

THIAGO MONTEIRO ARAÚJO DOS SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A  
FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237d  
2008

Santos, Thiago Monteiro Araújo dos, 1984-  
Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas  
a frutos de café (*Coffea arabica* L.) / Thiago Monteiro  
Araújo dos Santos. – Viçosa, MG, 2008.  
xvii, 112f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Arnaldo Chaer Borges.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Endofítico. 2. Reação em cadeia de polimerase.  
3. Eletroforese de gel com gradiente desnaturante. 4. DNA  
ribossômico 16S - Bancos genômicos. 5. Firmicutes.  
6. Filogenia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.35

THIAGO MONTEIRO ARAÚJO DOS SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A  
FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de agosto de 2008

---

Prof<sup>a</sup>. Célia Alencar de Moraes  
(Co-orientadora)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Co-orientador)

---

Prof. Maurício Dutra Costa

---

Prof<sup>a</sup>. Daniele Ferreira da Silva

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Ao maravilhoso Deus.

Aos meus pais, Jovelino e Silvana.

Aos meus queridos irmãos, Diogo e Luiza.

*"Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez".*

Jean Cocteau

## **AGRADECIMENTOS**

Ao maravilhoso Deus, por ser o meu alicerce e guia em todos os momentos. “Quem me dera ao menos uma vez, fazer com que o mundo saiba que Seu nome está em tudo...”.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade da realização deste projeto, que tanto contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pelo exemplo de compreensão e postura e pela orientação conduzida de forma tão amistosa e dedicada. Minha eterna admiração como pessoa e pesquisador.

À professora Célia Alencar de Moraes, pelo carinho, incentivo, dedicação, orientação, espírito científico e, principalmente, pela confiança depositada em mim. Obrigado por me abrir as portas para o fascinante mundo da ciência.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela ajuda na condução do projeto e por disponibilizar o LBBMA para a realização do meu trabalho.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pelas aulas impecáveis, pelos conselhos, conversas e lições que ultrapassaram a relação profissional.

À professora e amiga Daniele Ferreira da Silva, que foi professora, parceira de laboratório e, de forma tão prestativa, aceitou participar da banca examinadora.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pela amizade, pelos ensinamentos e por disponibilizarem seus laboratórios para a realização do meu trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia.

Aos meus queridos pais, Jovelino e Silvana, por todo o amor, confiança e apoio incondicionais, por entenderem a minha ausência nos feriados, férias e datas especiais, por acreditarem nos meus sonhos e sonharem comigo; e por servirem de modelo de caráter e responsabilidade. Obrigado pelas asas e pelas raízes...

Aos meus irmãos, Diogo e Luiza; e à minha nova irmã Marianne, pela paciência, por ignorarem minhas implicâncias, e por toda amizade que têm por mim.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, especialmente ao Helson, ao Alexander e à Lilian, pelos momentos de descontração e por toda a ajuda.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial (MIND), especialmente Ana Paula, Andressa, Eliana, Néia, Margarete e Marta por todo o apoio e companheirismo. Serei eternamente um “MINDiano”.

Aos amigos “MINDianos” Marcelo e Alessandra, pela ajuda inestimável na condução dos experimentos e nas análises dos resultados.

À minha amiga Fernanda Floresta, por tornar os dias de trabalho tão agradáveis, por todas as conversas, por toda a ajuda, por todas as vezes que me empurrou para frente, pela preocupação e apoio.

À minha amiga Adriana, por me ajudar nos momentos mais turbulentos. Obrigado pelo carinho, cumplicidade e atenção que sempre teve por mim.

Aos meus amigos-irmãos Alexandra e Guilherme, por todas as brincadeiras, pelas conversas mais longas da minha vida e por suportarem com tanta amizade meus freqüentes momentos de “intemperismo”.

A todos os meus amigos da BIO e da Microbiologia, especialmente aos grandes amigos: Aryádina, Bete, Bruna, Carol, Fernanda, Flavinha, Gardênia, Izabella, Juline, Jussara, Marliane, Tássia, Talita. Todos vocês são muito pesados para serem levados nos ombros, por isso os carrego no coração.

Aos amigos dos Laboratórios de Anaeróbios, Alimentos, Fisiologia, Genética, Micorriza e Petróleo.

A todos que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

THIAGO MONTEIRO ARAÚJO DOS SANTOS, filho de Jovelino Araújo dos Santos e Silvana Alves Monteiro dos Santos, nasceu em Caratinga – MG, no dia 08 de março de 1984.

Em maio de 2002, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa – MG, e, em outubro de 2006, graduou-se em Ciências Biológicas. Neste mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da mesma Instituição.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE QUADROS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO DE LITERATURA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM FRUTOS DE CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	3
1.1. INTRODUÇÃO .....	4
1.2. A IMPORTÂNCIA DA ATIVIDADE CAFEEIRA NO BRASIL .....	5
1.3. A QUALIDADE DA BEBIDA DO CAFÉ .....	6
1.4. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS .....	13
1.4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
1.4.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE <i>Coffea arabica</i> L. E QUALIDADE DA BEBIDA .....	20
1.5. ECOLOGIA MICROBIANA NA ERA PÓS-GENÔMICA .....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26



## CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADA A FRUTOS DE CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L.) POR PCR-DGGE.....	37
RESUMO.....	38
2.1. INTRODUÇÃO .....	40
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
2.2.1. Área de estudo .....	44
2.2.2. Amostragem .....	44
2.2.3. Desinfestação superficial de frutos de café.....	48
2.2.4. Extração de DNA total de bactérias endofíticas .....	49
2.2.5. Análise da diversidade genética da comunidade bacteriana endofítica.....	50
2.2.5.1. Estudo do perfil genético da comunidade bacteriana endofítica por PCR-DGGE.....	50
2.2.5.2. Seqüenciamento dos fragmentos dos rDNAs 16S re-amplificados e purificados .....	60
2.2.5.3. Análise comparativa das seqüências dos rDNAs 16S da comunidade bacteriana associada aos frutos de café .....	61
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
2.3.1. Avaliação do processo de desinfestação superficial de frutos de café .....	62
2.3.2. Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais por PCR-DGGE .....	65
2.3.3. Filogenia de bactérias endofíticas presentes em frutos de café .....	71
2.4. CONCLUSÕES .....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## CAPÍTULO 3

CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE CLONES rDNA 16S DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE FRUTOS DE CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	85
RESUMO.....	86
3.1. INTRODUÇÃO .....	88
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	91
3.2.1. Extração de DNA total, em média escala, de microrganismos endofíticos associados aos frutos de café.....	91
3.2.2. Construção de bibliotecas de rDNAs 16S das populações bacterianas associadas aos frutos de café.....	92
3.2.2.1. Amplificação dos rDNAs 16S .....	92
3.2.2.2. Clonagem e seqüenciamento dos rDNAs 16S.....	98
3.2.3. Análise comparativa das seqüências dos rDNAs 16S das populações bacterianas associadas aos frutos de café .....	99

3.2.4. Estimativa da diversidade e representatividade de clones na biblioteca metagenômica .....	99
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
3.3.1. Seqüenciamento das bibliotecas de rDNAs 16S das populações bacterianas associadas aos frutos de café .....	101
3.3.2. Análise do tamanho da amostra e da diversidade de ribotipos na biblioteca de clones rDNA 16S de Firmicutes endofíticos de frutos de café .....	103
3.3.3. Filogenia de bactérias endofíticas presentes em frutos de café .....	104
3.4. CONCLUSÕES .....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Produção de café (safra 2008) por Unidade Federativa. ....6
- Figura 2: Imagem por satélite referente à região do município de Araponga, cidade da Zona da Mata Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil, compreendida entre as coordenadas 42°36'35" W a 42°22'48" W de longitude, e 20°34'12" S a 20°46'48" S de latitude.....46
- Figura 3: (A) Vista aérea de área georeferenciada da Fazenda Serra do Boné, no município de Araponga. (B) Frutos sadios no estádio cereja de café (*Coffea arabica* L.) do denominado "Café das Montanhas de Araponga" da safra 2005. (C) Detalhe dos frutos maduros.....47
- Figura 4: Diagrama esquemático da região do rDNA 16S amplificada por PCR para avaliação das possíveis diferenças nos dois métodos de desinfestação confrontados.....57
- Figura 5: Diagrama esquemático da técnica de PCR-DGGE utilizada para avaliação das possíveis diferenças nos dois métodos de desinfestação confrontados. ....57
- Figura 6: Diagrama esquemático da técnica de *Nested*-PCR utilizada para análise prévia da diversidade de Eubacteria em frutos de café (*Coffea arabica* L.) por PCR-DGGE.....58
- Figura 7: Perfil eletroforético em DDGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas, presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.), obtido após amplificação enzimática utilizado *primers* universais para Eubacteria. A: Processo de desinfestação sem a etapa de adição de lisozima; B: Processo de desinfestação em que houve a etapa de adição de lisozima; n: Tratamento-Controle da reação de PCR; M: Marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias-padrão (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692; (II) (III) e (V) *Escherichia coli* ATCC 29922; (IV) e (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. ....64
- Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de

café (*Coffea arabica* L.) pertencentes a  $\alpha$ -Proteobacteria (A),  $\beta$ -Proteobacteria (B),  $\gamma$ -Proteobacteria (C), Firmicutes (D) e Actinobacteria (F). 1: Produtos de ampliações a partir de amostras de DNA extraída de frutos de café, 2: Repetição, M: 100 pb DNA Ladder, n: Branco da reação de PCR..... 66

Figura 9: Perfil eletroforético em DDGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.), obtido após amplificação enzimática utilizando *primers* específicos para diferentes filos de Eubacteria e *primers* universais para Eubacteria, pela técnica de *Nested-PCR*. A:  $\alpha$ -Proteobacteria; B:  $\beta$ -Proteobacteria; C:  $\gamma$ -Proteobacteria; D: Firmicutes; E: Actinobacteria; n: Tratamento-Controle da reação de PCR; M: Marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias-padrão (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692; (II) (III) e (V) *Escherichia coli* ATCC 29922; (IV) e (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; (VII) *Pseudomonas putida* ATCC 15176; (VIII) *Bacillus subtilis* ATCC 23858..... 68

Figura 10: Perfil eletroforético em DDGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.), obtido após amplificação enzimática utilizando *primers* universais de Eubacteria. A: Eubacteria; n: Tratamento-Controle da reação de PCR; M: Marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias-padrão (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692; (II) (III) e (V) *Escherichia coli* ATCC 29922; (IV) e (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; (VII) *Pseudomonas putida* ATCC 15176; (VIII) *Bacillus subtilis* ATCC 23858..... 69

Figura 11: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética das seqüências dos genes rDNA 16S obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Anabaena variabilis* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank..... 72

Figura 12: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de  $\beta$ -Proteobacteria. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank..... 73

Figura 13: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de  $\gamma$ -Proteobacteria. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Bacillus subtilis* foi utilizado como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os

números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank.....75

Figura 14: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de Firmicutes. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank.....76

Figura 15: Frequência de representação dos gêneros de Firmicutes endofíticos de frutos de café (*Coffea arabica* L.), com base na afiliação filogenética. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas com o sequenciamento de clones (n=25) da biblioteca de rDNA16S construída com fragmentos dos rDNAs 16S, presentes no DNA metagenômico, amplificados a partir de *primers* específicos para o filo Firmicutes.....102

Figura 16: Curva de rarefação de clones rDNA 16S de Firmicutes endofíticos de frutos de café.....103

Figura 17: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de Firmicutes. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de clones componentes da biblioteca de rDNAs 16S. *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank...106

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Relação das classes de diferentes compostos químicos voláteis constituintes do aroma do café e características sensoriais a eles atribuídas na composição da qualidade da bebida do café. ....	10
Quadro 2: Seqüência dos <i>primers</i> usados para amplificar fragmentos de genes rDNA 16S nos experimentos de PCR. ....	55
Quadro 3: Seqüência dos <i>primers</i> usados para amplificar fragmentos de genes rDNA 16S nos experimentos de PCR. ....	95
Quadro 4: Identificação dos clones presentes na biblioteca de rDNA 16S pertencentes ao filo Firmicutes.....	104

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Variações na composição de frutos verdes de café pertencentes às espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. .....8
- Tabela 2: Abundância das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), correspondentes aos diferentes grupos em gel de DGGE.....70
- Tabela 3: Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), correspondentes aos diferentes filos de Eubacteria estudados, observada em gel de DGGE.....71

## RESUMO

SANTOS, Thiago Monteiro Araújo dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2008. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café** (*Coffea arabica* L.). Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Co-orientadores: Célia Alencar de Moraes e Marcos Rogério Tótola.

A complexidade da microbiota epifítica e endofítica presente em frutos de café e o limitado conhecimento dos microrganismos, especialmente dos não-cultiváveis, dificultam a caracterização da biodiversidade e da possível atividade e contribuição dela para a formação de precursores de compostos que definem a qualidade superior da bebida do café. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade bacteriana endofítica associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) coletados em fazenda localizada na Zona da Mata Norte de Minas Gerais, Brasil. Fragmentos de rDNAs 16S foram diretamente amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de *primers* específicos para os filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria pertencentes às classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , utilizando, como molde, DNA metagenômico extraído de frutos de café. Os amplicons foram submetidos à Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) e utilizados para construção de bibliotecas de clones de rDNAs 16S. A PCR-DGGE mostrou variado perfil de diversidade genética na amostra de DNA, com a presença de pelo menos 38 Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). Os produtos de PCR purificados e seqüenciados mostraram que a comunidade de bactérias endofíticas é composta, entre outros, por representantes relacionados filogeneticamente aos filos Firmicutes e Proteobacteria pertencentes às classes  $\beta$  e



$\gamma$ , dentre os quais se destacam microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis. A presença de bactérias endofíticas pertencentes ao gênero *Burkholderia* e à espécie *Klebsiela oxytoca* é sugerida com base nas análises filogenéticas realizadas a partir do seqüenciamento de DNA obtido de bandas purificadas do gel de DGGE. Um total de 50 clones positivos da biblioteca de rDNAs 16S de  $\gamma$ -Proteobacteria endofíticas e 25 clones positivos da biblioteca de rDNAs 16S de Firmicutes endofíticos foram parcialmente seqüenciados e identificados. O resultado da análise das seqüências mostrou 3 gêneros de Firmicutes na biblioteca de rDNAs 16S, sendo que 60% mostraram alta identidade com *Bacillus*, 8% com *Staphylococcus* e 4% com *Paenibacillus*. Análises de rarefação e de cobertura mostraram que a biblioteca foi representativa e suficiente para refletir a diversidade de Firmicutes endofíticos de frutos de café e que a seqüência única detectada na amostra aproxima-se do número total de seqüências únicas dentro desta biblioteca. As populações de bactérias endofíticas presentes em frutos de café são diversas e compreendem diferentes filos. Neste estudo foi construída, pela primeira vez, uma biblioteca de clones de rDNAs 16S para acessar a diversidade de bactérias endofíticas, cultiváveis e não-cultiváveis, em frutos de café. O papel funcional dessas bactérias nos frutos de café, assim como a diversidade genética e funcional de outros grupos de microrganismos, continua sendo investigado. O conhecimento dessa diversidade é de fundamental importância para se determinar a participação destes microrganismos na produção e interconversão de metabólitos precursores daqueles que estão associados à qualidade superior da bebida do café. Adicionalmente, esses estudos podem auxiliar no entendimento dos princípios fisiológicos e genéticos envolvidos nas complexas interações microrganismo-hospedeiro e microrganismo-microrganismo.

