Mata Atlântica, utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade)

Tabela 10 - Índices de diversidade e estimativas de nº de UTOs de amostras de casca de espécies vegetais da Mata Atlântica

Amostra	Espécie vegetal	Nº de seq	Nº de UTOs	Estimativa de riqueza		Índice de diversidade		Est. de cobertura
D 0,01%				ACE	Chao1	Shannon	Simpson 1/D	
02	<i>Eugenia cuprea</i>	89	39	196,2(90,4; 519,8)	209,7(89,9; 611,5)	2,894(2,616; 3,172)	10,11(7,42; 18,86)	0,640
35	<i>Eugenia melanogyna</i>	40	10	14,7(10,8; 35,9)	14,0(10,6; 38,7)	1,935(1,703; 2,167)	6,44(4,33; 12,55)	0,900
78	<i>Ocotea dispersa</i>	181	45	98,1(67,5; 170,3)	123,1(69,4; 295,2)	3,154(2,996; 3,311)	16,38(11,75; 27,04)	0,862
43	<i>Ocotea teleiandra</i>	89	29	82,8(46,1; 198,0)	84,1(45,5; 212,8)	2,501(2,230; 2,772)	7,47(5,34; 12,42)	0,764
09	<i>Mollinedia schottiana</i>	95	23	66,0(35,8; 167,3)	135,5(42,0; 688,3)	2,260(2,009; 2,512)	5,98(3,86; 13,21)	0,842
24	<i>Mollinedia uleana</i>	145	66	153,0(109,3; 240,7)	146,0(99,8; 255,1)	3,796(3,641; 3,951)	35,38(24,27; 65,27)	0,724
57	<i>Tabebuia serratifolia</i>	89	26	80,1(43,8; 190,4)	80,0(40,4; 228,2)	2,264(1,964; 2,564)	4,90(3,23; 10,18)	0,798
	total	728						

Amostra	Espécie vegetal	Nº de seq	Nº de UTOs	Estimativa de riqueza		Índice de diversidade		Est. de cobertura
D 0,03%				ACE	Chao1	Shannon	Simpson 1/D	
02	<i>Eugenia cuprea</i>	89	33	196,2(90,4; 519,8)	189,7(71,5; 667,0)	2,727(2,461; 2,992)	9,192(6,612; 15,078)	0,719
35	<i>Eugenia melanogyna</i>	40	09	16,5(9,2; 25,0)	13,0(9,6; 37,7)	1,676(1,397; 1,955)	4,410(2,715; 11,683)	0,900
78	<i>Ocotea dispersa</i>	181	27	57,1(36,8; 119,5)	48,1(32,5; 108,3)	2,542(2,394; 3,196)	9,639(6,645; 17,537)	0,928
43	<i>Ocotea teleiandra</i>	89	20	40,3(25,5; 94,9)	56,0(27,7; 188,7)	2,140(1,894; 2,387)	5,827(3,838; 12,094)	0,865
09	<i>Mollinedia schottiana</i>	95	19	38,1(24,1; 91,0)	49,3(25,3; 164,1)	1,998(1,743; 2,254)	4,556(2,864; 11,128)	0,884
24	<i>Mollinedia uleana</i>	145	52	117,6(82,5; 192,7)	127,0(79,0; 260,7)	3,437(3,268; 3,606)	22,505(16,077; 37,467)	0,793
57	<i>Tabebuia serratifolia</i>	89	21	45,8(28,5; 103,0)	39,0(25,5; 92,4)	2,060(1,772; 2,347)	4,261(2,775; 9,175)	0,865
	total	728						

02 - *Eugenia cuprea*; 09 - *Mollinedia schottiana*; 24 - *Mollinedia uleana*; 35 - *Eugenia melanogyna*; 43 - *Ocotea teleiandra*; 57 - *Tabebuia serratifolia*; 78 - *Ocotea dispersa*. Nº de UTOs determinado pelo DOTUR. Estimador de máxima semelhança. Reciproco de Simpson 1/D (estimador de máxima semelhança) Estimativa de cobertura. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança (com 95% de probabilidade).

Tabela 11 - Valores de *p* calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* em casca usando o S-Libshuff

X	Y						
	<i>E. cuprea</i>	<i>M. schottiana</i>	<i>M. uleana</i>	<i>E. melanogyna</i>	<i>O. teleiandra</i>	<i>T. serratifolia</i>	<i>O. dispersa</i>
<i>E. cuprea</i>	-----	0,0633	0,6872	0,0095	0,0195	0,2903	0,0133
<i>M. schottiana</i>	0,6425	-----	0,8239	0,1174	0,0483	0,6153	0,5498
<i>M. uleana</i>	0,0000	0,0000	-----	0,0000	0,0000	0,0030	0,0000
<i>E. melanogyna</i>	0,8826	0,4619	0,9999	-----	0,9387	0,7439	0,4744
<i>O. teleiandra</i>	0,6256	0,2544	0,8263	0,3140	-----	0,9448	0,0529
<i>T. serratifolia</i>	0,5313	0,5812	0,8197	0,2305	0,9414	-----	0,8467
<i>O. dispersa</i>	0,0009	0,0000	0,0170	0,0000	0,0000	0,0018	-----

02 - *Eugenia cuprea*; 09 - *Mollinedia schottiana*; 24 - *Mollinedia uleana*; 35 - *Eugenia melanogyna*; 43 - *Ocotea teleiandra*; 57 - *Tabebuia serratifolia*; 78 - *Ocotea dispersa*, X homólogo na coluna e Y homólogo na linha, Valores mínimos para diferença significativa: 0,0002 e 0,0012 para 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente

2.4.3 Solo

2.4.3.1 Estruturas das comunidades bacterianas analisadas por DGGE

As estruturas das comunidades bacterianas com base nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S detectados após DGGE nos solos sob a copa das árvores das espécies vegetais são mostradas na Figura 19. Para a análise dos géis foi utilizado o programa Diversity Database, sendo possível determinar a riqueza dos amplicons com base no total de bandas detectáveis, em função da espécie vegetal e distribuição espacial das amostras das plantas.

As diferenças da diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas entre as repetições podem ser influenciadas por vários fatores, como liberação de compostos químicos, quantidade e qualidade da matéria orgânica presente, saturação com água e granulometria (AGNELLI et al., 2004; SESSITSCH et al., 2001), espécies vegetais, condições nutricionais da planta, idade do vegetal, estresse e fitopatógenos (YANG; CROWLEY, 2000). As raízes influenciam diretamente a microbiota, e ocorrem diversas interações entre microrganismos e entre microrganismos e plantas (LYNCH, 1982).

Para verificar se a estrutura das comunidades de bactérias nos solos sob a copa das árvores das espécies vegetais geograficamente mais próximas entre si apresentam

maior similaridade do que plantas geograficamente mais distantes foi feita uma análise discriminante em função do quadrante onde a planta amostrada se localiza (Tabela 12). Os resultados indicaram que a localização das plantas dentro da área de coleta influenciou a estrutura das comunidades de bactérias do solo sob a projeção da copa de espécies vegetais, provavelmente pelo fato da complexidade do solo e pelo aporte nutricional, no entanto, alguns pesquisadores evidenciaram que podem ocorrer grupos específicos de bactérias dependentes dos exsudados vegetais (YANG; CROWLEY, 2000). Outros fatores podem ter contribuído para este resultado, como exemplo a presença de raízes de outras plantas vizinhas, observando que a amostragem foi feita em uma área de floresta, ou por limitações da técnica da DGGE.

Figura 19 - DGGE de amplicons do rRNA 16S de *Bacteria*, com base nos perfis de amplicons detectados em solo sob a copa das árvores amostradas, onde Q1, Q2, Q3 e Q4 indicam os quadrantes onde as plantas se encontram na floresta

Tabela 12 – Análise discriminante de comunidades bacterianas associadas com os quadrantes onde as plantas se encontram na floresta.

Quadrantes	1	2	3	4
1	15	0	0	0
2	0	23	0	0
3	0	0	25	0
4	0	0	0	17
Total de N	15	23	25	17
N correct	15	23	25	17

2.4.3.2 Agrupamento hierárquico dos amplicons

Através da análise do agrupamento hierárquico (Figura 20), é possível estabelecer uma relação entre a estrutura das comunidades bacterianas e a filogenia das espécies vegetais, sendo a comunidade bacteriana de solo de plantas da mesma ordem (*Mollinedia* e *Ocotea*) mais similares entre si que às comunidades de plantas de ordens diferentes,

Adicionalmente, com base na análise de agrupamento hierárquico, a comunidade bacteriana das maioria das espécies de plantas de mesmo gênero apresenta maior similaridade entre si que plantas de gêneros distintos,

Com esses resultados, há um entendimento que pode haver um padrão de seleção entre a espécie vegetal e a comunidade bacteriana dominante presente no solo.