## ABSTRACT

SANTOS, Thiago Monteiro Araújo dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2008. **Genetic diversity of endophytic bacteria associated with coffee cherries** (*Coffea arabica* L.). Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Co-advisers: Célia Alencar de Moraes and Marcos Rogério Tótola.

The complexity and limited knowledge of the epiphytic and endophytic microbiota in coffee cherries, especially the unculturable ones, make it a challenging task the characterization of this microbial diversity and its possible role as producers of precursors to compounds inherent to higher quality coffees. The present study was conducted to evaluate the diversity of endophytic bacteria in coffee cherries (*Coffea arabica* L.) from plantations located in North Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. Fragments of 16S rDNA were PCR-amplified using specific primers for the phyla Actinobacteria, Firmicutes, and Proteobacteria classes  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , using as template metagenomic DNA extracted from coffee cherries. Amplicons were evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) fingerprinting and also used to create a library of 16S rDNA clones. PCR-DGGE showed a variable genetic diversity profile in the DNA sample and revealed at least 38 Operational Taxonomic Units (OTU). PCR products sequenced showed that the endophytic bacterial community is composed, in addition to others, by representatives phylogenetically affiliated to the phyla Firmicutes and Proteobacteria, classes  $\beta$  and  $\gamma$ , for both cultivated and uncultivated microorganisms. The presence of endophytic bacteria belonging to *Burkholderia* and *Klebsiella oxytoca* is suggested based on the phylogenetic analyses of sequenced DNA fragments purified from the bands of the

DGGE gels. A total of 50 clones of endophytic  $\gamma$ -Proteobacteria and 25 clones of endophytic Firmicutes from the 16S rDNA library were partially sequenced and identified. The result of sequence analyses showed three genera of Firmicutes among which 60% showed high identity with *Bacillus*, 8% with *Staphylococcus*, and 4% with *Paenibacillus*. Rarefaction and coverage analyses showed that the number of clones screened from the bacterial clone library was sufficient to reflect the diversity of endophytic Firmicutes in coffee cherries and that the number of unique sequence types sampled from this library approached the total number of unique sequences within the library. The populations of endophytic bacteria in coffee cherries are diverse and cover different phyla. In this study, for the first time, a library of 16S rDNA clones was constructed to access the diversity of endophytic bacteria in coffee cherries, both of culturable and unculturable microorganisms. The functional role of these bacteria in coffee cherries, as well as the genetic and functional diversity of other groups of microorganisms, is under investigation. The knowledge on this diversity is essential to determine the role of endophytic microorganisms in the production and interchange of precursors metabolites associated with the highest quality of the coffee beverage. Additionally, these studies will help the understanding of the physiological and genetic principles involved in the complex host-microorganism and microorganism-microorganism interactions.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mercado mundial, e o segundo maior consumidor desse produto. A cadeia produtiva do café envolve aproximadamente 10 milhões de pessoas, direta ou indiretamente, desde a produção até a comercialização final. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional de café, fato de relevância e que é traduzido pelo seu papel no mercado como gerador de emprego e de riqueza para o Estado, e como fator de fixação da mão-de-obra em cidades do interior e no meio rural.

A qualidade da bebida do café é o fator determinante de seu valor no momento da comercialização e, por isso, a oferta de café de qualidade superior está sendo ampliada no mercado. A expressão final da qualidade do café é determinada por fatores como a espécie botânica, a variedade, a origem geográfica, o estágio de maturação e a interação entre os processos nas fases de pré e pós-colheita. Todos esses fatores são potencialmente determinantes da prevalência dos microrganismos típicos do fruto de café que contribuem para as características sensoriais da bebida.

Os microrganismos endofíticos de ocorrência natural em frutos de café desempenham papel importante na produção de metabólitos secundários que interferem positiva ou negativamente na qualidade da bebida. Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras e fungos filamentosos de ocorrência natural já foram isolados em todos os estágios de desenvolvimento dos frutos de café. A presença de bactérias endofíticas cultiváveis já foi demonstrada, ao contrário da microbiota não-cultivável, pouco caracterizada.

A demonstração da presença de populações de microrganismos endofíticos em frutos de café, associada à necessidade de melhor documentar essa diversidade e elucidar o papel funcional dessa microbiota como produtora de substâncias precursoras das que conferem as características sensoriais da bebida do café, amplia, significativamente, e justifica o interesse no aprofundamento de estudos desse sistema biológico. O entendimento da conexão entre genes da planta e genes microbianos requer o conhecimento dos mecanismos que ditam a interação planta-microrganismo e como elas se modificam ou são modificadas pelo ambiente.

A diversidade, a atividade e a sucessão dessa microbiota, bem como os metabólitos produzidos durante o processo de maturação e secagem dos frutos, podem ser melhor estudados com o uso das técnicas moleculares independentes de cultivo atualmente disponíveis, com vista à melhoria do padrão de qualidade da bebida. Das metodologias mais indicadas e utilizadas em estudos com essa abordagem destacam-se as que se baseiam na análise do gene rDNA 16S, em que se incluem a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), e clonagem e seqüenciamento dos genes que codificam os rDNAs 16S dos representantes da microbiodiversidade.

Esses métodos moleculares permitem a elucidação de relações filogenéticas, bem como de estudos descritivos combinando informações filogenéticas e fenotípicas, além de estudos ecológicos com o objetivo de revelar espécies não-cultiváveis de microrganismos, evitando os procedimentos tradicionais de cultivo em que se baseavam os estudos clássicos de Ecologia Microbiana.

O presente trabalho propõe: (1) avaliar a diversidade genética da comunidade bacteriana presente em frutos de café (*Coffea arabica* L.), (2) construir uma biblioteca de rDNAs 16S a partir de DNA extraído da comunidade bacteriana presentes em frutos de café e (3) identificar e analisar filogeneticamente os principais grupos bacterianos presentes em frutos de café.

Para atender a estes objetivos, esta dissertação consta de três capítulos. O Capítulo 1 revisa a literatura sobre o tema central deste trabalho, bactérias endofíticas em frutos de café e métodos de estudo; o Capítulo 2 consta de análise da diversidade genética de bactérias endofíticas associada aos frutos de café por PCR-DGGE; e o Capítulo 3 consta de identificação e filogenia de bactérias endofíticas presentes em frutos de café por seqüenciamento de clones pertencentes a uma biblioteca de rDNAs 16S.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

#### **BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

## 1.1. INTRODUÇÃO

A importância histórica, econômica e social da atividade cafeeira no Brasil é traduzida pelos benefícios trazidos ao processo de urbanização e industrialização do país e pela conseqüente capacidade geradora de empregos, direta ou indiretamente. Atualmente, o Brasil responde por aproximadamente um terço da produção e exportação mundial de café (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2008). Esse é um dos mais importantes produtos agrícolas no comércio internacional e o segundo maior gerador de riquezas, perdendo apenas para o petróleo (MOREIRA et al., 2000).

A determinação da qualidade do café, o que define seu valor comercial no mercado mundial, é o resultado de um conjunto de fatores combinados que definem a prevalência de microrganismos típicos no fruto de café e que contribuem para conferir características desejáveis à bebida. Dentre a microbiota naturalmente associada aos frutos de café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; SILVA et al., 2000; AVALLONE et al., 2001; SAKIYAMA, 2001; SAKIYAMA et al., 2001; VEGA et al., 2005), os microrganismos endofíticos, conceituados como sendo aqueles que podem ser isoladas de superfícies desinfestadas de tecidos de plantas e que não sejam visivelmente prejudiciais à mesma (HALLMANN et al., 1997), têm um papel destacado na produção de metabólitos secundários que interferem na composição final da bebida.

As associações entre microrganismo endofíticos e seus hospedeiros são variadas, complexas (NEWMAN & REYNOLDS, 2005) e, ainda, pouco compreendidas. Entretanto, o conhecimento da diversidade e da atividade dessa microbiota, que precede o estudo dessas interações, pode ser aprofundado com o uso das novas abordagens e técnicas de estudo atualmente disponíveis (MUYZER

& SMALLA, 1998; HANDELSMAN et al., 1998; HANDELSMAN, 2004; RIESENFELD et al., 2004), com vista à melhoria do padrão de qualidade da bebida.

O desenvolvimento das abordagens moleculares para os estudos de Ecologia Microbiana levou à concepção de novas tendências e à definição de novos conceitos que pretendem ultrapassar as limitações e o reducionismo impostos pela abordagem clássica.

## **1.2. A IMPORTÂNCIA DA ATIVIDADE CAFEIEIRA NO BRASIL**

O cafeeiro é um arbusto da família Rubiaceae originário da Abissínia, atual Etiópia. As primeiras mudas e sementes de café foram introduzidas no Brasil, mais precisamente em Belém, pelo Sargento-mor Francisco de Melo Palheta, no século XVIII, por volta de 1727, trazidas da América Central e das Guianas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ – ABIC, 2008). Já naquela época, o café possuía grande valor comercial e tornou-se, rapidamente, a principal atividade agrícola do país, responsável por mais da metade da renda obtida com as exportações. No final do século XIX, o Brasil transformou-se no maior produtor mundial de café e, a partir daí, a cafeicultura deixou de ter caráter essencialmente rural e passou a ser fonte de recursos para a urbanização e industrialização (ABIC, 2008).

O gênero *Coffea* reúne aproximadamente 100 espécies (DAVIES et al., 2006), sendo duas delas as difundidas para a produção comercial de café, quais sejam: *Coffea arabica* L., reconhecida pela qualidade potencial de sua bebida (KY et al., 2001), e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, que compõem em torno de 70% e 30% do mercado internacional total, respectivamente (VIEIRA et al., 2006). O café, atualmente produzido em mais de 60 países, é um dos importantes produtos agrícolas no comércio internacional, sendo considerado como o segundo maior gerador de riquezas do mundo, perdendo apenas para o petróleo (MOREIRA et al., 2000; VIEIRA et al., 2006).

Com uma área plantada de 2,2 milhões de hectares e exportação média de 35 milhões de sacas, o Brasil é o maior produtor mundial de café, seguido pelo Vietnã e Colômbia, e responde por mais de um terço de toda a produção mundial e exportação (VIEIRA et al., 2006; DaMATTA et al., 2007; CONAB, 2008). O setor é responsável pela geração de empregos diretos e indiretos no País, e por US\$ 2,5 bilhões na pauta de produtos exportados no ano (CONAB, 2008). Entre os Estados produtores, Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional de café,



responsável por 50,1% da produção brasileira (Figura 1) (CONAB, 2008). Juntos, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná respondem por, aproximadamente, 88,5% da produção do café brasileiro (ABIC, 2008 e CONAB, 2008).

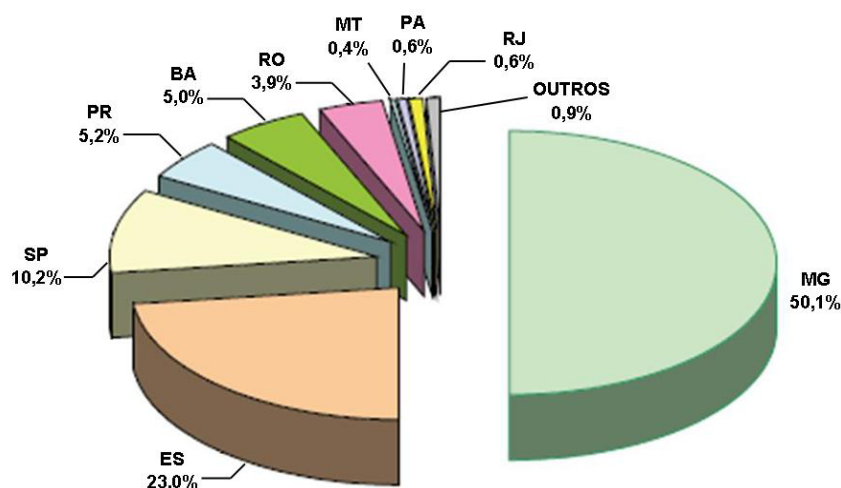


Figura 1: Produção de café (safra 2008) por Unidade Federativa do Brasil.

Fonte: <<http://www.conab.gov.br>> COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acesso em 10/06/2008.

### 1.3. A QUALIDADE DA BEBIDA DO CAFÉ

A bebida produzida a partir do café é considerada uma das mais populares do planeta. A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) prevê que o consumo brasileiro de café deverá atingir 21 milhões de sacas em 2010, o que fará do país o maior consumidor do produto no mundo. Essa posição é, atualmente, ocupada pelos Estados Unidos, que apresenta consumo médio anual de 20 milhões de sacas.

A qualidade da bebida do café é o fator determinante de seu valor no momento da comercialização e, por isso, a oferta de café de qualidade superior está sendo ampliada no mercado mundial. A expressão final da qualidade do café é uma resultante multifatorial dependente de componentes genéticos (KY et al., 2001; LEROY et al., 2006), ecofisiológicos (LEROY et al., 2006; DaMATTA et al., 2007), edafoclimáticos e agronômicos (GUYOT et al., 1996; DECAZY et al., 2003; VAAST et al., 2005; SILVA et al., 2005) e da interação entre os processos nas fases de pré e pós-colheita, em que estão incluídos a fermentação, o armazenamento, a torrefação, a moagem e o preparo da infusão (FERNANDES et al., 2001; GONZALEZ-RIOS et al., 2007; SCHMIDT et al., 2008).

A composição química dos frutos verdes de café é um indicador importante utilizado para a avaliação da qualidade da bebida do café (MARTÍN et al., 1998; KOSHIRO et al., 2006). Ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, aminoácidos e polifenóis são considerados os principais constituintes que influenciam na qualidade da bebida, embora a participação de todos esses compostos ainda não esteja completamente esclarecida (KOSHIRO et al., 2006). Os cafés pertencentes às variedades de arábica (*C. arabica*) são conhecidos por resultarem em bebida de qualidade superior, em relação aos cafés das variedades de robusta (*C. canephora*), principalmente, em razão das diferenças na composição química dos grãos (KY et al., 2001).

As análises de grãos despulpados de espécies selvagens de *C. arabica*, originadas da Etiópia e do Quênia, e de *C. canephora*, cultivadas em cinco países africanos, quanto aos teores de sacarose, trigonelina, cafeína e ácido clorogênico mostraram que os genótipos de *C. arabica* apresentaram claramente maiores teores de sacarose e trigonelina, enquanto nos de *C. canephora* foram encontrados os maiores valores para os teores de cafeína, polifenóis e ácido clorogênico (MARTÍN et al., 1998; KY et al., 2001).

Entre os açúcares presentes nos frutos de café, a sacarose destaca-se como sendo aquele encontrado em maior quantidade, e sua quantidade pode variar entre espécies, origem e tipo de processamento (KY et al., 2001; FARAH et al., 2006). Grãos de café maduros da variedade arábica possuem o dobro de sacarose, em torno de 9,2 %, da detectada em grãos da variedade robusta (ROGERS et al., 1999; KY et al., 2001). Há uma forte correlação positiva entre os teores de trigonelina, de ácido 3,4-dicafeoilquínicos, de cafeína, de extrato etéreo, de açúcares e de proteína bruta com a qualidade da bebida, sendo estes compostos precursores de substâncias que compõem o sabor e aroma da bebida do café (DE MARIA et al., 1999; MOREIRA et al., 2000; FARAH et al., 2006; LEROY et al.,

2006). Alguns desses autores verificaram a existência de diferenças na composição química de frutos verdes de café das espécies *C. arabica* e *C. canephora* (Tabela 1).

Tabela 1: Variações na composição de frutos verdes de café pertencentes às espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

Componentes	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
pH	5,26 – 6,11	5,27 - 6,13
Minerais*	3,5 – 4,5	3,9 – 4,5
Lipídeos*	13 – 17	7,2 – 11
Cafeína*	0,7 – 2 (média 1,4)	1,5 – 2,8 (média 2,2)
Ácidos alifáticos*	1,5 – 2	1,5 – 2
Ácidos clorogênicos*	4,80 – 6,14	5,34 – 6,41
Trigonelina*	1 – 1,2	0,6 – 0,75
Oligossacarídeos*	6 – 8	5 – 7
Polissacarídeos totais*	50 – 55	37 – 47
Aminoácidos*	0,15 – 0,25	0,15 – 0,25
Proteínas*	11 – 13	11 – 13

\* % de matéria seca

Fonte: MOREIRA et al. (2000) e LEROY et al. (2006).

Além da relação dos determinantes genéticos na composição química dos frutos, é sabido que áreas de maior altitude e sob sombreamento permitem o estabelecimento de condições que retardam a maturação e modulam favoravelmente a acidez e os teores de açúcares nos frutos, que são fatores importantes para a formação do aroma (GUYOT et al., 1996). Estudos realizados em cafés da variedade arábica pertencentes a seis regiões produtoras de Honduras, considerando a composição química (teores de lipídeos, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos), características agronômicas (forma dos frutos, vigor das plantas e rendimento), fatores edafoclimáticos (índices pluviométricos,

altitude, latitude, longitude), e parâmetros de torrefação, aliados à classificação sensorial da bebida indicaram que os melhores cafés foram obtidos nas altitudes acima de 1.000 metros e onde os índices pluviométricos anuais permaneceram abaixo de 1.500 mm (DECAZY et al., 2003).

Uma característica interessante da bebida do café é o fato de não possuir valor nutricional relevante, sendo consumida basicamente em razão dos efeitos fisiológicos e psicológicos relacionados à presença da cafeína e, principalmente, pelo prazer e satisfação que seu aroma e sabor são capazes de proporcionar (DE MARIA et al., 1999; MOREIRA et al., 2000). Dos dois atributos sensoriais mencionados, o aroma é, indubitavelmente, o mais complexo.

O aroma da bebida do café, que é basicamente formado por uma mistura altamente complexa de compostos voláteis e não voláteis, a exemplo de ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e compostos fenólicos, além dos gerados pela atividade de enzimas sobre alguns destes constituintes (SARRAZIN et al., 2000), tem sido alvo de estudos sistemáticos. A contribuição de cada um desses compostos para o aroma final do café é variada e resulta também de interações sinérgicas e antagônicas entre esses diferentes compostos. O café processado contém mais compostos voláteis do que qualquer outro alimento ou bebida, tendo sido já identificados aproximadamente mil compostos voláteis nesse produto (DE MARIA et al., 1999; MOREIRA et al., 2000 e SARRAZIN et al., 2000). A relação das classes dos diferentes compostos químicos constituintes do aroma do café inclui os alifáticos, alicíclicos e aromáticos voláteis, cada um contribuindo com características sensoriais definidas (MOREIRA et al., 2000) (Quadro 1).

Quadro 1: Relação das classes de diferentes compostos químicos voláteis constituintes do aroma do café e características sensoriais a eles atribuídas na composição da qualidade da bebida do café.

COMPOSTO	QUANTIDADE	CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS	EXEMPLOS <sup>A</sup>
FENÓIS	40	Os fenóis voláteis, de maneira geral, são responsáveis pelo odor de matéria queimada e também pela sensação de amargor e adstringência.	4-vinil-guaiacol, guaiacol, fenol, 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol
ALDEÍDOS	29	São responsáveis por aromas acres e pungentes, sendo indesejáveis em altas concentrações. Os aldeídos de cadeia longa normalmente apresentam um aroma agradável e suave de frutas e flores.	hexanal, (Z)-2-nonenal, (E)-2-nonenal, (E, Z)-2,6-nonadienal
CETONAS	68	Conferem odores de fruta e os que podem ser associados a açúcar queimado, além de outros aromas similares ao da manteiga e ao de chá.	propanona, butano-2,3-diona, 3-hidróxi-2-metil-4H-pirano-4-ona (maltol), 2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenteno-1-ona (cicloteno), β-damascenona
ÁLCOOIS	18	Associados a aromas florais e outros aromas relacionados a mel e cerveja	metanol, etanol, 3-metil-2-buteno-1-ol (álcool prenílico), linalol, 2-feniletanol, 3-mercaptop-3-metilbutanol
ÉTERES	*	Os éteres voláteis estão presentes no café torrado em menor quantidade. A quantidade de informação relacionada à origem e as propriedades sensoriais dos éteres voláteis no café ainda é reduzida.	metoxietano, 2-metóxi-2-metilpropano, éter difurfúrico, dimetoxicicloexano

<sup>A/</sup> Compostos encontrados em maior quantidade.

\* Não quantificada.

Fonte: MOREIRA et al. (2000).

Quadro 1: (Continuação).

COMPOSTO	QUANTIDADE	CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS	EXEMPLOS <sup>A</sup>
HIDROCARBONETOS	67	Nenhuma informação sobre as propriedades sensoriais dos hidrocarbonetos foi encontrada na literatura relacionada ao aroma do café. Aparentemente, a expressiva quantidade dos compostos desse grupo na fração volátil do café torrado não impacta o aroma final.	alcanos e alquenos de cadeia curta, etilbenzeno, vinilbenzeno (estireno)
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	22	Conferem ao café torrado os odores bem característicos de queijo, manteiga, creme e chocolate. Em geral, não são consideradas substâncias que impactam o aroma final do café torrado.	ácido fórmico, ácido cáprico, ácido acético, ácido propanóico, ácido butírico, ácido valérico
AMINAS	17	Poucas informações relativas à origem e as propriedades sensoriais das aminas voláteis presentes no café torrado são encontradas na literatura.	dimetilamina, metilamina, etilamina, 1,3,7-trimetilxantina (cafeína), 3,7-dimetilxantina (teobromina), 1,3-dimetilxantina (teofilina)
ÉSTERES	29	Os ésteres voláteis apresentam odores variados, alguns são semelhantes a odores de pinho ou frutas, como damasco e pêra.	formato de metila, acetato de metila, acetato de etila, salicilato de metila, butanoato de etila, isobutanoato de etila, 2-metilbutanoato de etila
LACTONAS	9	Estão amplamente distribuídas na natureza e conferem odores de certos frutos, como damasco, pêssego, morango e nectarina.	γ-butirolactona, γ-valerolactona, e δ-lactonas

<sup>A/</sup> Compostos encontrados em maior quantidade.

\* Não quantificada.

Fonte: MOREIRA et al. (2000).

Quadro 1: (Continuação).

COMPOSTO	QUANTIDADE	CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS	EXEMPLOS <sup>A</sup>
COMPOSTOS SULFURADOS	65	São considerados de importância para o aroma do café torrado, sendo os limites de detecção extremamente baixos e os aromas potentes e característicos, tendendo a dominar o aroma total do produto quando presentes.	metanotiol, 3,3'-dimetil-4-oxo-1,2-ditiolano, 3-metil-2-buten-1-ol, 3-mercapto-3-metilbutila, 3-mercapto-3-metilbutanol
ANIDRIDOS	3	Nenhuma informação sobre as propriedades sensoriais dos anidridos foi encontrada na literatura relacionada ao aroma do café.	anidrido metilmaléico, anidrido dimetilmaléico, anidrido etilmaléico

<sup>A/</sup> Compostos encontrados em maior quantidade.

\* Não quantificada.

Fonte: MOREIRA et al. (2000).

Além dos componentes genéticos da espécie botânica, dos edafoclimáticos e dos relacionados ao manejo da cultura e ao processamento, envolvidos na expressão final da qualidade do café, a importante participação de microrganismos na produção de compostos precursores que irão resultar em compostos de aroma no café processado deve ser considerada, uma vez que eles são, historicamente, reconhecidos responsáveis por conduzirem diversos processos fermentativos determinantes de qualidade relacionados à produção de componentes de *flavour*, por exemplo, em produtos como vinho, vinagre, cerveja, vegetais fermentados e produtos lácteos e cárneos (LONGO & SANROMÁN, 2006).

## **1.4. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS**

### **1.4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O estabelecimento das plantas em seus respectivos habitats depende, entre outros fatores, da sua capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos. Entre essas possíveis interações destacam-se as associações mutualísticas com os fungos especializados do solo e as associações com bactérias fixadoras de nitrogênio. Além destas, interações com microrganismos denominados endofíticos têm recebido especial atenção pela importância em relação a diferentes espécies vegetais (PEIXOTO-NETO et al., 2002).

Endofíticos, ou endófitos, são classicamente conceituados como sendo aqueles microrganismos, principalmente fungos e bactérias, capazes de colonizar tecidos das partes aéreas de vegetais em alguma fase do seu ciclo de vida, sem causar danos à planta hospedeira. De forma prática, são aqueles isolados ou extraídos de tecidos vegetais desinfestados superficialmente e que, visivelmente, não causam dano à planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997). Todos esses conceitos, entretanto, são suficientemente amplos para incluir virtualmente qualquer microrganismo que resida dentro de uma planta hospedeira (ZHANG et al., 2006).

As interações entre plantas e microrganismos podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. A distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos (aqueles que habitam as superfícies das plantas) e fitopatógenos é uma classificação de ordem puramente didática (AZEVEDO et al., 2000). As tentativas de conceituar essas relações e diferenciá-las não são definitivas, uma vez que a relação benéfica ou patogênica depende das condições ambientais ou do equilíbrio



com as outras populações de microrganismos. Sendo assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições e do genótipo do hospedeiro, se tornar um patógeno; e este pode, dependendo das fases do ciclo vital, viver em harmonia com o hospedeiro (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990). Ou ainda, uma bactéria epifítica pode, eventualmente, penetrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica (ANDREWS & HARRIS, 2000; SABARATNAM & BEATTIE, 2003). Da mesma forma, os endofíticos têm primeiro que se localizar na superfície para penetrarem no hospedeiro sendo, durante esse estágio, semelhantes a epifíticos, conforme ocorre com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em milho (WAGNER & LEWIS, 2000). Em suma, pode-se dizer que há um gradiente separando essas possíveis relações estabelecidas entre plantas e microrganismos em que se torna difícil determinar claros limites para discriminar cada uma das três categorias mencionadas (AZEVEDO et al., 2000).

A denominação de endofítico foi cunhada no início do século XIX para referir a todos aqueles microrganismos que colonizam tecidos internos de plantas, sendo De Bary, em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas (PEIXOTO-NETO et al., 2002). Durante mais de um século eles permaneceram ignorados pela comunidade científica, ou foram considerados manter uma relação neutra com seus hospedeiros, não causando benefícios nem danos à planta, principalmente pelo fato de que se conhecia muito pouco sobre suas reais funções no interior dos vegetais e também por não produzirem em seus hospedeiros, estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; PEIXOTO-NETO et al., 2002). A importância de microrganismo endofítico está sendo destacada nos últimos 30 anos, a partir da demonstração de que têm capacidade para proteger seu hospedeiro contra predadores e patógenos (AZEVEDO et al., 2000).

Os microrganismos endofíticos encontram nas plantas um vasto e diverso nicho (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). As bactérias endofíticas têm sido encontradas em uma variedade de tecidos de numerosas espécies vegetais colonizando-os de forma ativa, local ou sistemicamente, ou em estado latente. Esse tipo de interação planta-bactéria parece ocorrer na maioria, senão em todas, as espécies vegetais superiores (LODEWYCKX et al., 2002). A existência ubíqua das bactérias endofíticas nos tecidos dos seus hospedeiros vegetais sugere e permite especulações sobre suas possíveis origens, formas de penetração e de dispersão desses endófitos.

Em geral, bactérias endofíticas podem ser provenientes da própria comunidade epifítica da rizosfera e filosfera, bem como de infestações endofíticas das sementes e material de propagação vegetal (HUANG, 1986; HALLMANN et al.,

1997; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998b). Com exceção daquelas que são transmitidas pelas sementes, as bactérias endofíticas entram na planta, primeiramente através da raiz; entretanto, partes aéreas das plantas, como as flores, caules e cotilédones podem também representar portas de entrada (KOBAYASHI & PALUMBO, 2000). A penetração, nesses casos, ocorre principalmente por meio de aberturas naturais, tais como estômatos, lenticelas, região de emissão de raízes laterais, ou por aberturas provocadas por injúrias (HUANG, 1986; KLUEPFEL, 1993), como ferimentos causados por instrumentos agrícolas, microferimentos nas raízes ocasionados pelo atrito destas com as partículas do solo, entre outras. Outra forma menos comum de penetração de endofíticos ocorre por meio de insetos (KLUEPFEL, 1993). Além disso, as bactérias endofíticas podem também penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas, por exemplo, celulases e pectinases (HALLMANN et al., 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997; SHISHIDO et al., 1999; REINHOLD-HUREK et al., 2006), como observado em *Azoarcus* sp. (HUREK et al., 1994), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS & KAISER, 1991) e *Pseudomonas fluorescens* (BENHAMOU et al., 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997).

Dentro da planta as bactérias endofíticas podem permanecer localizadas no ponto de entrada ou se dispersarem de forma sistêmica para outras partes da planta, habitando de forma ativa o espaço apoplástico, os vasos condutores (HUREK et al., 1994; LAMB et al., 1996; HALLMANN et al. 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997; CHELIUS & TRIPLETT, 2000; ZINNIEL et al., 2002) e, em alguns casos, ocorre colonização intracelular (HUREK et al., 1994; QUADT-HALLMANN & KLOEPPER, 1996).

A degradação enzimática das paredes celulares de plantas por bactérias endofíticas foi observada apenas durante a colonização da epiderme da raiz, mas nunca após a colonização dos espaços intercelulares do córtex da raiz (QUADT-HALLMANN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002). Esses resultados sugerem que a produção de celulases e pectinases pelos endofíticos é induzida especificamente para a penetração no interior da planta hospedeira. Essas observações indicam, ainda, a possibilidade de existência de mecanismos de penetração ativa para algumas bactérias endofíticas, embora a origem e a regulação dessas enzimas sejam pouco conhecidas. Assume-se que essas bactérias possuem mecanismos de controle específicos que regulam tanto a síntese quanto a atividade dessas enzimas, quantitativa e temporalmente (LODEWYCKX et al., 2002).

O fato de serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas confere vantagem ecológica sobre outras bactérias capazes de colonizar apenas epifiticamente seus hospedeiros. Nos tecidos internos o microrganismo encontra condições ambientais mais uniformes em que as variações de determinados fatores limitantes de crescimento, como as de temperatura, de potencial osmótico e de radiação ultravioleta, são menos estressantes (HALLMANN et al. 1997; LODEWYCKX et al., 2002). Além disso, o modo de vida endofítico pode conferir proteção contra a predação por protozoários do solo (LODEWYCKX et al., 2002). Ainda, as populações endofíticas, à semelhança das populações rizosféricas ou epifíticas, são condicionadas por fatores bióticos (outros microrganismos, parasitas e planta hospedeira) e abióticos (nutrientes e outros fatores físicos e químicos do ambiente), tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (FUENTES-RAMÍREZ et al. 1999; HALLMANN et al. 1997; SICILIANO et al., 2001; REITER et al., 2002; SEGHERS et al. 2004).