Figura 20 - Agrupamento hierárquico das espécies vegetais, com base nos perfis de amplicons detectados em solo sob a copa das árvores amostradas

2.4.3.3 Análise de componentes principais com base nos amplicons

O resultado demonstra um comportamento dos filotipos encontrados nas amostras de solo, próximo aos encontrados na filosfera e casca, pois o solo não pode ser considerado um ambiente isolado, recebe influências ambientais da água, ar, plantas e animais (DROZDOWICZ, 1997). Um fato importante que difere o ambiente solo da filosfera e casca é o aporte nutricional, que se encontra na solução do solo e que pode influenciar na colonização dos microssítios (ROESCH et al., 2007).

Para confirmar os resultados obtidos por agrupamento hierárquico dos amplicons de rRNA 16S de *Bacteria* a partir da DGGE, foi feita uma análise de componentes principais (PCA), os resultados indicaram que em solo sob a copa de plantas de mesma espécie vegetal, as comunidades bacterianas foram mais similares entre si do que de espécies vegetais diferentes.

Pela PCA dos amplicons obtidos pela DGGE com base na espécie vegetal, ocorreu agrupamento das repetições de mesma espécie ao nível de ordem (Figura 21), no entanto algumas repetições de mesma espécie vegetal ficaram próximas, devido à similaridade entre algumas repetições de espécies vegetais diferentes, confirmando o resultado obtido pela DGGE e pelo agrupamento hierárquico.

Os resultados indicam que exsudados liberado pelas raízes de determinadas espécies vegetais podem influenciar na seleção dos microrganismos, ou que podem ser influenciados por compostos presente na superfície aérea escorridos pela chuva.

Estes resultados indicam que a espécie vegetal pode influenciar na seleção de organismos residentes no solo sob a projeção da copa das árvores e os resultados indicam que a distribuição espacial das plantas de mesma espécie vegetal não foram relevantes para alterar a comunidade bacteriana.

Figura 21 - Análise de componentes principais (PCA) pela DGGE com base nos amplicons de solo, Os dados são referentes à dispersão das espécies vegetais nos quadrantes dentro da área de coleta, OD - ○; OT - □; MS - ◇; MU - □; EC - ●; EM - ■; TS - ◆

2.4.3.4 Afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S de solo sob a copa das árvores

A afiliação filogenética com base na sequência de nucleotídeos pelos clones do gene rRNA 16S de solo sob a copa das árvores foi feita utilizando o programa RDPquery. Os resultados indicaram a presença de 09 filos e 12 classes nos solos sob a copa das sete espécies vegetais avaliadas (Figura 22). São apresentados os resultados da afiliação filogenética dos clones do gene rRNA 16S obtidos no solo sob a projeção da copa das árvores.

Bactérias do filo *Proteobacteria*, foram as mais abundantes nas amostras de solo sob a copa das espécies vegetais coletadas e representam aproximadamente 48 a 64% do total das seqüências analisadas.

Deste filo, apenas ocorreram de quatro classes, onde estão presente em todas as amostras: *Alphaproteobacteria* que representam entre 32 e 46,01%, *Betaproteobacteria* entre 1,13 e 3,37% e *Gammaproteobacteria* 3,65 e 8,61%, e *Deltaproteobacteria* 1,82 e 5,09% do total das seqüências específicas para cada amostra coletada sob a copa das espécies vegetais.

Da classe *Alphaproteobacteria* o representante da ordem *Rhizobiales* (28,9%) foi mais expressivo entre as amostras e possuem um papel importante no desenvolvimento das plantas, entre outros a produção do ácido 3-indol-acético (AIA) e fixação de nitrogênio (VESSEY; FEY, 2003; BRANDL; QUINONES; LINDOW, 2001).

O filo *Acidobacteria* foi o segundo mais abundante nas amostras de solo sob a projeção da copa de todas as espécies vegetais, com aproximadamente 14 e 36,13%. Este filo foi demonstrado por Hiraishi et. al., (1995b) que se desenvolve principalmente em ambientes ácidos. Este filo foi encontrado nos três ambientes amostrado (filosfera, casca e solo). A média do pH (3,9) obtido do solo das amostras (dados não mostrados), proporcionou o desenvolvimento deste filo, o que confirma um local considerado ideal para sua sobrevivência, no entanto o pH na filosfera e casca não foram medidos.

O filo *Bacteroidetes* foi encontrado aproximadamente 1,09 e 4,36%, porém não foi encontrado nas amostras de solo sob a copa de *M. schottiana*. Foram encontradas duas das três grandes classes, as *Flavobacteria* que representam 0,37 e 0,73% sob a

copa das espécies vegetais *O. dispersa* e *teleiandra*, *M. uleana*, *E. melanogyna* e *T. serratifolia* e *Sphingobacteria* 0,73 e 2,18% sob a copa das espécies vegetais *O. dispersa* e *teleiandra*, *M. uleana*, *E. cuprea* e *T. serratifolia*, do total das seqüências específicas para amostras de solo sob a projeção de cada espécie vegetal.

Bactérias do filo *Actinobacterias* foram encontradas entre 0,36 e 1,83% em todas as amostras e do filo *Gemmatimonadetes* aproximadamente 0,36 e 1,52% do total das seqüências específicas para amostras de solo sob a projeção de cada espécie vegetal, no entanto não foram encontradas seqüências de clones deste filo em amostras de solo sob a copa das espécies vegetais do gênero *Mollinedia*.

O filo *Nitrospira* foi encontrado no solo sob a projeção da copa apenas nas amostras de *O. dispersa* (0,73%) e *E. melanogyna* (0,36%), do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal, sendo observado nos três ambiente, filosfera, casca e solo.

O filo *Firmicutes* foi encontrado no solo sob a copa das plantas de *O. teleiandra* (0,75%), *M. uleana* (0,37%), *E. melanogyna* (0,36%) e *T. serratifolia* (0,36%) do total das seqüências específicas para cada espécie vegetal,. Estes dados confirmam os resultados de Hiraishi et al., (1995b), que encontraram em seu trabalho uma baixa diversidade, e foi encontrado apenas um representante da classe as bactérias denominadas de *Clostridia*, que são fixadores de nitrogênio e estão presente apenas sob a copa das árvores das espécies *O. teleiandra* (0,38%) e *M. uleana* (0,37%).

O solo é complexo e influencia o crescimento, a multiplicação, a sobrevivência e outras atividades dos organismos sobreviventes do solo (RANGASWAMI; OBLISAMI, 1967). As comunidades microbianas em solos podem variar em relação ao tipo de solo, espécies vegetais, condições nutricionais da planta, idade do vegetal, estresse e presença de fitopatógenos (YANG; CROWLEY, 2000). As raízes influenciam diretamente a microbiota (LYNCH, 1982), fatores como quantidade e qualidade da matéria orgânica do solo, saturação hídrica, granulometria, características químicas e vegetação podem controlar a atividade, diversidade e estrutura das comunidades microbianas (De LEIJ; WHIPPS; LYNCH, 1994).

Os resultados demonstram uma maior uniformidade de bactérias entre as espécies vegetais se comparado com filosfera e casca. Este fato evidencia que o solo

recebe influencias ambientais diferentes dos outros ambientes estudados, como alteração brusca de temperatura, ressecamento e umidade. No entanto, como observado pela PCA, foi possível agrupar com base nos amplicons da DGGE, repetições das amostras de mesma ordem, porém com proximidade entre amostras de ordens diferentes.

Na Tabela 13 são apresentados os resultados de afiliação dos clones do rRNA 16S obtidos do solo sob a projeção da copa das árvores.

Tabela 13 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em solo sob a copa de espécies vegetais da Mata Atlântica.

Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	(continua)						
						EC	EM	MS	MU	OD	OT	TS
						02S	35S	09S	24S	78S	43S	57S
Acidobacteria	ND					17,77	27,90	36,13	14,98	17,95	24,44	23,64
Acidobacteria	Acidobacteria	ND				16,75	27,90	36,13	13,86	17,95	24,06	22,18
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND			15,74	27,17	34,31	13,86	16,48	24,06	20,36
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND		15,23	27,17	33,21	13,86	15,75	24,06	18,91
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	ND	7,61	23,91	29,56	11,99	14,65	23,31	17,09
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	uncultured Acidobacteria bacterium	0,51	1,81	2,55	0,37	0,37	2,26	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	uncultured Acidobacteriaceae bacterium	0,00	0,00	0,00	0,37	0,73	0,00	0,00
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	uncultured bacterium	0,00	2,54	5,11	0,75	1,83	6,02	0,73
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	uncultured soil bacterium	0,00	2,17	0,00	0,00	0,73	1,88	0,00
Actinobacteria	ND					0,00	1,09	0,36	0,75	1,83	0,00	1,09
Actinobacteria	Actinobacteria	ND				0,00	1,09	0,36	0,75	1,83	0,38	1,09
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND			0,00	0,36	0,36	0,37	1,10	0,00	0,73
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	Solirubrobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
Bacteroidetes	ND					2,03	1,09	0,00	4,12	1,83	2,26	4,36
Bacteroidetes	Flavobacteria	ND				0,00	1,09	0,00	0,37	0,73	0,38	0,73
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	ND			0,00	1,09	0,00	0,37	0,73	0,38	0,36
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	ND		0,00	1,09	0,00	0,37	0,37	0,38	0,36
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	ND	0,00	1,09	0,00	0,37	0,37	0,38	0,36
Bacteroidetes	Sphingobacteria	ND				1,52	0,00	0,00	1,87	0,73	1,88	2,18
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND			1,52	0,00	0,00	1,50	0,73	1,88	1,82
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Grenotrichaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,36
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	Flexibacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	ND		1,02	0,00	0,00	0,75	0,00	1,88	0,73
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter	ND	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	0,73
Chloroflexi	ND					0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Chloroflexi	Anaerolineae	ND				0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Anaerolinea	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Firmicutes	ND					0,00	0,36	0,00	0,37	0,00	0,75	0,36
Firmicutes	Clostridia	ND				0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,38	0,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	ND			0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00

Tabela 13 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em solo sob a copa de espécies vegetais da Mata Atlântica.

(continuação)												
Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC	EM	MS	MU	OD	OT	TS
						02S	35S	09S	24S	78S	43S	57S
Gemmatimonaderes	ND					1,52	0,36	0,00	0,00	0,37	0,38	0,36
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	ND				1,52	0,36	0,00	0,00	0,37	0,38	0,36
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	ND			1,52	0,36	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	ND		1,52	0,36	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	ND	1,52	0,36	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00
Genera_incertae_sedis_ TM7	ND					0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,38	0,73
Nitrospira	ND					0,00	0,36	0,00	0,00	0,73	0,00	0,00
Nitrospira	Nitrospira	ND				0,00	0,36	0,00	0,00	0,73	0,00	0,00
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	ND			0,00	0,36	0,00	0,00	0,73	0,00	0,00
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	ND		0,00	0,36	0,00	0,00	0,73	0,00	0,00
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	ND	0,00	0,36	0,00	0,00	0,73	0,00	0,00
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	uncultured bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	1,83	0,00	0,00
Proteobacteria	ND					58,38	59,06	48,18	64,79	58,91	51,50	49,09
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND				42,64	46,01	37,59	46,82	41,76	39,10	32,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	ND			0,00	0,00	0,36	1,50	0,00	0,75	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	ND		0,00	0,00	0,36	1,50	0,00	0,75	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	ND	0,00	0,00	0,36	0,75	0,00	0,00	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenyllobacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND			31,98	33,70	26,28	31,46	27,11	30,83	20,73
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND		2,54	1,09	1,09	1,12	0,73	0,38	0,73
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa	ND	0,51	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocella	ND	0,00	0,36	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND		6,60	3,26	2,19	4,12	4,76	3,76	6,91
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	ND	3,55	1,45	0,73	1,12	2,93	1,88	2,91
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobiaceae bacterium Ellin7182	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium genosp. B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium japonicum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium sp.	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium sp. 10MP10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	uncultured alpha proteobacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	uncultured bacterium	0,00	2,54	5,11	0,00	0,00	6,02	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	uncultured eubacterium WD275	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	uncultured soil bacterium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND		8,12	12,32	10,58	9,74	6,23	14,29	4,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	ND	0,51	0,00	0,00	0,75	0,37	0,38	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Pedomicrobium	ND	0,51	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	ND	6,60	9,42	8,76	6,74	4,40	10,53	2,55
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	uncultured alpha proteobacterium		0,51	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 13 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em solo sob a copa de espécies vegetais da Mata Atlântica.

(continuação)

Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC 02S	EM 35S	MS 09S	MU 24S	OD 78S	OT 43S	TS 57S
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	uncultured bacterium	2,54	2,54	5,11	0,75	1,83	6,02	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	uncultured forest soil bacterium	0,51	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	uncultured soil bacterium	0,51	2,17	0,73	0,00	0,73	1,88	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Microvirga	ND	0,51	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,38	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacter	ND	0,51	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Phyllobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	ND	ND	0,00	0,00	1,46	1,12	0,37	0,00	0,36
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	ND	ND	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	ND	5,08	5,80	5,47	5,62	4,76	3,76	2,18
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Acidiphila	ND	3,05	2,90	4,38	2,25	2,20	2,26	1,45
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Acidiphila	ND	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Stella	ND	1,52	1,09	0,00	0,37	0,73	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	ND	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,37	0,73	0,00	1,45
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	ND	ND	0,00	0,00	0,00	0,37	0,73	0,00	1,45
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	ND	3,05	2,17	2,19	3,37	2,93	1,13	2,55
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND	ND	2,54	0,00	1,82	2,25	2,20	1,13	1,82
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	ND	ND	0,51	0,00	0,73	0,37	0,37	0,75	1,09
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	ND	0,51	0,00	0,73	0,37	0,37	0,00	1,09
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	ND	ND	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Burkholderia	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	ND	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	ND	ND	0,00	0,00	0,36	0,75	0,37	0,00	0,36
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Aquabacterium	ND	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Ideonella	ND	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	Roseateles	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	ND	ND	0,00	0,00	0,36	0,37	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Collimonas	ND	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	ND	0,00	0,00	0,36	0,00	0,37	0,00	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	ND	3,55	2,90	1,82	2,25	2,93	3,76	5,09
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	ND	ND	ND	2,03	2,17	1,46	1,50	1,47	1,88	3,64
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	ND	ND	1,02	0,36	0,73	1,12	0,73	0,75	0,36
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	Anaeromyxobacter	ND	0,00	0,00	0,00	0,75	0,37	0,38	0,00
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	ND	ND	0,51	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09

Tabela 13 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em solo sob a copa de espécies vegetais da Mata Atlântica.

(conclusão)																			
Filo (>0.8)	Classe (>0.85)	Ordem (>0.91)	Família (>0.92)	Gênero (>0.95)	Espécies (>=1.0)	EC		EM		MS		MU		OD		OT		TS	
						025	355	095	245	785	435	575							
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	Haliangium	ND	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73							
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	ND		0,00	1,09	0,73	0,00	0,37	0,00	1,09							
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	Chondromyces	ND	0,00	0,72	0,73	0,00	0,00	0,00	1,09							
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangiaceae	Haliangium	ND	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND				7,11	3,99	3,65	8,61	5,13	5,26	0,73							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	ND			0,00	0,00	1,09	0,00	0,37	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND		0,00	0,00	1,09	0,00	0,37	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Erwinia	ND	0,00	0,00	1,09	0,00	0,37	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	ND			0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,38	0,73							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,73							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	ND			0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	ND			0,51	0,00	0,00	0,00	2,20	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	ND ND		0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Alkanindiges	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	ND		0,51	0,00	0,00	2,62	1,83	0,75	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	ND	0,51	0,00	0,00	2,62	1,47	0,75	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas montellii	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas sp. M1538	0,51	0,00	0,00	0,37	0,37	0,75	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	ND			1,52	0,00	0,00	1,12	0,00	0,00	1,45							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND		1,52	0,00	0,00	1,12	0,00	0,75	1,45							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Fulvimonas	ND	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	ND	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00							

EC – E. cuprea; EM – E. melanogyna; MS – M. schottiana; MU – M. uleana; OD – O. dispersa; OT – O. teleiandra; TS – T. serratifolia. Letras após

EC – *E. cuprea*; EM – *E. melanogyna*; MS – *M. schottiana*; MU – *M. uleana*; OD – *O. dispersa*; OT – *O. teleiandra*; TS – *T. serratifolia*. Letras após o número da amostra F: filosfera; C: casca; S: solo.