A microbiota endofítica já foi estudada em diversas espécies de plantas, sendo os principais representantes encontrados amplamente distribuídos entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nela se incluem os gêneros, a saber: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*, *Agrobacterium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*, *Aminobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*, *Blastomonas*, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*, *Brenneria*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter*, *Zymomonas* (HALLMANN et al. 1997; LODEWYCKX et al., 2002).

Essas bactérias endofíticas têm sido isoladas de uma ampla variedade de plantas (LODEWYCKX et al., 2002) de relevante importância agronômica, a exemplo de algodão (McINROY & KLOEPPER, 1995a; McINROY & KLOEPPER, 1995b), arroz (GYANESHWAR et al., 2001), batata (HOLLIS, 1951; DE BOER &

COPEMAN, 1974), café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; AVALLONE et al., 2001; SAKIYAMA, 2001; SAKIYAMA et al., 2001; VEGA et al., 2005), cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; LOIRET et al., 2004), canola (SICILIANO et al., 1998), citrus (GARDNER et al., 1982; ARAÚJO et al. 2001), feijão (MUNDT & HINKLE, 1976), milho (McINROY & KLOEPPER, 1995a; McINROY & KLOEPPER, 1995b; FISHER et al., 1992; ZINNIEL et al., 2002; RAI et al., 2007), soja (MUNDT & HINKLE, 1976; ZINNIEL et al., 2002), trigo (SICILIANO et al., 1998; ZINNIEL et al., 2002), uva (BELL et al., 1995), entre outras.

O procedimento de isolamento das bactérias endofíticas envolve cuidados especiais e é de fundamental importância para o enquadramento do organismo como um endofítico. Teoricamente, qualquer procedimento que elimina a microbiota epifítica e retrata as populações internas de forma completa deve ser considerado. Como o caráter endofítico é atribuído às bactérias isoladas, exclusivamente, a partir de tecidos vegetais sadios superficialmente estéreis (HALLMANN et al., 1997), os processos de desinfestação superficial são definitivos para manter o conceito e delimitar o habitat endofítico. Entretanto, erros podem advir como resultado de uma desinfestação incompleta da superfície, da adsorção de células bacterianas por estruturas celulares das plantas ou da penetração do agente esterilizante, no interior dos tecidos da planta, resultando em perda de endofíticos (HALLMANN et al., 1997).

Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfestante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares de adequação da metodologia, para que apenas sejam eliminados os microrganismos epifíticos. Além do processo de desinfestação superficial, as condições de cultivo devem ser apropriadas e particulares para o grupo de endófitos que se deseja isolar. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, e a temperatura de incubação utilizada para o isolamento (ARAÚJO et al., 2002).

No entanto, o isolamento de bactérias a partir de tecidos superficialmente desinfestados demonstra apenas de forma indireta o caráter endofítico. A confirmação do estado endofítico do isolado é uma exigência que, obrigatoriamente, deve ser adotada como critério de reconhecimento da natureza endofítica do microrganismo (HALLMANN et al., 1997). Faz-se necessário a demonstração da interação bactéria endofítica-planta *in loco* por meio de estudos microscópicos (HALLMANN et al., 1997, ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006) e a diferenciação entre a bactéria de interesse e a microbiota indígena. O uso

do termo “endofíticos putativos” tem sido recomendado para classificar os isolados que não atendem a este critério (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A localização *in situ* de bactérias endofíticas pode também ser avaliada associando-se às técnicas microscópicas as imunológicas ou as moleculares, que empregam sondas construídas a partir de genes marcadores específicos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998a). Adicionalmente, a fim de revelar o caráter endofítico, é recomendável avaliar a recorrência do isolado, o que significa avaliar sua capacidade de reinfetar plântulas livre de microrganismos, (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006) e o reisolamento a partir do hospedeiro infectado.

Bactérias endofíticas em uma única planta hospedeira não são restritas a espécies únicas, mas compreendem diversos gêneros e espécies (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A diversidade associada a essas bactérias endofíticas existe não somente em relação às espécies de plantas colonizadas, mas também em relação às diferentes espécies colonizadoras; o que significa que plantas podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande variedade de bactérias endofíticas (LODEWYCKX et al., 2002). Em alguns casos, constata-se uma especificidade endófito-hospedeiro ou seleção da população endofítica por parte do hospedeiro (MAVINGUI et al., 1992; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006), em que poucas espécies são encontradas, mas uma variedade de gêneros e espécies está presente simultaneamente na maioria dos casos (GARDNER et al., 1982; FISHER et al., 1992; ZINNIEL et al., 2002, RAI et al., 2007). Não se sabe se as comunidades dentro da planta interagem entre si, e tem sido especulado que os efeitos benéficos ao hospedeiro são resultantes dos efeitos combinados de suas atividades (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Como resultado de estudos mais aprofundados de biologia e ecologia de microrganismos endofíticos, é fato que eles podem conferir importantes características e trazem conseqüentes benefícios para as plantas com as quais se associam. Pesquisas demonstraram que bactérias endofíticas alteram propriedades anatômicas e fisiológicas das plantas, aumentam a resistência às condições de estresse, promovem o crescimento vegetal e reduzem os sintomas de doenças causadas por diversos fitopatógenos (HALLMANN et al., 1997; PILLAY & NOWAK, 1997; INIGUEZ et al., 2004). Os principais mecanismos pelos quais as bactérias endofíticas exercem seus efeitos são, a saber, a fixação de nitrogênio (JIMENEZ-SALGADO et al. 1997; SEVILLA et al., 2001; HUREK et al., 2002; INIGUEZ et al., 2004), a produção de fitormônios, o controle biológico de fitopatógenos na zona da raiz, seja este pelo antagonismo direto da microbiota deletéria (por meio da produção de agentes antibacterianos e antifúngicos, produção de sideróforos e

competição por nutrientes) ou pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro, e o aumento na disponibilidade de minerais (HALLMANN et al., 1997; STURZ et al., 2000; WENBO et al., 2001; LODEWYCKX et al., 2002; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Além dos efeitos benéficos para as plantas, diversos compostos de interesse biotecnológico como, por exemplo, toxinas, antimicrobianos e outros metabólitos secundários, imunossupressores, antitumorais, antioxidantes e enzimas, produzidos por microrganismos endofíticos também tem sido isolados e caracterizados. A expectativa é de que tais compostos sejam utilizados na medicina moderna, agricultura e indústria (STROBEL et al., 2004; GUNATILAKA, 2006; ZHANG et al., 2006). Recentemente, bactérias endofíticas foram isoladas e caracterizadas quanto ao seu potencial para uso em processos de fitoremediação *in situ* (NEWMAN & REYNOLDS, 2005; MOORE et al., 2006), em substituição aos processos físico-químicos tradicionais. A utilização de estirpes de *Burkholderia cepacia* endofítica geneticamente modificadas mostrou aumento da tolerância das plantas a tolueno (BARAC et al., 2004). Outros estudos mostraram a participação de um recém-descoberto microrganismo, *Methylobacterium populum* sp. nov., estirpe BJ001 (van AKEN et al., 2004a), na degradação dos nitrocompostos 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexaidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), octaidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocina (HMX) (van AKEN et al., 2004b). Em adição aos aspectos econômicos e biotecnológicos, o estudo de microrganismos endofíticos é de grande interesse acadêmico, pela possibilidade de descoberta de novas espécies microbianas, principalmente quando hospedeiros de regiões tropicais são investigados (AZEVEDO et al., 2000).

Em razão das dificuldades inerentes relacionadas aos estudos de isolamento e caracterização, associadas às limitações das tradicionais técnicas de cultivo, o conhecimento da biologia, ecologia e química das bactérias endofíticas evolui lentamente. Essa evolução do conhecimento, entretanto, tem demonstrado o potencial ímpar das bactérias endofíticas em diversos processos biotecnológicos e em sistemas de produção agrícolas (HALLMANN et al., 1997; STURZ et al., 2000). Assim, o emprego desses microrganismos nessas práticas tem aumentado substancialmente nos últimos anos, já que eles representam substitutos desejáveis de produtos químicos, favorecendo, desta forma, a preservação do ambiente.

#### 1.4.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE *Coffea arabica* L. E QUALIDADE DA BEBIDA

Embora o café seja plantado comercialmente há anos e uma quantidade apreciável de resultados de pesquisas sobre a produção de café tenha sido publicada, sabe-se pouco sobre os microrganismos associados com plantas de café e, especialmente, os endófitos não são bem caracterizados.

Tradicionalmente, os estudos que relacionam qualidade de café e presença de microrganismos reportam a ocorrência de microrganismos indesejáveis, especialmente fungos filamentosos (KRUG, 1940; KRUG, 1941) produtores de micotoxinas, como aflatoxina e ocratoxina (TANIWAKI et al., 2003; BATISTA, et al., 2003; PARDO et al., 2004; VEGAS et al., 2006).

As bactérias habitam naturalmente os tecidos de plantas saudáveis, incluindo os seus frutos (McINROY & KLOEPPER, 1995b; JIMENEZ-SALGADO et al., 1997). A composição do mesocarpo mucilaginoso de frutos de café maduros inclui açúcares simples, polissacarídeos complexos, proteínas, lipídeos e minerais (AVALLONE et al., 2000; PETRACCO, 2005; DE CASTRO & MARRACCINI., 2006), que possivelmente se constituem em excelente meio que favorece o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Os microrganismos epifíticos e endofíticos de ocorrência natural em frutos de café desempenham um papel importante na produção de metabólitos secundários que interferem positiva ou negativamente na qualidade da bebida.

O primeiro estudo de isolamento de microrganismos endofíticos em café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997) mostrou a ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes partes da planta, inclusive nos frutos e na rizosfera de diferentes cultivares e caracterizou, por meio de testes microbiológicos, bioquímicos e genéticos, o isolados como pertencentes à espécie *Acetobacter diazotrophicus*. Os mesmos autores ressaltaram a importância agrônômica desses fixadores de nitrogênio como potenciais fornecedores, pelo menos em parte, dos suprimentos de nitrogênio requeridos pela planta. Posteriormente, outros trabalhos de isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos em plantas de café foram realizados e, especialmente, em frutos da planta.

Durante o processamento de *C. arabica*, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras e fungos filamentosos epifíticos e endofíticos de ocorrência natural estão presentes em grandes quantidades e já foram isolados em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos de café (SILVA et al., 2000; AVALLONE et al., 2001; SAKIYAMA, 2001; SILVA et al., 2008). Estudos de abundância e

diversidade de microrganismos cultiváveis em frutos de café no estágio cereja mostram que as bactérias representam o grupo mais abundante em todos os estágios da secagem, seguidas por fungos filamentosos e leveduras (SAKIYAMA, 2001; SILVA et al., 2000).

Bactérias endofíticas Gram-positivas e Gram-negativas já foram também isoladas de folhas, ramos e raízes de plantas de café, sendo que a maior porcentagem dos representantes (68%) pertencia ao grupo das Gram-negativas. A maior parte, entretanto, correspondente a, aproximadamente, 44% dos isolados, foi obtida a partir dos frutos. Dos 87 diferentes isolados cultiváveis, houve predomínio dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* (VEGA et al., 2005).

As comunidades de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de café originários de Porto Rico foram estudadas, por seqüenciamento da região espaçadora intergênica (ITS), para verificar as possíveis diferenças em suas composições (SANTAMARÍA & BAYMAN, 2005). Os resultados mostraram que, apesar de estarem separadas espacialmente por milímetros de distância, as duas comunidades diferiram significativamente e diferentes fungos predominaram nas distintas comunidades, sendo que a endofítica, surpreendentemente, mostrou mais morfotipos do que a epifítica.

Atualmente existe um grande esforço no Brasil para a produção de café em que a qualidade da bebida seja superior, para atender as exigências de um mercado consumidor, interno e externo, cada vez mais exigente. Na Universidade Federal de Viçosa, o estudo da contribuição dos microrganismos, especialmente dos endofíticos, associados aos frutos de café vem sendo desenvolvido pelo Departamento de Microbiologia, a fim de se verificar os possíveis efeitos positivos da atividade microbiana sobre a qualidade da bebida do café. Os resultados obtidos a partir dos trabalhos iniciados justificam os interesses no aprofundamento dos estudos desse sistema biológico.

*Klebsiella oxytoca* endofítica isolada de frutos de café sadios foi caracterizada com relação ao crescimento em meio mínimo, adicionado de pectina cítrica e a produção intracelular de pectato-liase por esta estirpe foi demonstrada (GENARI, 1999). As características do crescimento observadas e a síntese induzida da pectinase indicam as potencialidades de *K. oxytoca* em contribuir para os processos fermentativos em grãos de café. Embora produtora de pectato-liase, a bactéria não causa dano à planta e deve possuir mecanismo regulatório para controlar a síntese e a atividade da enzima.



A presença e distribuição de bactérias e leveduras em frutos de café desinfestados superficialmente foram observadas, utilizando-se técnicas de microscopia e imunológicas (YAMADA, 1999). O estudo mostrou a existência de um gradiente de distribuição de bactérias e leveduras na polpa dos frutos, com predomínio de leveduras na porção mais externa da polpa do café e de bactérias nas sementes.

*Paenibacillus amylolyticus* é outra espécie endofítica produtora de pectinase isolada do interior de frutos maduros de café provenientes da região da Zona da Mata no Estado de Minas Gerais (PAULA, 2001). Pectinases são mais comumente encontradas em fungos e menos freqüente em bactérias. Assim sendo, este isolado é um modelo promissor para estudos de regulação metabólica dessas enzimas (SAKIYAMA et al., 2001).

A colonização de explantes da cultivar Catuaí Vermelho de *C. arabica* L. e da cultivar Apoatã de *C. canephora* Pierre ex Froenhe por bactérias endofíticas isoladas de frutos maduros, comprovada *in situ* por imunofluorescência e posterior recuperação das bactérias endofíticas inoculadas, mostrou o potencial de alguns desses isolados como promotores de crescimento (SAKIYAMA, 2001).

A diversidade e sucessão de microrganismos epifíticos e endofíticos em frutos de café *C. arabica* L. da Zona da Mata Mineira durante a seca natural em dois diferentes sistemas foi avaliada por PCR e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) (SANTOS, 2006). Os resultados mostraram que os valores de Riqueza, Índice de Diversidade de Shannon-Weaver e Equitabilidade não diferiram significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) nos dois tratamentos ao longo dos 13 dias do processo de secagem.

A diversidade de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café *C. arabica* L. também foi estudada em quatro cultivares de diferentes altitudes na Zona da Mata Mineira (CORDERO, 2008). Foram identificados e descritos 48 diferentes morfotipos de bactérias entre os 134 isolados de endofíticas do banco de cultura. A caracterização dos isolados foi feita, fenotipicamente, por métodos culturais e análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e, genotipicamente, pelo seqüenciamento de fragmentos do rDNA 16S. A porção não-cultivável da diversidade foi acessada por PCR-DGGE utilizando *primers* específicos para Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Os resultados mostraram que a altitude da lavoura influencia na densidade de bactérias endofíticas nos frutos, assim como o tipo da cultivar. Foi constatada a existência de uma relação positiva entre a densidade de bactérias endofíticas e a altitude.

A demonstração da diversidade de microrganismos endofíticos em *C. arabica* levanta tantas questões quanto as soluciona e exige, conseqüentemente, estudos funcionais desta microbiota, especialmente com relação a sua capacidade de sintetizar ou transformar compostos precursores de sabor e aroma que sejam de interesse para produção comercial de cafés de qualidade superior. Novas estratégias e abordagens de estudo dessa microbiota surgem como alternativas às metodologias tradicionais para melhor entender, frente à Era Pós-Genômica, a complexa teia que resulta dessas interações.

## **1.5. ECOLOGIA MICROBIANA NA ERA PÓS-GENÔMICA**

Os procariotos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade dos ecossistemas, sendo responsáveis por conduzirem transformações ímpares e indispensáveis para a continuidade dos ciclos biogeoquímicos (WHITMAN, 1998). Eles estão presentes em todos os ambientes terrestres e, por meio de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas de todo o ambiente a sua volta (NEWMAN & BANFIELD, 2002). A extraordinária atividade desses microrganismos está baseada em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética, o que os permite ocupar e colonizar todos os nichos possíveis; e os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável.

As bactérias representam o grupo de organismos mais abundante e diverso na Terra, compreendendo mais de um milhão de espécies (WHITMAN, 1998; HORNER-DEVINE et al., 2004). Estima-se, entretanto, que apenas uma pequena fração dessa diversidade bacteriana seja conhecida (TORSVIK et al., 2002). O número total de bactérias na Terra é estimado estar entre  $4$  e  $6 \times 10^{30}$ , com a maior proporção de células bacterianas, possivelmente, residindo nas subsuperfícies oceânica e terrestre ( $3,4 \times 10^{30}$  e  $0,25-2,5 \times 10^{30}$ , respectivamente) (WHITMAN, 1998).

Classicamente, a investigação da diversidade microbiana e dos diversos processos biológicos conduzidos por microrganismos nos diferentes ambientes requer, como passo primordial, a obtenção de culturas puras. Essa abordagem tradicional, que emprega técnica dependente de cultivo, entretanto, permite que apenas uma pequena fração, 1% ou menos, da diversidade microbiana seja acessível, limitando as análises àqueles microrganismos que crescem sob

condições de laboratório (TORSVIK et al., 1990; AMANN et al., 1995; PACE, 1997; HUGENHOLTZ, 1998; TORSVIK et al., 2002).

As primeiras evidências de que as técnicas de cultivo não representavam fielmente a diversidade microbiana nos diferentes ambiente foi a discrepância observada entre os resultados obtidos quando se utilizavam diferentes técnicas de contagem de microrganismos. Um dos indicadores de que microrganismos cultiváveis não representam muito do mundo microbiano foi a chamada “grande anomalia da contagem em placa”, que se refere à discrepância encontrada entre o tamanho da população estimada por plaqueamento e por contagem direta em microscopia. Esta discrepância é particularmente dramática em alguns ambientes aquáticos, no qual a contagem em placa e a estimativa de células viáveis, utilizando laranja de acridina, diferem em 4 a 6 ordens de magnitude, e em solo, no qual apenas 0,1 a 1% das bactérias são passíveis de cultivo em meios comuns sobre condições padrão (AMANN et al., 1995).

A utilização de técnicas moleculares para os estudos de populações microbianas que não são cultiváveis e que apresentam as mais variadas exigências em relação aos fatores nutricionais, químicos e físicos, se constitui em alternativa para o estudo da diversidade genética de espécies microbianas na natureza (MUYZER & SMALLA, 1998; DeLONG, 2004). O desenvolvimento e o aprimoramento dessas metodologias independentes de cultivo para aplicação em Ecologia Microbiana oferecem oportunidade para estimar, de forma mais real, a diversidade microbiana existente e tem levado a uma drástica mudança na perspectiva desses estudos (MUYZER & SMALLA, 1998; RAPPE e GIOVANNONI, 2003).

Os benefícios científicos, econômicos e estratégicos esperados de um melhor conhecimento da diversidade microbiana são extensos (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998) e envolvem, entre outros, o melhor entendimento das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade (TYSON et al., 2004; VENTER et al., 2004; DANIEL, 2005; WOYKE et al., 2006; DINSDALE et al., 2008), a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos e otimização das capacidades microbianas conhecidas (HENNE et al., 2000; GILLESPIE et al., 2002; COURTOIS et al., 2003; LORENZ & ECK, 2005; SUENAGA et al., 2007), e o prognóstico e a prevenção de doenças emergentes (FURRIE, 2006; MANICHANH et al., 2006).

Uma estratégia amplamente utilizada na atualidade para acessar a diversidade genética e fisiológica de microrganismos não cultiváveis é baseada no

isolamento e clonagem de DNA diretamente a partir de amostras ambientais para a construção de bibliotecas metagenômicas. Essa abordagem baseada na análise, em larga escala, de genomas de microorganismos no seu habitat natural é denominada metagenômica (HANDELSMAN et al., 1998; HANDELSMAN, 2004; RIESENFELD et al., 2004) e, embora seja um conceito relativamente novo, a idéia de que microorganismos poderiam ser identificados sem a utilização de técnicas de cultivo, pela recuperação e seqüenciamento direto a partir de amostras do ambiente é bem mais antigo (PACE et al., 1985; SCHIMIDT et al., 1991).

Essa nova abordagem permite o maior acesso a recursos genéticos presentes nos diferentes ambientes (HANDELSMAN, 2004; RIESENFELD et al., 2004) e, assim, aumenta sobremaneira o conhecimento da diversidade e das potencialidades dos microorganismos nesses ambientes. Enquanto a análise funcional dos metagenomas preocupa-se em prospectar novas enzimas e compostos de interesse biotecnológico, a análise baseada em seqüências oferece oportunidade de se conhecer a biodiversidade e o potencial metabólico de uma comunidade ambiental por análise e comparação das seqüências obtidas (HANDELSMAN, 2004; RIESENFELD et al., 2004). Considerando as possibilidades oferecidas por esta nova abordagem de estudo, pode-se dizer que a metagenômica ainda está nos estágios iniciais da construção do inventário da biodiversidade e será necessária a integração de diversas outras ciências técnicas para entender a complexidade das interações microbianas em sua totalidade e nos seus diversos ambientes (O'MALLEY e DUPRÉ, 2007).

As plantas constituem verdadeiro sistema ecológico com grande diversidade microbiana associada e, por isso, podem ser consideradas um superorganismo. Agregado ao genoma vegetal propriamente dito existe o genoma bacteriano suplementar, denominado em conjunto "microbioma", que contém, provavelmente, centenas de vezes mais genes do que o da própria planta.

Conhecer os componentes desse microbioma em plantas de café é de fundamental importância porque aliado aos programas de seqüenciamento (VIEIRA et al., 2006) e melhoramento genético do cafeeiro podem auxiliar no desenvolvimento de cultivares com características vegetativas associadas a um elevado potencial produtivo, possibilitando ainda a produção de cafés com menor custo e reduzida aplicação de agrotóxicos no controle de pragas e doenças. A caracterização do microbioma dos frutos adiciona a estas características ideais, a possibilidade de produção de cafés de qualidade, tanto do ponto de vista agrônomo, quanto da bebida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p.143-169. 1995.
- ANDREWS J.H.; HARRIS R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, p.145-180, 2000.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236. 2001.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. ESALQ, Piracicaba, 86p., 2002. (Manual)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em 07 de julho de 2008.
- AVALLONE, S.; GUIRAUD, J-P.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; BRILLOUET, J-M. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, v.65, p.1308-1311. 2000.
- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J-M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v.42, p.252-256. 2001.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W., PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65. 2000. (Publicação eletrônica)
- BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J.V.; VANGRONSVELD, J.; van DER LELIE, D. Engineered

- endophytic bacteria improve phytoremediation of water soluble, volatile organic compounds. **Nature Biotechnology**, v.22, p.583-588. 2004.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal Food Microbiology**, v.85, p.293-300. 2003.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R.; AND PAULITZ, T.C. Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Phyium ultimum* Trow: An ultrastructural and cytochemical study. **Planta**, v. 199, p.105-117. 1996.
- BELL, C.A., DICKIE, G.A., HARVEY, W.L.G., CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 46-53, 1995.
- CAMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 10 de julho de 2008.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen fixing bactéria associated with sugar cane. **Plant Soil**, v.108, p.23-31. 1988.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.183–187. 2000.
- COLWELL, R. Microbial diversity: The importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.302-307. 1997.
- CORDERO, F.P.C. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café**. 2008. 89f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C.M.; BALL, M.; FRANCOU, F.X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S.J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M.S.; AUGUST, P.R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J.L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.49-55. 2003.
- DaMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.485-510. 2007.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, v.3, p.470-478. 2005.
- DAVIES, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.152, p.465-512. 2006.
- DE BOER, S.H., COPEMAN, R.J. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 54, p. 115-122. 1974.

- DE CASTRO, R.D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.175-199. 2006.
- DECAZY, F., AVELINO, J., GUYOT, B., PERRIOT, J-J., PINEDA, C., CILAS, C. Quality of different Honduran coffees in relation to several environments. **Journal of Food Science**, v.68, p. 2356-2361. 2003.
- DeLONG, E. F. Microbial population genomics and ecology: The road ahead. **Environmental Microbiology**, v. 6, p.875-878. 2004.
- DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v.22, p.1-18. 1998.
- DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.A.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J.M.; FURLAN, M.; DESNUES, C.; HAYNES, M; LI, L.; MCDANIEL, L.; MORAN, M.A.; NELSON, K.E.; NILSSON, C.; OLSON, R.; PAUL, J.; BRITO, B.R.; RUAN, Y.; SWAN, B.K.; STEVENS, R.; VALENTINE, D.L.; THURBER, R.V.; WEGLEY, L.; WHITE, B.A.; ROHWER, F. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, p. 629-633. 2008.
- FARAH, A.; MONTERIO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.S.; TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v.98, p.373-380. 2006.
- FERNANDES, S.M.; PINTO, N.A.V.D.; THÉ, P.M.P.; PEREIRA, R.G.F.A. ; CARVALHO, V.D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, p.197-199. 2001.
- FISHER, P.J., PETRINI, O., SCOTT, H.M.L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 122, p. 299-305. 1992.
- FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; AND MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.117-128. 1999.
- FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, v.55, p.141-143. 2006.
- GARDNER, J.M., FELDMAN, A.W., ZABLOTOWICZ, R.M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus tree. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1335-1342. 1982.
- GENARI, R. **Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café**. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GILLESPIE, D.E.; BRADY, S.F.; BETTERMANN, A.D; CIANCOTTO, N.P.; LILES, M.R.; RONDON, M.R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4301-4306. 2002.

- GONZALEZ-RIOS, O.; SUAREZ-QUIROZ, M.L.; BOULANGER, R.; BAREL, M.; GUYOT, B. GUIRAUD, J-P.; SCHORR-GALINDO, S. Impact of "ecological" post-harvest processing on coffee aroma: II. Roasted coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.297–307. 2007.
- GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**. v.69, p.509-526. 2006.
- GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J.C.; PERRIOT, J.; GIRON, J.; VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafes arabica. **Plantations Recherche Développement**, v.3, p.272-283. 1996.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645. 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914. 1997.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F., CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v.5, p.245-249. 1998.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.669-685. 2004.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R.A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.3113-3116. 2000.
- HOLLIS, J.P. Bacterial in healthy potato tissue. **Phytopathology**, v. 41, p. 350-366. 1951.
- HORNER-DEVINE, M.C.; CARNEY, K.M.; BOHANNAN, B.J.M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. **Proceedings of the Royal Society B**, v.271, p.113-122. 2004.
- HUANG, J. Ultrastructure of Bacterial Penetration in Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p. 141-157. 1986.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774. 1998.
- HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p.278-285. 1998.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; van MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1913-1923. 1994.



- HUREK, T., HANDLEY, L.L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHE, Y. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.233-242. 2002.
- INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.1078-1085. 2004.
- JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMIREZ, L.E., TAPIA-HERNANDEZ, A., MASCARUA-ESPARZA, M.A., MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3676-3683. 1997.
- KHAMMAS, K.M.; KAISER, P. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. **Plant Soil**, v.137, p.75-79. 1991.
- KLUEPFEL, D.A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.441-472. 1993.
- KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C.W.; White, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. Washington: Marcel Dekker, 2000. p.199-233.
- KOSHIRO, Y.; ZHENG, X-Q.; WANG, M-L.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* e *Coffea canephora* fruits. **Plant Science**, v.171, p.242-250. 2006.
- KRUG, H.P. Café duros II. Um estudo sobre qualidade de cafés de varrição. **Revista do Instituto do Café**, v.15, p.1393-1396. 1940.
- KRUG, H.P. Café duros III. Relação entre porcentagem de microorganismos e qualidade de café. **Revista do Instituto do Café**, v.27, p.1827-1831. 1941.
- KY, C.-L.; LOUARN, J.; DUSSET, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, p.223-230. 2001.
- LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1112-1120. 1996.
- LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M. MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.229-242. 2006.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; van DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.583-606. 2002.
- LOIRET, F.G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODES, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.504-511. 2004.

- LONGO, M.A.; SANROMÁN, M.A. Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. **Food Technoogy and Biotechnology**, v.44, p.335-353. 2006.
- LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature**, v.3, p.510-516. 2005.
- MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E; GLOUX, K.; PELLETIER, E.; FRANGEUL, L.; NALIN, R.; JARRIN, C.; CHARDON, P; MARTEAU, P.; ROCA, J.; DORE, J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v.55, p.205-211. 2006.
- MARTÍN, M.J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A.G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, v.46, p.1259-1264. 1998.
- MAVINGUI, P.; LAGUERRE, G.; BERGE, O.; HEULIN, T. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1894-1903. 1992.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, p.337-342. 1995a.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.895-901. 1995b.
- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L.C.; DE MARIA, C.A.B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v.23, p.195-203. 2000.
- MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811. 1990.
- MOORE F.P.; BARAC T.; BORREMANS B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD J.; van DER LELIE D.; CAMPBELL, C.D.; MOORE E.R.B. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**. v.29, p.539-556. 2006.
- MUNDT, J.O., HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 694-698. 1976.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141. 1998.
- NEWMAN, D.K.; BANFIELD, J.F. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, v.296, p.1071-1077. 2002.
- NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: New uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6-8. 2005.

- O'MALLEY, M. A.; DUPRÉ, J. Size doesn't matter: Towards a more inclusive philosophy of biology. **Biology and Philosophy**, v.22, p.155-191. 2007.
- PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. Analyzing natural microbial population by ribosomal rRNA sequences. **ASM News**, v.51, p.4-12. 1985.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-740. 1997.
- PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochatoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v.10, p.45-49. 2004.
- PAULA, E. M. **Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea Arabica* L.)**. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biociência**, Ano 5, Número 29 - Novembro/Dezembro, p. 62-76. 2002.
- PETRACCO, M. Our everyday cup of coffee: The chemistry behind its magic. **Journal of Chemical Education**, v.82, p.1161-1167. 2005.
- PILLAY, V.K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.354-361. 1997.
- QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1144-1154. 1996.
- QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: Mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.577-582. 1997.
- RAI, R.; DASH, P.K.; PRASANNA, B.M.; SINGH, A. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: Isolation, identification and enumeration. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.853-858. 2007.
- RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p.369-394. 2003.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p.29-54. 1998a.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: Diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, p. 139-144. 1998b.