Figura 22 - Ocorrência relativa de seqüências de rRNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, dos diferentes filos (A) e classes (B) em solo de árvores da Mata Atlântica

2.4.3.5 Abundância relativa de UTOs de *Bacteria* no solo

Na figura 23, foi demonstrada a abundância de UTOs específicas no solo sob a projeção da copa relacionada a cada espécie vegetal do total encontrada, onde a espécie *O. dispersa* apresentou maior porcentagem de UTOs (14,5%) entre todas as espécies vegetais.

Os resultados mostram grupos de procariotos específicos relacionado à espécie vegetal, no entanto é possível observar UTOs comuns (0,9%) entre as diferentes espécies vegetais. A presença de UTOs específicas pode estar relacionada a exsudados peculiares a espécie vegetal, influenciando na comunidade bacteriana destes microssítios, lembrando que a coleta foi realizada próxima a base de cada árvore (BASHAN; LEVANONY, 1990).

Marschner et al., (2002) e Baudoin et al., (2003) também apresentaram a hipótese de compostos no exsudado de plantas que podem modificar a comunidade bacteriana no solo.

Figura 23 - Porcentagem total de UTOs por espécie vegetal obtidos pelo seqüenciamento de bactérias em solo sob a copa das árvores amostradas da mata Atlântica

2.4.3.6 Diversidade de filotipos bacterianos no solo

A riqueza de filotipos de *Bacteria* em solo sob a projeção da copa das árvores foi estimada pelo método não-paramétrico Chao1 em diversas distâncias evolutivas (Figura 24). Esses resultados demonstram que a riqueza de filotipos neste ambiente foi maior em relação ao ambiente filosfera e casca, provavelmente pelo aporte nutricional e influências ambientais específicas, como menor estresse hídrico e outras já comentadas. Os resultados indicam que ao nível de espécie ($d=0,03$), as amostras apresentaram riqueza entre 225 e 1579, sendo que a amostra de solo sob a copa de *M. schottiana* apresentou uma menor riqueza (225 e 381) entre as amostras. Em relação ao nível de gênero ($d=0,05$) as amostras apresentam riqueza entre 187 e 906, sendo que a amostra de *M. schottiana* apresenta uma menor riqueza (187 e 350) entre as amostras. Em relação ao filo ($d=0,20$) as amostras apresentam riqueza entre 31 e 141, sendo mais homogênea a riqueza entre as amostras.

Na tabela 14 são apresentados o número de seqüências, as estimativas de riqueza de UTOs, os índices de diversidade e a estimativa de cobertura das amostras de solo sob a copa das árvores de cada espécie vegetal, considerando as distâncias evolutivas de 0,01 e 0,03 para a definição das UTOs. O número de UTOs do solo foi maior em relação aos outros ambientes, provavelmente devido ao aporte nutricional que o solo oferece.

As estimativas de riqueza de UTOs, utilizando métodos não-paramétricos ACE e Chao1, demonstram que UTOs encontradas nas amostras de solo sob a copa das plantas do gênero *Eugenia* não diferiram entre elas. O mesmo ocorreu com o gênero *Ocotea*. Com o gênero *Mollinedia*, o resultado demonstrou que houve diferença significativa. As UTOs presente em *T. serratifolia* não diferiram apenas das UTOs da espécie *M. uleana*.

Os índices de diversidade para Shannon e recíproco de Simpson são apresentados na tabela 14. Os resultados obtidos pelo o índice de Shannon mostram que ocorreu diferença significativa entre espécies de mesmo gênero da ordem *Laurales*, fato não ocorrido com espécies do gênero *Eugenia*. Com a espécie vegetal *T.*

serratifolia as amostras de *E. cuprea* e *melanogyna*, *O. teleiandra* e *M. schottiana* diferiram estatisticamente, no entanto para as outras amostras não diferiram.

O índice de diversidade calculado pelo recíproco de Simpson demonstrou que as UTOs referentes às espécies vegetais do gênero *Eugenia* e *Mollinedia* não diferiram. O que não ocorreu para o gênero *Ocotea*. Para a espécie vegetal *T. serratifolia* diferiu de *E. melanogyna*, *O. teleiandra* e *M. schottiana*, considerando o intervalo de confiança (95% de probabilidade).

A diversidade bacteriana em amostras de florestas são maiores quando comparadas em solos agrícolas, provavelmente por variações físico-químicas dos solos, tal como, matéria orgânica, temperatura e nutrientes, que afetam os microhabitats. Em solos de florestas o número de filos também são maiores quando comparados com três solos agrícolas de regiões diferentes (ROESCH et al., 2007).

A tabela 15 mostra as comparações múltiplas entre as bibliotecas usando o S-Libshuff. *E. cuprea* foi estatisticamente diferente de *E. melanogyna*, *M. schottiana* e *T. serratifolia*. *E. melanogyna* diferiu do gênero *Mollinedia*, de *T. serratifolia* e de *Ocotea teleiandra*. As comunidades de *Bacteria* presente na amostra de *M. schottiana* também diferiram de *M. uleana* e *T. serratifolia* ($P \leq 0,01$) e do gênero *Ocotea* ($P \leq 0,05$). Diferiram também as comunidades de *O. dispersa* de *T. serratifolia* ($P \leq 0,01$) e de *O. teleiandra* ($P \leq 0,05$). As amostras de *O. teleiandra* diferiram de *T. serratifolia* ($P \leq 0,05$). *T. serratifolia* foi estatisticamente diferente de todas as outras espécies vegetais.

Conforme Grundmann (2004), a estrutura espacial da comunidade bacteriana do solo, pode ter um papel funcional no estabelecimento e manutenção da diversidade, sendo então, a organização espacial evidentemente determina a troca de genes (transferência horizontal). Desta forma, a relação entre a estrutura da comunidade bacteriana e a organização espacial dentro da estrutura solo pode estar intimamente ligada, mantendo grupos específicos próximos a uma determinada espécie vegetal.

Grayston et al. (1998), realizaram um levantamento da diversidade microbiana do solo de quatro plantas cultivadas em dois tipos de solos diferentes, e verificaram que a variabilidade dos microrganismos foi influenciada pela planta, devido ao fato destas produzirem exsudados com características particulares a sua espécies. Este resultado

confirma a hipótese da existência de interferência por parte da espécie vegetal a comunidade bacteriana residente próxima a uma determinada planta.

Marschner et al. (2001), examinaram a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera, e conforme a espécies vegetais, o tipo do solo e da localização da zona da raiz, e verificaram pela PCR-DGGE do rRNA 16S que houve variação da diversidade, concluíram que o fato da composição da comunidade bacteriana da rizosfera é afetada por esta interação complexa. Com base neste modelo os resultados encontrados no solo sob a projeção da copa de determinadas árvores, pode ser levada em consideração.

Conhecer os fatores que influenciam a composição da população bacteriana é importante para o desenvolvimento de métodos racionais para diagnosticar problemas, melhorar a produtividade e desenvolver estratégias de biorremediação (SILVA; NAHAS, 2002).

A estrutura das comunidades de bactérias do solo em regiões tropicais tem sido pouca estudada e não varia de regiões temperadas, no entanto, a natureza da população microbiana pode ser influenciada por fatores ambientais (SILVA; NAHAS, 2002).

Figura 24 - Riqueza de filotipos de *Bacteria* em solo sob a projeção de árvores da Mata Atlântica estimada para diferentes distâncias evolutivas, utilizando-se o estimador não-paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade)

Tabela 14 - Índices de diversidade e estimativas de nº de UTOs de amostras de solo sob a copa de espécies vegetais da Mata Atlântica.

Amostra	Espécie vegetal	Nº de seq	Nº de UTOs	Estimativa de riqueza		Índice de diversidade		Est, de cobertura
D 0,01%				ACE	Chao1	Shannon	Simpson 1/D	
02	<i>Eugenia cuprea</i>	192	170	1648,2(961,4;2931,0)	1710,6(908,5; 3383,8)	5,066(5,004;5,127)	510,204(311,54;1388,88)	0,182
35	<i>Eugenia melanogyna</i>	276	179	754,9(535,1;1110,3)	669,0(462,9; 1024,7)	4,912(4,811;5,012)	130,37(87,48;255,75)	0,493
78	<i>Ocotea dispersa</i>	273	237	1375,6(933,4;2098,5)	1239,3(848,8; 1879,1)	5,404(5,355;5,452)	740,74(505,05;1388,88)	0,231
43	<i>Ocotea teleiandra</i>	265	186	671,7(488,3;966,2)	819,4(549,4; 1289,8)	4,965(4,859;5,071)	121,95(68,21;571,42)	0,430
09	<i>Mollinedia schottiana</i>	273	183	569,6(421,9;808,5)	500,4(376,8;703,0)	4,958(4,857;5,029)	125,00(66,44;1052,63)	0,495
24	<i>Mollinedia uleana</i>	267	237	2213,0(1302,7;3900,8)	1806,6(1131,7;2990,8)	5,401(5,347;5,453)	694,44(393,70;2941,17)	0,187
57	<i>Tabebuia serratifolia</i>	275	235	1045,8(749,4;1512,9)	1027,5(729,8;1504,1)	5,397(5,351;5,453)	751,87(555,55;1162,79)	0,262
	total		1828					

Amostra	Espécie vegetal	Nº de seq	Nº de UTOs	Estimativa de riqueza		Índice de diversidade		Est, de cobertura
D 0,03%				ACE	Chao1	Shannon	Simpson 1/D	
02	<i>Eugenia cuprea</i>	192	145	980,0(610,0;1644,4)	685,3(435,2; 1151,0)	4,786(4,682;4,889)	150,375(91,407;421,940)	0,359
35	<i>Eugenia melanogyna</i>	276	146	510,9(340,0;736,5)	527,6(350,5; 858,3)	4,590(4,476;4,705)	79,239(58,445;123,001)	0,612
78	<i>Ocotea dispersa</i>	273	204	1004,6(699,7;1497,1)	876,0(603,5; 1334,3)	5,153(5,075;5,231)	254,452(174,825;467,289)	0,385
43	<i>Ocotea teleiandra</i>	265	142	491,2(352,9;720,1)	460,1(315,5; 725,3)	4,516(4,387;4,646)	60,532(39,745;126,903)	0,608
09	<i>Mollinedia schottiana</i>	273	146	325,0(251,1;451,0)	288,5(228,3;392,9)	4,601(4,480;4,723)	67,024(41,493;174,216)	0,656
24	<i>Mollinedia uleana</i>	267	201	1142,4(762,6;1778,9)	1061,0(694,9;1698,6)	5,100(5,008;5,192)	183,150(103,842;775,193)	0,360
57	<i>Tabebuia serratifolia</i>	275	205	886,2(637,3;1278,6)	811,3(570,3;1211,2)	5,170(5,096;5,243)	280,898(204,498;448,430)	0,393
	total		1828					

02 - *Eugenia cuprea*; 09 - *Mollinedia schottiana*; 24 - *Mollinedia uleana*; 35 - *Eugenia melanogyna*; 43 - *Ocotea teleiandra*; 57 - *Tabebuia serratifolia*; 78 - *Ocotea dispersa*, Nº de UTOs determinado pelo DOTUR, Estimador de máxima semelhança, Reciproco de Simpson 1/D (estimador de máxima semelhança) Estimativa de cobertura, Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança (com 95% de probabilidade).

Tabela 15 - Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* em solo sob a copa das espécies vegetais usando o S-Libshuff

X	Y						
	<i>E. cuprea</i>	<i>E. melanogyna</i>	<i>M. schottiana</i>	<i>M. uleana</i>	<i>O. dispersa</i>	<i>O. teleiandra</i>	<i>T. serratifolia</i>
<i>E. cuprea</i>	-----	0,9095	0,9324	0,9900	0,8673	0,6852	0,8148
<i>E. melanogyna</i>	0,0000	-----	0,0000	0,0001	0,0023	0,0001	0,0000
<i>M. schottiana</i>	0,0000	0,0000	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>M. uleana</i>	0,2059	0,3798	0,0129	-----	0,9644	0,1444	0,0496
<i>O. dispersa</i>	0,0092	0,1349	0,0004	0,7718	-----	0,0000	0,0939
<i>O. teleiandra</i>	0,0053	0,0209	0,0004	0,0022	0,0003	-----	0,0050
<i>T. serratifolia</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0011	-----

02 - *Eugenia cuprea*; 35 - *Eugenia melanogyna*; 09 - *Mollinedia schottiana*; 24 - *Mollinedia uleana*; 78 - *Ocotea dispersa*; 43 - *Ocotea teleiandra*; 57 - *Tabebuia serratifolia*, X homólogo na coluna e Y homólogo na linha, Valores mínimos para diferença significativa: 0,0002 e 0,0012 para 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente.

Alguns trabalhos demonstraram que a temperatura média no solo pode alterar a diversidade bacteriana (NEUFELD; MOHN, 2005), no entanto, outros trabalhos não suportam esta tendência (FIERER; JACKSON, 2006).

Em florestas não perturbadas, ocorre uma alta diversidade da fauna e flora, e essa diversidade afeta a diversidade microbiana, embora recentes trabalhos sugiram que o inverso pode ser verdadeiro (FIERER; JACKSON, 2006).

É reconhecido que floresta tropical apresente maior biodiversidade da flora e fauna que floresta subtropical, e a riqueza florística têm demonstrado uma correlação positiva com a diversidade bacteriana em solo. Essa especulação é baseada na interação planta microrganismo. Diferenças na comunidade bacteriana em solos sob espécies de árvores têm sido descritas (PRIHA et al., 2001; GRAYSTON; PRESCOTT, 2005), mas poucos estudos têm examinado a correlação entre a diversidade de plantas e a estrutura da comunidade de bactérias no solo (STEPHAN et al., 2000; BRODIE et al., 2002).

2.5 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE OS AMBIENTES

2.5.1 Análise de correspondência canônica entre os ambientes

Nas figuras 25 e 26 são apresentados os resultados da análise de correspondência canônica (CCA) baseada nas UTOs obtidas pelo seqüenciamento de rRNA 16s encontradas na filosfera, casca e no solo sob a copa de árvores da mata Atlântica.

Os resultados indicam a presença de UTOs específicas para cada ambiente estudado, e que são distintos quando comparadas as estruturas do solo em relação às da filosfera e da casca.

Com base nos dados apresentados, pode-se confirmar que cada ambiente (filosfera, casca e solo) apresentam a estrutura da comunidade específica, sendo que filosfera e casca demonstram uma proximidade maior, provavelmente por estarem em condições ambientais parecidas.

Figura 25 - Análise de correspondência canônica (CCA) baseada nas UTOs obtidos pelo seqüenciamento de bactérias encontradas na filosfera de árvores da mata Atlântica, As amostras estão separadas pelo ambiente estudado, Solo +, filosfera +, casca X

Figura 26 - Análise de correspondência canônica (CCA) baseada nas UTOs obtidos pelo seqüenciamento de bactérias encontradas na filosfera de árvores da mata Atlântica. As amostras foram subdivididas: em parte aérea (filosfera e casca) e solo, Parte aérea + e Solo ♦

2.5.2 Diagrama de Venn baseado nas UTOs de *Bacteria*

A abundância relativa de UTOs nos três ambientes estudados é mostrada na Figura 27 pelo o diagrama de Venn.

É possível observar UTOs comuns entre os ambientes, sendo maior entre filosfera e casca evidenciando uma aproximação maior da diversidade entre esses ambientes. A filosfera e casca recebem influência ambiental diferente ao ambiente solo, promovendo provavelmente características semelhantes influenciando a comunidade.

Verifica-se a presença de UTOs comuns aos três ambientes, que foram classificados pelo RDPquery do filo *Acidobacteria*, *Proteobacteria* e *Gemmatimonadetes*.

Figura 27 - Diagrama de Venn baseada no total de UTOs obtidos pelo seqüenciamento de bactérias encontradas nos ambientes da mata Atlântica

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados em filosfera demonstraram pela DGGE, a variação dos amplicons entre repetições de espécies vegetais distribuídas na floresta, onde ocorreu uma relação entre as bactérias epifíticas em função da espécie vegetal, sendo indiferente a posição da planta na floresta, sendo confirmado pelas análises de PCA.

Esses resultados foram encontrados por alguns autores, no entanto as plantas utilizadas nos experimentos eram cultiváveis e se desenvolveram em casa-de-vegetação, mas com resultados semelhantes (KINKEL; WILSON; LINDOW, 1996; LINDOW; ARNY; UPPER, 1978; O'BRIEN; LINDOW, 1989).