- REINHOLD-HUREK, B.; MAES, T.; GEMMER, S.; van-MONTAGU, M.; HUREK, T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p. 181-188. 2006.
- REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268. 2002.
- RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomics analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v.38, p.525-552. 2004
- ROGERS, W.J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in development grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v.149, p.115-123. 1999.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p.827-837. 2006.
- SABARATNAM, S.; BEATTIE, G.A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1220-1228. 2003.
- SAKIYAMA, C.C.H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001. 72f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade federal de Viçosa, Viçosa.
- SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.117-121. 2001.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v.50, p.1-8. 2005.
- SANTOS, T.M.A. **Diversidade e sucessão de microrganismos durante a seca natural do café**. 2006. 58f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas - Microbiologia) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa.
- SARRAZIN C.; LEQUÉE, J.; GRETSCH, C. R. Representativeness of coffee aroma extracts: A comparison of different extraction methods. **Food Chemistry**, v.70, p.99-106. 2000.
- SCHMIDT, C.A.P.; MIGLIORANZA, E.; PRUDÊNCIO, S.H. Interação da torra e moagem do café na preferência do consumidor do oeste paranaense. **Ciência Rural**, v.38, p.1111-1117. 2008.
- SCHMIDT, T.M.; DeLONG, E.F.; PACE. N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.4371-4378. 1991.

- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1475-1482. 2004.
- SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wildtype and Nif mutants strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.358-366. 2001.
- SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196. 1999.
- SICILIANO, S.D.; THEORET, C.M.; DE FREITAS, J.R.; HUCL, P.J.; GERMIDA, J.J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.844-851. 1998.
- SICILIANO, S.D.; FORTIN, N.; MIHOC, A.; WISSE, G.; LABELLE, S.; BEAUMIER, D.; OUELLETTE, D.; ROY, R.; WHYTE, L.G.; BANKS, M.K.; SCHWAB, P.; LEE, K.; GREER, C.W. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 2469–2475. 2001.
- SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.251–260. 2000.
- SILVA, C.F.; BATISTA, L.R.; ABREU, L.M.; DIAS E.S. SCHWAN, R.F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v.25, p.951-957. 2008.
- SILVA, E.A.; MAZZAFERA, P.; BRUNINI, O.; SAKAI, E.; ARRUDA, F.B.; MATTOSO, L.H.C.; CARVALHO, C.R.L.; PIRES R.C.M. The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p.229-238. 2005.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, p.257-268. 2004.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30. 2000.
- SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, v.9, p.2289-2297. 2007.
- TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; TEIXEIRA, A.A.; IAMANAKA, B.T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.173-179. 2003.

- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; LISE, F. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.782-787. 1990.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.240-245. 2002.
- TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v.428, p.37-43. 2004.
- VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J-J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.197-204. 2005.
- van AKEN, B.; PERES, C.M.; DOTY, S.L.; YOON, J.M.; SCHNOOR, J.L. *Methylobacterium populum* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary**. v.54, p.1191-1196. 2004a.
- van AKEN, B.; YOON, J.M.; SCHNOOR, J.L. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 508-517. 2004b.
- VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCHE, C.; ROGERS, Y.H.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v.304, p.66-74. 2004.
- VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L.. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p.371-380. 2005.
- VEGAS, F.E.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; GIANFAGNA, T. J.; CHAVES, F. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, v.98, p.31-42. 2006.
- VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.H.A.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E.T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P.; JORGE, E.C.; ALBUQUERQUE, É.V.S.; SILVA, F.R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; DORRY, H.F.A.; CARRER, H.; ABREU, I.N.; BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, J.B.; KITAJIMA, J.P.; XAVIER, K.G.; LIMA, L.M.; CAMARGO, L.E.A.; PEREIRA, L.F.P.; COUTINHO, L.L.; LEMOS, M.V.F.; ROMANO, M.R.; MACHADO, M.A.; COSTA, M.M.C.; SÁ, M.F.G.; GOLDMAN, H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.C.; van SLUYS, M-A; SHIMIZU, M.M.; MALUF, M.P.; EIRA, T.S.; GUERREIRO-FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; OLIVEIRA, R.L.B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S.F.; TSAI, S.M.; MAURO, S.M.Z.; SANTOS, S.N.; SIQUEIRA, W.J.; COSTA, G.G.L.; FORMIGHIERI, E.F.;

- CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G. A.G. Brazilian coffee genome project: An EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.95-108. 2006.
- WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3468-3473. 2000.
- WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B.R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, p.137-144. 2001.
- WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.6578-6583. 1998.
- WOYKE, T.; TEELING, H.; IVANOVA, N. .; HUNTEMANN, M.; RICHTER, M.; GLOECKNER, F.O.; BOFFELLI, D.; ANDERSON, I.J.; BARRY, K.W.; SHAPIRO, H.J.; SZETO, E.; KYRPIDES, N.C.; MUSSMANN, M.; AMANN, R.; BERGIN, C.; RUEHLAND, C.; RUBIN, E.M.; DUBILIER, N. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. **Nature**, v. 443, p. 950-955. 2006.
- YAMADA, C.M. **Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de café**. 1999. 56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v.23, p.753-771. 2006.
- ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208. 2002.

## **CAPÍTULO 2**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADA A FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR PCR-DGGE**



## RESUMO

O presente estudo foi realizado para investigar a possível diversidade de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) coletados em fazenda localizada na Zona da Mata Norte de Minas Gerais, Brasil. A estratégia experimental envolveu PCR de fragmentos do gene rDNA 16S amplificados a partir de DNA extraído diretamente da comunidade microbiana presente em frutos de café, usando *primers* específicos para Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria pertencentes às classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , seguida de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE). As bandas dominantes observadas em gel de DGGE foram purificadas e usadas como molde para re-amplificação por PCR. Os produtos da PCR purificados foram seqüenciados para análise comparativa com seqüências disponíveis no banco de dados GenBank por meio do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*). As árvores filogenéticas reconstruídas com base nos genes de interesse, pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>, mostraram o padrão filogenético dos grupos dominantes de ocorrência nos frutos de café. O padrão de bandas no gel de DGGE concorre para a afirmação de que a comunidade de bactérias endofíticas presentes nos frutos de café é composta, entre outros, por representantes relacionados filogeneticamente a Proteobacteria pertencentes às classes  $\beta$  e  $\gamma$  e por representantes relacionados ao filo Firmicutes, dentre os quais se destacam microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis. A presença de bactérias endofíticas pertencentes ao gênero *Burkholderia* e à espécie *Klebsiella oxytoca* é sugerida, com base no alinhamento e nas análises filogenéticas das seqüências nucleotídicas obtidas a partir da DGGE. O papel desses microrganismos nos frutos de café continua sendo investigado. O

conhecimento dessa diversidade é etapa fundamental para estudo do papel funcional dos endofíticos na produção de precursores de compostos que compõem o café para bebida com qualidade superior.

## 2.1. INTRODUÇÃO

A Ecologia Microbiana está se consolidando como uma das áreas da Microbiologia que expande os horizontes do conhecimento de forma inovadora, desenvolvendo e aprimorando métodos moleculares para a identificação e o monitoramento de microrganismos em ecossistemas naturais, com vista em estudo do papel funcional dessa microbiota. Durante os últimos anos, a identificação de microrganismos com o uso de métodos que se baseiam em análise de seqüências dos genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA) 16S tornou-se uma ferramenta importante em estudos de comunidades bacterianas em amostras ambientais (GIOVANNONI et al., 1990; WARD et al., 1990; MUYZER et al., 1993; LUDWIG & SCHLEIFER, 1994; AMANN et al., 1995; HEAD et al., 1998). Esses métodos moleculares tornaram-se, inclusive, um precioso suporte para as técnicas tradicionais de identificação, que ainda são freqüentes na rotina dos laboratórios de pesquisa.

Técnicas de *fingerprinting* genético são capazes de fornecer o perfil que representa a diversidade genética de uma comunidade microbiana em um ambiente específico, incluindo o dos não-cultiváveis. Esses métodos são diferenciados das técnicas tradicionais pela sua rapidez e reprodutibilidade (ERCOLINI, 2004). Todos eles são baseados na amplificação, por PCR, e na resolução das diversas seqüências amplificadas, simplesmente por migração eletroforética diferencial em gel de agarose ou de poliacrilamida, de acordo com o tamanho [*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), *terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms* (t-RFLP), *Ribossomal Intergenic Spacer Analysis* (RISA), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)] ou com a seqüência [*Denaturant*

*Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE), *Temporal Temperature Gel Electrophoresis* (TTGE), *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP)] (MUYZER & SMALLA, 1998; RANJARD et al., 2000; KIRK et al., 2004; HORI et al., 2006).

Dentre as técnicas de *fingerprinting* genético independentes de cultivo, DGGE é uma das mais freqüentemente utilizadas em estudos de Ecologia Microbiana para se obter uma representação qualitativa da presença e abundância de diferentes filotipos na amostra. Ela oferece oportunidade para se efetuar estimativa mais real da diversidade microbiana existente (MUYZER & SMALLA, 1998). O potencial desta metodologia para a distinção de seqüências que se diferenciam entre si pela substituição de um único resíduo de nucleotídeo foi derivado de estudos de caracterização de mutação gênica aplicados na área de medicina humana, e permitiu a detecção de mutação em indivíduos portadores de  $\beta$ -talassemia (MYERS et al., 1985a; MYERS et al., 1985b). A primeira descrição do uso de DGGE em estudos de Ecologia Microbiana data de 1993 (MUYZER et al., 1993).

A técnica de DGGE baseia-se na separação eletroforética diferencial de amplicons, obtidos por PCR, quanto a susceptibilidade da molécula de DNA à desnaturação parcial promovida por agentes desnaturantes, e discrimina amplicons de tamanhos similares, de acordo com suas seqüências de pares de bases (MUYZER et al., 1993). Ela permite o estudo simultâneo de um grande número de amostras, é uma técnica confiável, rápida e que possui reprodutibilidade (DAHLLÖF, 2002 e KIRK et al., 2004). A capacidade dessa técnica de eletroforese desnaturante em discriminar seqüências de DNA de fragmentos de mesmo tamanho, mas que diferem em apenas um único par de nucleotídeos (FISHER & LERMAN, 1983), permite a geração de padrões de bandas variáveis de acordo com a composição de microrganismos em diferentes amostras ambientais em estudos de Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana (MUYZER & SMALLA, 1998).

A versatilidade desta técnica de DGGE tem sido demonstrada com sucesso em Ecologia Microbiana, para conhecimento da estrutura genética e complexidade de comunidades microbianas (MUYZER et al., 1993; ØVREÅS E TORSVIK, 1998); em estudo da estrutura genética de um grupo filogenético e funcional particular (HEUER et al., 1997; ROESELERS et al., 2007); na análise da distribuição espacial e das mudanças na composição das populações bacterianas como resultado de impactos ambientais ou de práticas agrícolas (ØVREÅS et al., 1998; GELSOMINO & CACCO, 2006); na caracterização da diversidade e/ou sucessão de microrganismos em diferentes alimentos (ERCOLINI, 2004), especialmente os

sujeitos a alguma etapa de fermentação durante o processamento, a exemplo de café (MASOUD et al., 2004; NIELSEN et al., 2005), queijos (ERCOLINI et al., 2002), polvilho azedo (MEROTH et al., 2003; LACERDA et al., 2005), salame (COCOLIN et al., 2001), vinho (SPANO et al., 2007) e vinagre de arroz (HARUTA et al., 2006); e elucidação da participação da microbiota comensal de animais e humanos no estado de saúde e de doença (ZHANG et al., 2007; LI et al., 2008). PCR-DGGE também tem sido uma estratégia aplicada com sucesso para a caracterização da diversidade que compõem as populações de bactérias endofíticas de diferentes plantas, a exemplo de batata (GARBEVA et al., 2001; SESSITSCH et al., 2002) e citrus (ARAÚJO et al., 2002), independentemente da capacidade desses microrganismos crescerem ou não em meio de cultura.

Estudos de diversidade microbiana em cafeeiro e em frutos dessa planta nas fases de pré e pós-colheita com uso de DGGE são da maior importância para se conhecer a participação da porção não-cultivável nesses processos. Ela já foi empregada para avaliar a diversidade e sucessão de microrganismos durante dois diferentes processos de seca natural dos frutos de café e mostrou que não há um padrão previsível de sucessão da microbiota indígena ao longo dos dias de secagem (SANTOS, 2006). A porção não-cultivável das bactérias endofíticas também já foi acessada por PCR-DGGE, com a utilização de *primers* específicos para diferentes grupos bacterianos, e os resultados mostraram que a altitude da lavoura, assim como a cultivar de café, influenciam na diversidade de bactérias endofíticas nos frutos. Foi constatada, também, a existência de uma relação positiva entre a densidade de bactérias endofíticas e a altitude (CORDERO, 2008).

A avaliação da diversidade microbiana pela técnica de DGGE representa a variabilidade, inter e intra-específica, presente na comunidade amostrada. Como o conceito de espécie microbiana está atrelado à parcela de microrganismos cultiváveis, a quantificação da diversidade requer que os elementos individuais sejam agrupados em classes, visto que a diversidade é função do número total de diferentes classes, denominado Riqueza, e da abundância relativa dos elementos individuais em cada classe, denominada Equitabilidade (NÜBEL et al., 1999).

Entretanto, é necessário considerar que as bandas exibidas no perfil eletroforético podem não corresponder a diferentes espécies bacterianas, já que algumas espécies possuem múltiplas cópias do operon *rrn* cujas seqüências apresentam microheterogeneidade. Dessa forma, e considerando a base da técnica, uma única espécie pode mostrar um perfil com múltiplas bandas. (NÜBEL et al., 1999; KIRK et al., 2004). As bandas resultantes do *fingerprint* em DGGE são referidas como Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). Essas UTOs

correspondem às classes, que juntas compõem a riqueza, e a intensidade de uma delas representa a Equitabilidade. A diversidade da comunidade microbiana é medida pelo cálculo dos índices de diversidade, como o Índice de Shannon-Weaver, que é o índice mais comumente utilizado em estudos de Ecologia. (NÜBEL et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis em frutos de café (*Coffea arabica* L.), pela utilização de técnicas moleculares baseados na extração direta de DNA das bactérias presentes nos frutos de café, seguida de PCR-DGGE e do seqüenciamento e análise filogenética das bandas selecionadas a partir do gel.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), no Laboratório de Microbiologia Industrial (MIND) e no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia, localizados no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa - Minas Gerais.

### 2.2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em área georeferenciada da Fazenda Serra do Boné, no município de Araponga, cidade da Zona da Mata Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil, compreendida entre as coordenadas 42°36'35" W a 42°22'48" W de longitude, e 20°34'12" S a 20°46'48" S de latitude (Figura 2).

### 2.2.2. Amostragem

As amostras de frutos sadios de café (*Coffea arabica* L.) da cultivar Catuai Vermelho foram coletadas no estádio cereja, das safras de 2005 e 2008 (Figura 3A-C). A região de coleta das amostras esta compreendida nas coordenadas 42°27'32" W de longitude e 20°39'16,3" S de latitude, e 1.013 metros de altitude.

A amostragem foi feita pela coleta individual de frutos sadios no estádio cereja. O terço médio de alguns galhos de cafeeiros típicos da cultivar foram

coletados aleatoriamente na lavoura, de acordo com o registro das coordenadas geográficas e altitude em aparelho de GPS, Garmin® modelo Vista C. A amostra coletada foi acondicionada em isopor contendo gelo, embalada a vácuo e mantida a -20°C até o início dos procedimentos experimentais. A amostra referente à safra de 2008 foi armazenada a 4°C e processada em até 24 horas após a coleta.

Segundo Portaria nº 773, de 12 de maio de 2006 do Instituto Mineiro de Agropecuária, o café da região sob estudo é comercializado com a denominação “Café das Montanhas de Araponga”.



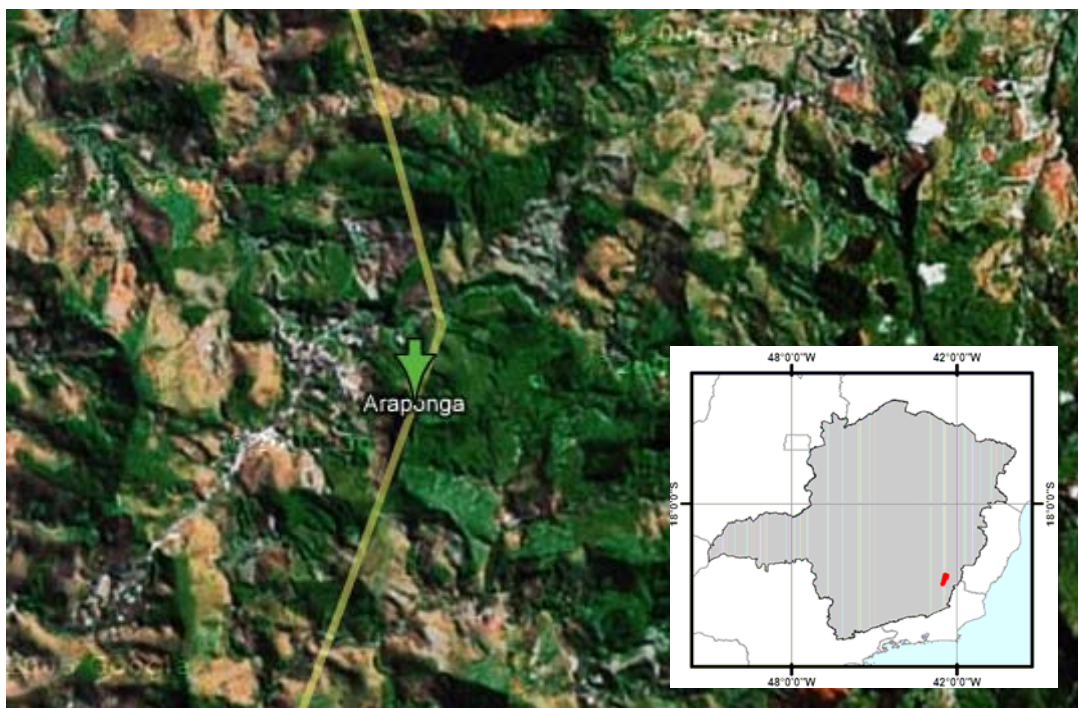


Figura 2: Imagem por satélite referente à região do município de Araponga, cidade da Zona da Mata Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil, compreendida entre as coordenadas 42°36'35" W a 42°22'48" W de longitude, e 20°34'12" S a 20°46'48" S de latitude.

Fonte: <<http://maps.google.com.br/>> Acesso em 26/05/2008.



Figura 3: (A) Vista aérea de área georeferenciada da Fazenda Serra do Boné, no município de Araponga. (B) Frutos saudios de café (*Coffea arabica* L.) no estágio cereja do denominado “Café das Montanhas de Araponga”. (C) Detalhe dos frutos maduros.

### 2.2.3. Desinfestação superficial de frutos de café

A desinfestação superficial dos frutos de café foi feita segundo protocolo estabelecido por Sakiyama et al. (2001). Os frutos de café congelados foram submetidos ao descongelamento lento antes do procedimento de desinfestação.

Inicialmente, frutos tomados aleatoriamente na amostra foram pré-lavados em 50 mL de água destilada adicionada de 4 gotas de detergente neutro e, em seguida, lavados, durante 1 minuto, por quatro vezes, em água destilada corrente para retirada de impurezas. Todos os procedimentos referentes ao processo de desinfestação foram realizados em condições assépticas. Os frutos foram submetidos, individualmente, às seguintes etapas de lavagem: duas lavagens em água destilada esterilizada; seguindo-se a agitação por 15 minutos em solução tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0); imersão, por 1 minuto, em álcool 70%; agitação por 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio 5% e Tween 0.05%; imersão por 1 minuto em álcool 70% seguida da flambagem dos frutos e agitação final por 15 minutos em solução tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0). Esse procedimento foi repetido e os frutos lavados, por duas vezes, em água destilada esterilizada.

Simultaneamente, foi realizado um segundo procedimento de desinfestação de frutos de café, em que lisozima ( $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi adicionada ao final do processo de desinfestação. Os frutos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora na solução contendo a enzima e, em seguida, lavados, por duas vezes, em água destilada esterilizada.

Como controle para avaliação do sucesso do procedimento de desinfestação, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da última água de lavagem dos frutos foram espalhadas em duplicata em meio de cultura R2A (REASONER & GELDREICH, 1985) e as placas incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Além desse controle, os frutos desinfestados foram colocados em tubos contendo meio de cultura líquido R2A e incubados a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Após o tempo de incubação, os frutos cujo processo de desinfestação mostrou-se bem sucedido foram selecionados para extração de DNA das bactérias endofíticas totais. Os frutos dos tubos teste nos quais se observou crescimento microbiano foram descartados.

#### 2.2.4. Extração de DNA total de bactérias endofíticas

A extração de DNA total de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café foi realizada pelo método de lise direta, utilizando-se o protocolo estabelecido por Fungaro et al. (2004), com modificações incorporadas no LEM, para favorecer a extração dos DNAs bacterianos.

Oito frutos de café desinfestados superficialmente foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, seguindo-se a transferência para um tubo de microcentrifuga esterilizado e adição de 830  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (CTAB 4%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol e lisozima ( $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O tubo contendo a suspensão foi incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora e transferido para nova incubação em banho-maria a  $65^\circ\text{C}$  por 20 minutos. A suspensão, em seguida, foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. O volume contido no tubo foi dividido em dois novos tubos, antes da adição de 700  $\mu\text{L}$  (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1,v/v). Os tubos foram ocasionalmente invertidos gentilmente por período de 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10.000  $g$  por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado 0,6 volume de isopropanol e o tubo foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos, seguindo-se a centrifugação a 10.000  $g$  por 5 minutos e o descarte do sobrenadante. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol 70% gelado e mantido a temperatura ambiente. Após a lavagem, o sedimento foi ressuspensionado em 30  $\mu\text{L}$  de tampão TE [Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) e EDTA 1 mM] (pH 8.0), 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de RNase (Sigma-Aldrich) foram adicionados e a suspensão incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8% em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8,3)] e brometo de etídio ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (SAMBROOK et al., 1989). A quantificação foi feita por comparação com marcadores de quantidade de DNA de fago  $\lambda$  nas concentrações de  $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  e  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

O DNA extraído foi visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

## **2.2.5. Análise da diversidade genética da comunidade bacteriana endofítica**

### **2.2.5.1. Estudo do perfil genético da comunidade bacteriana endofítica por PCR-DGGE**

O perfil genético das diferentes populações bacterianas presentes nas amostras de frutos de café foi avaliado pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE (MUYZER et al., 1993).

#### **2.2.5.1.1. Amplificação dos rDNAs 16S de representantes do domínio Eubacteria**

Fragmentos do gene codificador dos rRNAs 16S de grupos microbianos específicos representantes do domínio Eubacteria foram amplificados por PCR. O molde utilizado para as reações de amplificação foi o DNA total bacteriano extraído dos frutos de café desinfestados superficialmente.

Para amplificar a região dos genes rDNA 16S de Eubacteria, correspondente às posições 341 a 534 do rDNA 16S de *Escherichia coli*, e avaliar as possíveis diferenças nos dois métodos de desinfestação confrontados, foram utilizados os *primers* universais para eubactérias p3/p2 (MUYZER et al., 1993) (Quadro 2 e Figuras 4 e 5). A reação de PCR foi realizada em tubos de 200 µL para um volume final de 25 µL. A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (MUYZER et al., 1993, com modificações): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para amplificar fragmentos dos rDNAs 16S de diferentes grupos específicos de Eubacteria foi utilizada a técnica de *Nested-PCR* (HEUER et al., 1997 e GOMES



et al., 2001) com o sistema de *primers* F203 $\alpha$ /R1492 para  $\alpha$ -Proteobacteria, F948 $\beta$ /R1492 para  $\beta$ -Proteobacteria, fD2/RP1 ou fD2/R1492 para  $\gamma$ -Proteobacteria, BLS342F/1392R para Firmicutes, e F243HGC/R1378 ou F243HGC/R1492 para Actinobacteria (Quadro 2). Essa técnica consiste na realização de duas reações de amplificação. A primeira fornece os fragmentos específicos para cada um dos grupos estudados, que servem como molde para uma segunda etapa de amplificação, a partir de *primers* universais para Eubacteria (Figura 6).

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes às classes  $\alpha$ -Proteobacteria e  $\beta$ -Proteobacteria foi realizada com o uso dos *primers* específicos F203 $\alpha$ /R1492 e F948 $\beta$ /R1492, respectivamente (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001) (Quadro 2). A mistura de reação foi preparada com 5  $\mu$ L do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200  $\mu$ M de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 5  $\mu$ g de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (GELSOMINO & CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 56°C ( $\alpha$ -Proteobacteria)/ 61°C ( $\beta$ -Proteobacteria) por 1 minuto, para anelamento dos *primers*, e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. DNA de *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136 e de *Alcaligenes xylosoxidans* ATCC 13138 foram utilizados como controle positivo para as reações de amplificação de  $\alpha$ -Proteobacteria e  $\beta$ -Proteobacteria, respectivamente.

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes à classe  $\gamma$ -Proteobacteria foi realizada com o uso dos *primers* específicos fD2/rP1 (WEISBURG et al., 1991) (Quadro 2). A mistura de reação foi preparada com 5  $\mu$ L do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 250  $\mu$ M de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,21  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (BUNGE & LECHNER, 2001): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15 segundos para a desnaturação, 52°C por 30

segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para a extensão dos *primers*. As últimas 20 etapas de extensão foram realizadas usando incrementos na temperatura de 20 segundos por ciclo. DNA de *Pseudomonas putida* ATCC 15176 foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes ao filo Firmicutes foi realizada com o uso de *primers* específicos BLS342F/1392R (BLACKWOOD et al., 2005) (Quadro 2). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 160 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 2,5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (BLACKWOOD et al., 2005): temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 57°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 90 segundos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. DNA de *Bacillus subtilis* ATCC 23858 foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes ao filo Actinobacteria foi realizada com o uso de *primers* específicos F243HGC/R1492 (HEUER et al., 1997) (Quadro 2). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 2,5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (HEUER et al., 1997): temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 63°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR obtidos nas reações para os 5 grupos de Eubacteria estudados, a partir dos diferentes grupos de *primers* específicos para cada grupo, foram usados como molde de DNA para uma segunda reação de PCR, *Nested-*

PCR (HEUER et al., 1997 e GOMES et al., 2001). Nesta reação foram utilizados os *primers* universais para bactérias F984GC/R1378 (HEUER et al., 1997) (Quadro 2). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (GELSOMINO & CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação dos fragmentos de rDNA 16S foi feita também diretamente a partir de *primers* universais F984GC/R1378 (HEUER et al., 1997) (Quadro 2) para estudo da estrutura das comunidades de eubactérias endofíticas totais. A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada para completar o volume final. A amplificação foi feita por meio de "touchdown" PCR (DON et al., 1991; GELSOMINO & CACCO, 2006). Durante o "touchdown" PCR, a temperatura de anelamento (65°C), que é inicialmente 10°C acima da temperatura de anelamento adequada esperada para o par de *primers* utilizados, sofre decréscimos de 2°C a cada dois ciclos até um "touchdown" de 55°C; temperatura na qual 25 ciclos adicionais são desenvolvidos. As condições a partir desta etapa são as seguintes (GELSOMINO & CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 1 minuto à temperatura adequada de anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Em todas as reações para os diferentes grupos foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf).



Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) e brometo de etídio ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (SAMBROOK et al., 1989). Marcador de tamanho *100 pb DNA Ladder* (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

Quadro 2: Seqüência dos *primers* usados para amplificar fragmentos de genes rDNA 16S nos experimentos de PCR.

Primer <sup>A</sup>	rDNA 16S alvo (Posição) <sup>B</sup>	Seqüência (5'→3')	Referência
p3	Eubacteria (341-357)	gc.-CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993
p2	Eubacteria (518-534)	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer et al., 1993
F203α	α-Proteobacteria (174-203)	CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTAT	Gomes et al., 2001
F948β	β-Proteobacteria (931-948)	CGCACAAAGCGGTGGATGA	Gomes et al., 2001
R1492	Eubacteria (1492-1513)	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	Heuer et al., 1997
fD2	Bactérias entéricas (8-27)	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Weisburg et al., 1991
rP1	Bactérias entéricas (1492-1512)	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	Weisburg et al., 1991
BLS342F	Gram-positivas de baixo conteúdo G+C (325-342)	CAGCAGTAGGGAATCTTC	Blackwood et al., 2006
1392R	Eubacteria (1392-1406)	ACGGGCGGTGTGTACA	Blackwood et al., 2006

<sup>A</sup> gc.: seqüência rica em G+C (Grampo-GC) ligada à extremidade 5' (MUYZER et al., 1993).

<sup>B</sup> Posição no genoma de *Escherichia coli* (BROSIUS et al., 1981).

Quadro 2: (Continuação)

Primer <sup>A</sup>	rDNA 16S alvo (Posição) <sup>B</sup>	Seqüência (5'→3')	Referência
F243HGC	Actinomycetales (226-243)	GGATGAGCCCGCGGCCTA	Heuer et al., 1997
F984GC	Eubacteria (968-984)	gc.-AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer et al., 1997
R1378	Eubacteria (1378-1401)	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer et al., 1997
gc.		CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG	Muyzer et al., 1993

<sup>A/</sup> gc.: seqüência rica em G+C (Grampo-GC) ligada à extremidade 5' (MUYZER et al., 1993).

<sup>B/</sup> Posição no genoma de *Escherichia coli* (BROSIUS et al., 1981).