Pelos resultados foram identificadas 44 gêneros na filosfera de espécies nativas de florestas, enquanto que em filosfera de trigo, cana-de-açúcar, oliveira e centeio 37 gêneros foram identificados (HIRANO; HUPPER, 2002; YANG et al., 2001),

evidenciando uma maior diversidade de bactérias epifíticas na filosfera de espécies arbóreas em ambiente clímax.

Nas cascas os resultados mostraram que a espécie vegetal também influenciou na comunidade epifítica, indicando uma diversidade diferente em relação à filosfera, porém algumas UTOs foram comuns aos dois ambientes.

Os trabalhos são escassos na área de diversidade microbiana em casca, os poucos trabalhos existente, estão relacionados principalmente a patógenos ou plantas de uso medicinal, portanto este trabalho é inovador, onde demonstra a relação entre bactérias específicas a espécie vegetal.

Algumas características morfológicas da planta podem ter influenciado na comunidade bacteriana na filosfera e casca, como presença de compostos fenólicos morfologia, radiação solar (UV) que estimulando o desenvolvimento de bactérias produtoras de matriz extracelular e ocupação de microssítios protegidos da radiação ultravioleta (GUNASEKERA; PAUL, 2007).

No solo sob a projeção da copa das árvores amostradas, os resultados demonstraram variação na comunidade bacteriana e podem estar relacionados à espécie vegetal, ocasionado pela presença de exsudados, que pode influenciar na comunidade. A estimativa de riqueza e índice de diversidade foram maiores se comparado a filosfera e casca, provavelmente promovido pelo aporte nutricional.

A diversidade microbiana no solo é enorme, inclui 23 filos do domínio *Bacteria* e aproximadamente 6250 espécies (WARD, 2003; GARRITY, et al., 2005), sendo que estimativas de apenas 10% podem ser isolados pelos métodos convencionais, ou seja são cultiváveis (BORNEMAN et al., 1996; KUSKE et al., 1997).

Correa et al., (2007), descrevem em seus resultados que, quando comparado metabolicamente a comunidade bacteriana em filosfera e rizoplano, os resultados indicaram a existência de uma comunidade metabolicamente diferente, porém geneticamente similar.

Alterações no exsudado entre variedades de tomate demonstraram que bactérias não foram detectadas pela DGGE, mas podem proliferar e dominar o microssítio e raízes de tomate inoculada com *Azospirillum* pode influenciar na diversidade e estrutura

de grupos de bactérias associadas às raízes alterando a qualidade dos exsudados (BASHAN; LEVANONY, 1990).

O entendimento do mecanismo que controla a estrutura destas comunidades em filosfera, casca e solo sob a influência da espécie vegetal, bem como espacialmente isolado, tem uma importante implicação na preservação da biodiversidade, manutenção da comunidade microbiana, biocontrole de doenças de folhas, cascas e raízes e promover a saúde da planta e a fertilidade do solo.

3 CONCLUSÕES

A estrutura da comunidade de *Bacteria* apresentou variações nos ambientes estudados, sendo similares entre filosfera e casca e diferente quando comparado com o solo.

Na filosfera a comunidade de procariotos esta relacionada à espécie vegetal.

Na casca a comunidade bacteriana pode ser influenciada pelas bactérias epifíticas residente na filosfera e esta relacionada à espécie vegetal.

No solo a comunidade bacteriana foi maior, porém pode estar sendo influenciada pela espécie vegetal.

A variação espacial não influenciou na comunidade de procariotos.

Na filosfera foi demonstrado a ocorrência de UTOs específicas para cada espécie vegetal, porém não ocorreu UTOs comuns entre as espécies.

Em casca e solo a ocorrência de UTOs específicas para cada espécie vegetal e entre as plantas foram demonstradas.

Foi demonstrada a ocorrência de UTOs específicas para cada ambiente estudado, sendo maior no solo. A ocorrência de UTOs comuns foi maior entre filosfera e casca e ocorreu UTOs comuns a todos os ambientes.

REFERÊNCIAS

- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 859-868, 2004.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 4th. ed. New York: Academic, 2005. 952 p.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, G. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, New York, v. 24, p. 555-565, 2000.
- ANDREWS, J.H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 603-635, 1992.
- ANDREWS, J.H.; HERRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.
- ANDREWS, J.H.; KENERLEY, C.M.; NORDHEIM, E.V. Positional variation in Phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. **Microbial Ecology**, New York, v. 6, p. 71-84, 1980.
- ANDREWS, J.H.; KENERLEY, C.M.; NORDHEIM, E.V. Positional variation in phyllosphere microbial populations within an apple tree canopy. **Microbial Ecology**, New York. 6, p. 71-84, 1980.
- BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. 1990 Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 591-607, 1990.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, Baltimore, v. 89, p. 353-359, 1999.
- BOND, P.L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L.; Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactors. **Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1910-1916, 1995.

BORNEMAN, J.; SKROCH P.W.; O'SULLIVAN K.M.; PALUS J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1935-1943, 1996.

BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E. Fitness of *Salmonella enteric* serovar Thompson in the ciliantro phyllospher. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3614-3621, 2002.

BRANDL, M.T.; QUINONES, B.; LINDOW, S.E. Heterogeneous transcription of an indolacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surfaces. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**, Washington, v. 98, p. 3454-3459, 2001.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: (<http://www.mma.gov.br/port/sbf/pnf/n2dados.html>). Acesso em: 02 jul. 2007.

BRODIE, E., EDWARDS, S.; CLIPSON, N. Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. **Microbial Ecology**, New York, v. 44, p. 260-270, 2002.

BUNSTER, L.; FOKKEMA, H.J.; SCHIPPERS, B. Effect of surface activity of *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1340-1345, 1989.

CAMBOURS, M.A.; NEJAD, P.; GRANHALL, U.; RAMSTEDT, M. Frost-related dieback of willows. Comparison of epiphytically and endophytically isolated bacteria from different *Salix* clones, with emphasis on ice nucleation activity, pathogenic properties on ice nucleation activity, pathogenic properties and seasonal variation. **Biomass and Bioenergy**, New York, v. 28, p. 15-27, 2005.

CAPE, J.N. Contact angles of water droplets on needles of Scots pine (*Pinus sylvestris*) growing in polluted atmospheres. **The New Phytologist**, London, v. 93, p. 293-299, 1983.

CAPE, J.N.; PERSY, K.E. Environmental influences on the development of spruce needle cuticles. **The New Phytologist**, London, v. 93, p. 293-299, 1993.

CHAO, A.; LEE, S.M. estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 87, p. 252-263, 1992.

CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian & New Zealand Journal of Statistic**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 117-128, 2006.

CHO, J.J.; SCHROTH, M.N.; KOMINOS, S.D.; GREEN, S.K. Ornamental plants as carriers of *Pseudomonas aeruginosa*. **Phytopathology**, Baltimore, v. 65, p. 425-431, 1975.

COLLINS, D.P.; JACOBSEN, B.J. Optimizaing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 153-161, 2003.

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

DE LEIJ, F.A.A.M.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. The use of bacterial colony development for the characterisation of bacterial populations in soil and on roots. **Microbial Ecology**, New York, v. 27, p. 81-97, 1994.

DOMINGUES, E.N.; SILVA, D.A. Geomorfologia do Parque Estadual de Carlos Botelho (SP). **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, n. 42, p. 71-105, 1988.

DOMINGUES, E.N.; SILVA, D.A. Geomorfologia do Parque Estadual de Carlos Botelho (SP). **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, n. 42, p. 71-105, 1988.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997, p.17-66.

DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S.M.; DAVIS, J.A.; KUSKE, C.R. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied Environmental Microbiology**, Washington v. 65, p. 1662-1669, 1999.

ELLIS, R.J.; THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J. Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 28, p. 345–356, 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 of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**. Washington, v. 103, p. 626-631, 2006.

FIERER, N; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**. Washington, v. 103, p. 626-631, 2006.

FISCHER, C.R.; JANOS, D.P.; PERRY, D.A.; LINDERMAN, R.G.; SOLLINS, P. Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. **Biotropica**, Lawrence, v. 26, p.369-377, 1994.

GANS J.; WOILINSK, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, p. 1387-1390, 2005.

GARBEVA, P.; VanVEEN, J.A.; VanElsas, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2005. v.1, 2816p.

GRAYSTON, S.J.; PRESCOTT, C.E. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1157-1167, 2005.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369-378, 1998.

GRUNDMANN, G.L. Spatial scales of soil bacterial diversity – the size of a clone. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, V. 48, p. 119-127, 2004.

GUNASEKERA, T.S; PAUL, N.D. Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B: 320–290 nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, p. 513-519, 2007.

GUTTERSON, N. Microbial fungicides. **Critical Review Biotechnology**, v. 10, p. 69-91, 1990.

HANLIN, R.T. **Illustrated genera of ascomycetes**. New York: APS Press, 1989. 263p.

HIRAISHI, A.; KAIYA, S.; MIYAKODA, H.; FUTAMATA, H. Biotransformation of polychlorinated dioxins and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. **Microbes and Environments**, Kyoto, v. 20, p. 227-242, 2005a.

HIRAISHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOZAKO, Y. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo organotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 132, p.91-94, 1995b.

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 64, p. 624-653, 2000.

HUTCHISON, M.L.; JOHNSTONE, K. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of Brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 42, p. 373-384, 1993.

IBEKWE, A.M.; GRIEVE, C.M. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 48 ,p. 239-248, 2004.

IHLEN, P.G.; GJERDE, I.; SÆTERSDAL, M. Structural indicators of richness and rarity of epiphytic lichens on *Corylus avellana* in two different forest types within a nature reserve in south-western Norway. **Lichenologist**, London, v. 33, p. 215-229, 2001.

INÁCIO, J.; PEREIRA, P.; CARVALHO, M.; FONSECA, A.; AMARAL-COLLAÇO, M. T., SPENCER-MARTINS, I. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean – Type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, New York v. 44, p. 344-353, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE: IBAMA. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/> Acesso em: 02 julho 2007.

JACOBS, J.L.; SUNDIN, G.W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5488–5496, 2001.

JACQUES, M.A.; MORRIS, C.E. Bacterial population dynamics and decay on leaves of different ages of ready-to-use broad-leaved endive. **International Journal Food Science and Technology**, London, v. 30, p. 221-236, 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.

JOHNSON, K.B.; STOCKWELL, V.O. Management of fire blight: a case study in microbial ecology. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 227-248, 1998.

JONES, J.B.; CHASE, A.R.; HARBAUGH, B.K.; RAJU, B.C. Effect of leaf wetness, fertilizer rate, leaf age, and light intensity before inoculation on bacterial leaf spot of chrysanthemum. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 782-784, 1985.

JURKEVITCH, E.J.; SHAPIRA, G. Structure and colonization dynamics of epiphytic bacterial communities and of selected component strains on tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, p. 300–308, 2000.

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

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, p. 75-86, 1995.

KINKEL, L. L.; WILSON, M.; LINDOW, S.E. Effects of sampling scale on the assessment of epiphytic bacterial populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 29, p. 283-297 1995.

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

KINKEL, L.L.; WILSON, M.; LINDOW, S.E. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3413-3423, 1996.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A.M.; ALLEONI, G.; AZEVEDO, V.; BERTERO, M.G.; BESSIERES, P.; BOLOTIN, A.; BORCHERT, S.; BORRIS, R.; BOURSIER, L.; BRANS, A.; BRAUN, M.; BRIGNELL, S.C.; et. al. The complete genome of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, Washington, 390, p. 249-256, 1997.

KUSKE, C.R.; BARNS, S. M; BUSCH, J. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, 3614-3621, 1997.

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.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas . In VITAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J.B. (Ed.) **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LEVEAU, J.H.J.; LINDOW, S.E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**, Washington, v. 98, p. 3446-3453, 2001.

LINDOW, S.E.; ARNY, D.C.; UPPER, C.D. distribution of ice-nucleation active bacteria on plants in nature. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 36, p. 831-838, 1978.

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

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

LINDOW, S.E.; MCGOURTY, G.; ELKINS, R. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. **Phytopathology**, Baltimore, v. 86, p. 841-848, 1996.

LYNCH, J.M. Interaction between bacteria and plants in the root environment. In: RHODES-ROBERT, M.E.; SKINNER, F.A., (Ed.). **Bacteria and Plants**. London: Academic Press, 1982. p. 1-23.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. (Ed.). **Brock biology of microorganisms**, 11th ed., Washington, Prentice Hall., 2005.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilac*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, New York, v. 11, p. 634-642, 1998.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. **Five Kingdoms**: an illustrated guide to the phyla of life on earth. 3rd ed. New York: WH Freeman, 1998. 520 p.

MARSCHNER, P.; YANG, C.H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D.E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MENCH, M.; MOREL, J.L.; GUCKERT, A.; GUILLET, B. Metal binding with root exudates of low molecular weight. **The Journal of Soil Science**, Oxford, v. 39, p. 521-527, 1988.

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.; QUINOMES, B.; LINDOW, S.E. Biological sensor for sucrose availability: relative sensitivities of various reporter genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1038-1317, 2001.

MOHANTY, S.R.; BODELIER, P.L.E.; CONRAD, R. Effect of temperature on composition of the mathanotrophic community in rice field and forest soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 62, p. 24–31, 2007.

MONIER, J.M.; LINDOW, S.E. Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. **Microbial Ecology**, New York. 49, p. 343–352, 2005.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS, J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiol**, Barcelona, v. 5, p. 169-175, 2002.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JACQUES, M.A. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1570-1576, 1997.

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

MUYZER, G.; WAAL, E.C. de; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1993.

NAIR, J.R.; SINGH, G.; SEKAR, V. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 772-780, 2002.

NEUFELD J.D.; MOHN, W.W. Unexpectedly high bacterial diversity in arctic tundra relative to boreal forest soils, revealed by serial analysis of ribosomal sequence tags. **Applied Environmental Microbiology**, Washington v.71, p.5710-5718, 2005.

NOGUEIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 439-447, 2006.

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.

OTT, E.M.; MULLER, T.; MULLER, M.; FRANZ, C.M.; ULRICH, A. GABEL, M.; SEYFARTH, W. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonization the phyllosphere of grasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 54-66, 2001.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecological Letters**, Singapore, v. 3, p. 236-251, 2000.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York. p. 36. 303–315, 1998.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, p. 1-55, 1986.

PLUMMER, R.M.; HALL, R.L.; WATT, T.A. Effect of leaf age and nitrogen fertilization on sporulation of crown rust (*Puccinia coronata* var. *lolii*) on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Annals Applied Biology**, Oxford, v. 121, p. 51-56, 1992.

PRESTON, G.M.; BERTRAND, N.; RAINEY, P.B. Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 999-1014, 2001.

PRIHA, O.; GRAYSTON, S.J.; HIUKKA, R.; PENNANEN, T.; SMOLANDER, A. Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 33, p. 17–24, 2001.

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

RANGASWAMI, G.; OBLISAMI, G. A study of the correlation between the antagonistic actinomycetes and the physical and chemical properties of some soils of south India. **Indian Phytopatology**, New Delhi, v. 20, p. 280-290, 1967.

RODRIGUES, R.R. **Diversidade, dinâmica e conservação em florestas do estado de São Paulo – 40ha de parcelas permanentes**. Piracicaba: ESALQ; Depto. Ciências Biológicas, 2005. 327p.(Relatório científico, 3).

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H. CAMARGO, F.A.O.;FARMERIE, W.G.;TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrast soil microbial diversity. **International Society for Microbial Ecology**, New York, v.1, p.283-290, 2007.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for OTU-based comparisons of membership and structure between microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 10, p. 6773-6778, 2006b.

_____. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operacional taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

_____. Toward a census of bacterial in soil. **Plos Computational Biology**, San Francisco, v .2, p. 786-793, 2006a.

SESSITSCH, A., WEILHARTER, A., GERZABEK, M.H., KIRCHMANN, H. AND KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v .67, p. 4215–4224, 2001.

SILVA, PAULO; NAHAS, ELY. Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p.304-310, 2002.

SINGLETON, D.R.; FURLOG, 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.

SOS MATA ATLÂNTICA. Disponível em: (<http://www.sosmatatlantica.org.br/>). Acesso em 02 de julho de 2007.

STACH, J.E.M.; MALDONADO, A.L.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A.T. New primers for class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environmental. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n.10, p. 828-845, 2003.

STADLER, B.; MÜLLER, T. Aphid honeydew and its effect on the phyllosphere microflora of *Picea abies* (L.) Karst. **Oecologia**, Berlin, v. 108, p. 771-776, 1996.

STEPHAN, A.; MEYER, A.H.; SCHMID, B. Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. **The Journal of Ecology**, London, v. 88, p. 988-998, 2000.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews Microbiology**, Boca Raton, v. 26, p. 37-57, 2000.

THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J.; ELLIS, R.J.; LILLEY, A.K.; MCCORMACK, P.J.; PURDY, K.J.; Rainey, P.B. Short-term community dynamics in the phyllosphere microbiology of field-grown sugar beet. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 16, p. 205-212, 1995.

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.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWENIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIDDINS, D.G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **Journal Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 170-178, 1996.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 78-78, 1990.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240-245, 2002.

TUKEY JR., H.B. The leaching of substances from plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 21, p. 305-324, 1970.

TUKEY, H.B. The leaching of substances from plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 21, p. 305-324, 1970.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.J.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG, T.; BORNEMAN, J. Analysis of Bacterial Community Composition by Oligonucleotide Fingerprinting of rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3243-3250, 2002.

Van HERK, C.M. Bark pH and susceptibility to toxic air pollutants as independent causes of changes in epiphytic lichen composition in space and time. **Lichenologist**, London, v. 33, p. 419-441, 2001.

VESSEY, J.K.; FEY, H. Involvement of cytokinin in the stimulation of nodulation by low concentrations of ammonium in *Pisum sativum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen v. 188, n. 3, p. 447-455, 2003.

WARD, B.B. How many species of prokaryotes are there. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**, Washington, v. 99, n.16, p. 10234-10236, 2003.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**. Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WILSON, M.; LINDOW, S.E (B). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 4468-4477, 1994.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 345-351, 2000.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of National Academic of Science (USA)**, Washington, v. 98, p. 3889-3894, 2001.

ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 53, p. 1155-1163, 2003.

ANEXOS

Tabela 16 – Informações relacionadas ao número da amostra, sub-parcela e dados geodésicos das amostras coletadas.

						(continua)
	nº da amostra	Sub-parcela	plaqueta	espécie vegetal	UTM_X	UTM_Y
1	40	E01	360	Ocotea dispersa	202897.36	7322522.69
2	78	E00	407	Ocotea dispersa	202891	7322508.9
3	19	I01	726	Ocotea dispersa	202944.25	7322446.08
4	72	E05	2782	Ocotea dispersa	202970.6	7322559.31
5	71	C08	5601	Ocotea dispersa	202987.01	7322632.52
6	39	D09	6024	Ocotea dispersa	203022.05	7322630.22
7	14	I09	6729	Ocotea dispersa	203089.15	7322533.82
8	82	B12	9413	Ocotea dispersa	203060.66	7322689.51
9	25	D10	8017	Ocotea dispersa	203051.25	7322629.27
10	22	I01	721	Ocotea teleiandra	202938.61	7322444.77
11	31	J01	743	Ocotea teleiandra	202942.91	7322440.36
12	56	C03	1228	Ocotea teleiandra	202919.07	7322574.8
13	80	C02	1782	Ocotea teleiandra	202895.92	7322558.59
14	30	B02	1798	Ocotea teleiandra	202888.05	7322586.32
15	43	D02	1839	Ocotea teleiandra	202909.66	7322563.5
16	10	J02	2086	Ocotea teleiandra	202966.67	7322437.77
17	58	L11	8553	Ocotea teleiandra	203151.63	7322508.71
18	7	K13	9844	Ocotea teleiandra	203161.75	7322543.79
19	18	L12	10706	Ocotea teleiandra	203169.28	7322512.36
20	55	I00	51522	Ocotea teleiandra	202925.61	7322443.59
21	53	K12	51585	Ocotea teleiandra	203150.67	7322533.05
22	79	I03	1440	Mollinedia schottiana	202964.07	7322476.51
23	60	J03	2523	Mollinedia schottiana	202988.31	7322449.32
24	9	J04	3183	Mollinedia schottiana	203000.45	7322468.69
25	38	E08	5455	Mollinedia schottiana	203026.85	7322602.16
26	62	D09	6043	Mollinedia schottiana	203035.63	7322619.73
27	6	D10	7570	Mollinedia schottiana	203033.77	7322635.77
28	47	E11	7726	Mollinedia schottiana	203071.22	7322618.44
29	51	N12	10514	Mollinedia schottiana	203180.81	7322482.2
30	26	N13	10819	Mollinedia schottiana	203195.83	7322490.66
31	76	M14	12687	Mollinedia schottiana	203205.46	7322514.35
32	20	N14	12869	Mollinedia schottiana	203207.51	7322507.87
33	46	K05	51598	Mollinedia schottiana	203032.02	7322460.54
34	67	J02	2090	Mollinedia uleana	202972.18	7322458.62
35	21	K02	2121	Mollinedia uleana	202970.99	7322425.78
36	24	J03	2516	Mollinedia uleana	202994.14	7322456.7
37	23	D09	6020	Mollinedia uleana	203020.85	7322625.63
38	27	E09	6128	Mollinedia uleana	203039.72	7322604.44
39	59	D10	7584	Mollinedia uleana	203043.39	7322636.68
40	1	E10	8121	Mollinedia uleana	203059.76	7322615.37
41	11	K13	9889	Mollinedia uleana	203160.55	7322537.46
42	29	L13	10620	Mollinedia uleana	203173.78	7322517.88
43	83	L12	10701	Mollinedia uleana	203169.18	7322519.89
44	65	L14	12656	Mollinedia uleana	203205.41	7322539.2

Tabela 16 – Informações relacionadas ao número da amostra, sub-parcela e dados geodésicos das amostras coletadas.

(conclusão)						
nº da amostra	Sub-parcela	plaqueta	espécie vegetal	UTM X	UTM Y	
45	68	J04	51631	Mollinedia uleana	203002.83	7322468.08
46	81	L10	8322	Eugenia cuprea	203123.33	7322490.57
47	63	B12	9424	Eugenia cuprea	203047.23	7322690.86
48	8	B03	1199	Eugenia cuprea	202912.45	7322599.3
49	48	C02	1817	Eugenia cuprea	202889.12	7322572.36
50	36	K10	8635	Eugenia cuprea	203105.57	7322518.62
51	2	A12	9268	Eugenia cuprea	203044.19	7322698.02
52	52	A13	9536	Eugenia cuprea	203063.83	7322713.86
53	42	C03	1216	Eugenia cuprea	202916.63	7322583.49
54	4	B02	1796	Eugenia cuprea	202887.15	7322595.36
55	49	L11	8555	Eugenia cuprea	203148.01	7322507.92
56	12	A14	10999	Eugenia cuprea	203080.6	7322733.68
57	45	K11	51610	Eugenia cuprea	203131.84	7322521.75
58	5	B03	1170	Eugenia melanogyna	202903.01	7322594.26
59	15	C03	1217	Eugenia melanogyna	202911.82	7322585.84
60	66	B02	1787	Eugenia melanogyna	202889.6	7322584.92
61	32	C02	1823	Eugenia melanogyna	202893.61	7322556.62
62	33	L10	8318	Eugenia melanogyna	203119.23	7322492.53
63	16	K11	8527	Eugenia melanogyna	203127.53	7322516.11
64	34	L11	8559	Eugenia melanogyna	203153.74	7322508.11
65	41	K10	8700	Eugenia melanogyna	203124.44	7322516.59
66	35	B12	9421	Eugenia melanogyna	203058.59	7322686.16
67	28	A13	9537	Eugenia melanogyna	203059.94	7322711.39
68	37	B13	9580	Eugenia melanogyna	203067.2	7322705.38
69	74	A14	10997	Eugenia melanogyna	203076.31	7322732.26
70	17	K00	959	Tabebuia serratifolia	202945.84	7322414.8
71	73	K00	1057	Tabebuia serratifolia	202952.63	7322406.28
72	69	I02	2047	Tabebuia serratifolia	202947.37	7322469.34
73	54	K02	2120	Tabebuia serratifolia	202971.5	7322427.84
74	70	D10	8040	Tabebuia serratifolia	203049.92	7322629.53
75	57	D13	9120	Tabebuia serratifolia	203101.6	7322659.45
76	77	D12	9661	Tabebuia serratifolia	203081.06	7322650.9
77	50	J13	9815	Tabebuia serratifolia	203165.18	7322566.54
78	61	J14	11683	Tabebuia serratifolia	203175.71	7322566.13
79	75	L14	12628	Tabebuia serratifolia	203200.87	7322543.23
80	64	K14	12804	Tabebuia serratifolia	203183.32	7322564.18