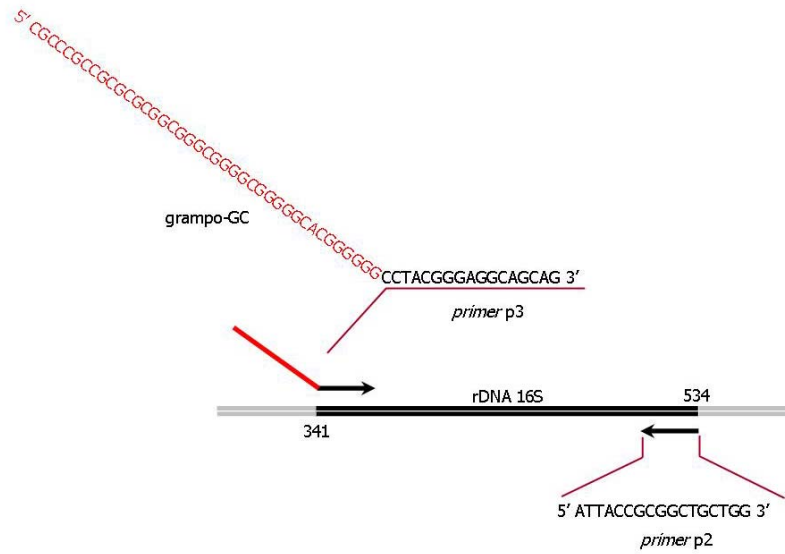


Figura 4: Diagrama esquemático da região do rDNA 16S amplificada por PCR para avaliação das possíveis diferenças nos dois métodos de desinfestação confrontados.

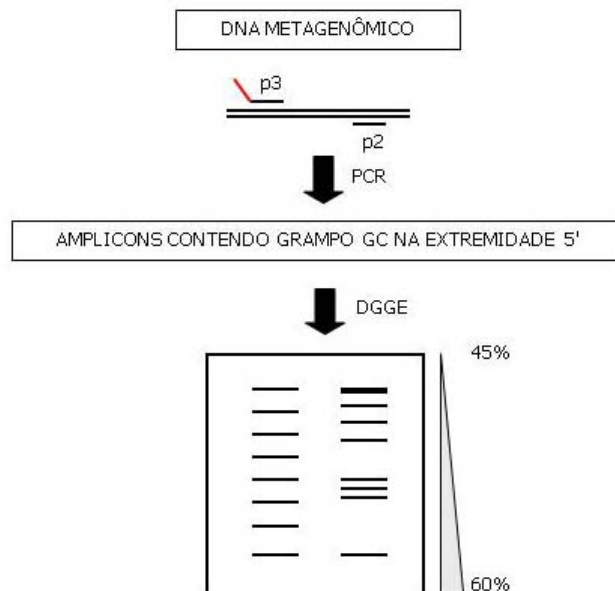


Figura 5: Diagrama esquemático da técnica de PCR-DGGE utilizada para avaliação das possíveis diferenças nos dois métodos de desinfestação confrontados.

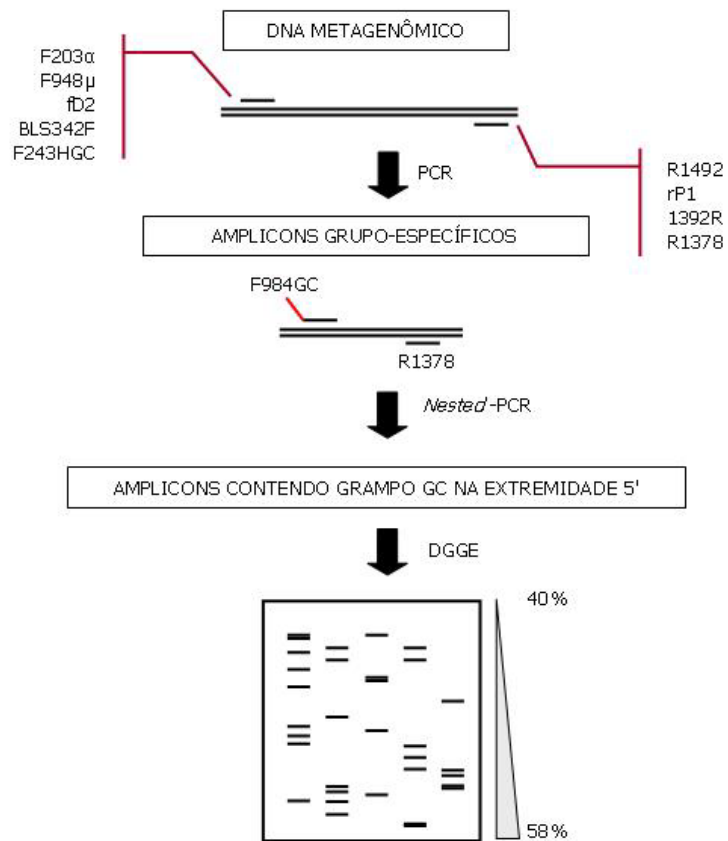


Figura 6: Diagrama esquemático da técnica de *Nested-PCR* utilizada para análise prévia da diversidade de Eubacteria em frutos de café (*Coffea arabica* L.) por PCR-DGGE.

### 2.2.5.1.2. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad – Califórnia USA).

Foram aplicados 20µL dos produtos de PCR, juntamente com 20µL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 70% e TAE 1X), em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X, para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb, ou 6% (p/v) para os de 300 pb a 1.000 pb. O gradiente desnaturante variou linearmente de 45% a 60% para a análise dos fragmentos de menor tamanho e de 40% a 58% para os de tamanho maior.

O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8% ou 6%, dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 Gradient Delivery System – BIO-Rad Califórnia, USA), uma com 100 % dos agentes desnaturantes, que corresponde a uréia 7 M e formamida desionizada 40% (v/v), e outra sem esses agentes. Além das soluções-estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio [polimerizador], 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletileno diamino) [catalisador] e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel, antes da aplicação das amostras, foi de 3 horas.

Uma mistura de fragmentos de rDNA 16S das seguintes espécies bacterianas foram utilizadas como marcadores específicos para os diferentes filios: *Alcaligenes xylosoxydans* ATCC 13138, *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 23858, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Pseudomonas putida* ATCC 15176 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12692.

A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60°C e voltagem constante de 50V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagen).

A análise dos perfis de banda dos géis obtidos após a DGGE para determinação prévia da diversidade genética foi realizada utilizando as imagens obtidas pelo sistema de digitalização, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser®

3.1 (Media Cybernetics Inc., Maryland - USA). Os ajustes básicos feitos no programa foram os seguintes:

- largura da raia: 10 pixels;
- altura mínima de banda: 1%;
- separação mínima de bandas: 0,5% Rf
- raias retilíneas;
- correção de "Background": nenhuma;
- raias contendo padrão: nenhuma;

Os ajustes feitos, de modo interativo, foram os que propiciaram a maior concordância entre as bandas detectadas pelo programa e as bandas detectadas visualmente. Obtidos os valores para os ajustes referidos, nos poucos casos em que as bandas detectadas pelo programa não correspondiam àquelas detectadas visualmente, utilizou-se do recurso do programa para adição ou exclusão manual de bandas.

Após identificação visual e detecção pelo programa, as bandas dominantes de cada um dos grupos específicos evidenciados foram excisadas do gel de DGGE com o auxílio de um bisturi cirúrgico e as porções excisadas foram individualmente colocadas em 20  $\mu$ L de água desionizada (Milli Q) esterilizada e armazenadas, por 24 horas, a 4 °C para eluição do DNA. Subsequentemente, o DNA contido na água de eluição foi utilizado como molde para re-amplificação, conforme previamente descrito para o segundo ciclo de amplificação do método de *Nested-PCR*. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos novamente a DGGE para confirmação da pureza e da posição relativa em comparação às bandas a partir das quais elas foram originalmente excisadas.

Os produtos da re-amplificação foram purificados com uso do kit ExoSAP-IT<sup>®</sup>, de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **2.2.5.2. Seqüenciamento dos fragmentos dos rDNAs 16S re-amplificados e purificados**

As reações de seqüenciamento foram realizadas no Laboratório de Clonagem e Seqüenciamento de DNA da UFV com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados em cada uma das reações 75 ng a 100 ng de DNA, 0,5  $\mu$ M do oligonucleotídeo iniciador R1378, 2,0  $\mu$ L de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pre-Mix para um volume final de 5  $\mu$ L. As condições da PCR foram 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5

segundos e 60°C por 2 minutos. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 µL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 minutos em temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 minutos a 2.000 g. O DNA sedimentado foi lavado com 100 µL de etanol 70%, centrifugadas por 10 minutos a 2.000 g e armazenado em temperatura ambiente por 10 minutos para secar. Posteriormente, o DNA foi ressuspensionado em 5 µL de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em seqüenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

### **2.2.5.3. Análise comparativa das seqüências dos rDNAs 16S da comunidade bacteriana associada aos frutos de café**

Todas as seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). Para cada gene foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1990). Múltiplas seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW, e analisadas filogeneticamente com reconstrução de árvores filogenéticas pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o método de distância p com auxílio do programa MEGA 4.0® (TAMURA et al., 2007), para esclarecer o padrão filogenético dos grupos dominantes.



## **2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1. Avaliação do processo de desinfestação superficial de frutos de café**

O protocolo para a desinfestação superficial dos frutos de café utilizado neste estudo mostrou-se eficaz para ser utilizado no estudo de bactérias endofíticas, cultiváveis e não-cultiváveis. Isso foi comprovado pela constatação da ausência de crescimento microbiano em meio R2A inoculado com a última água de lavagem dos frutos e, também, no meio de cultura em que os frutos desinfestados superficialmente permaneceram incubados por 72 horas a 28°C. Apenas os frutos com comprovada ausência de crescimento microbiano foram utilizados para a extração do DNA total de bactérias endofíticas totais. A presença de bactérias endofíticas cultiváveis foi confirmada por métodos culturais em meio R2A (dados não mostrados).

A escolha da amostra de Catuaí Vermelho para o estudo foi baseada em estudos prévios de determinação de densidade populacional de bactérias endofíticas isoladas de frutos das cultivares Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho obtidos de áreas georeferenciadas de diferentes altitudes de propriedades produtoras localizadas na Zona da Mata Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil (CORDERO, 2008). Nesse trabalho, foi demonstrado que os valores de densidade populacional de bactérias endofíticas em frutos de café diferem ( $p < 0,05$ ) entre cultivares e também quanto à altitude em que se situam. Concluiu-se a partir desse estudo que, quanto maior a altitude, maior a densidade de endofíticos para Catuaí Vermelho (1.187 metros) e para Bourbon

Vermelho (1.101 metros), enquanto nas altitudes inferiores a 1.000 metros, os valores para essas mesmas cultivares são consistentemente ( $p < 0,05$ ) menores. A densidade de bactérias totais em frutos de Catuaí Vermelho, que incluem as epifíticas e endofíticas, situou-se em torno de  $6,0 \times 10^6$  UFC fruto<sup>-1</sup> (CORDERO, 2008), valor considerado expressivo mesmo quando comparado ao de bactérias endofíticas indígenas em tecido da maioria das espécies vegetais, em torno de  $10^3$  a  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de tecido fresco (HALLMANN et al., 1997).

Os resultados dos dois protocolos de desinfestação superficial adotados (Figura 7) mostram, pelos perfis genéticos resultantes da DGGE, que os processos de desinfestação apresentaram eficiência similar, tanto por observação direta do gel como pelas análises de imagem obtidas com o programa Gel Pro Analyser® 3.1. Considerando que o DNA proveniente da microbiota epifítica não estaria contaminando o *pool* de DNA metagenômico de interesse, a opção foi a de se utilizar o protocolo de desinfestação mais simples; ou seja, aquele em que não há a etapa de incubação do fruto na presença de lisozima.

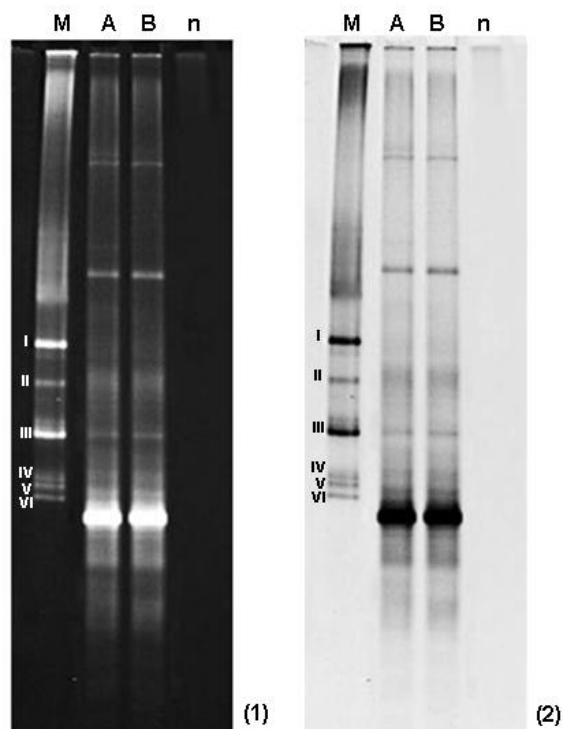


Figura 7: Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas, presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.), obtido após amplificação utilizando *primers* universais para Eubacteria (1). A: Processo de desinfestação sem a etapa de adição de lisozima; B: Processo de desinfestação em que houve a etapa de adição de lisozima; n: Branco da reação de PCR; M: Marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias-padrão (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692; (II) (III) e (V) *Escherichia coli* ATCC 29922; (IV) e (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Imagem de cores invertida (2)

### 2.3.2. Análise da diversidade de bactérias endofíticas totais por PCR-DGGE

A amostra de DNA total extraída de bactérias presentes em frutos de café com a utilização de protocolo (FUNGARO et al., 2004) modificado no LEM mostrou-se com qualidade adequada para as análises do DNA das populações dos diferentes grupos de bactérias endofíticas.

A contaminação com polissacarídeos e polifenóis é um problema comum do processo de extração de DNA de amostras vegetais em geral, especialmente quando estocadas extensivamente a 0°C (MANNING, 1991; DEMEKE & ADAMS, 1992), e pode interferir negativamente nos procedimentos e nas análises posteriores. Além disso, os compostos orgânicos presentes nos frutos de café e alguns dos reagentes do tampão de extração de DNA, como SDS e CTAB, ou os sais e solventes orgânicos utilizados no processo de extração, possivelmente formam complexos com proteínas e interferem, inibindo ou diminuindo, na eficiência da reação de PCR ao estabelecer interações com a DNA polimerase. Contudo, as alterações no procedimento de extração de DNA total de bactérias endofíticas asseguraram a obtenção de DNA com a qualidade desejável para utilização em PCR.

As condições sob as quais foram realizadas as reações de PCR foram satisfatórias para as análises em DGGE, não havendo, aparentemente, amplificação de bandas inespecíficas ou formação de produtos quiméricos. A técnica utilizada envolve a realização de duas reações de amplificação.

O produto da primeira reação de PCR, utilizada para amplificar fragmentos específicos dos rDNAs 16S de  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria e Actinobacteria, não foi detectado visualmente em gel de agarose (Figura 8), mas, ainda assim, o produto obtido nesta primeira reação foi utilizado para uma segunda etapa de amplificação a partir de *primers* universais para Eubacteria.

O produto da primeira reação utilizada para amplificação de fragmentos específicos do rDNA 16S de  $\gamma$ -Proteobacteria e Firmicutes resultaram em amplicons de tamanhos compatíveis com os esperados. A primeira reação de amplificação de fragmentos específicos do rDNA 16S de Firmicutes resultou em amplicons numa concentração bem inferior à do controle positivo utilizado (Figura 8).

A técnica de PCR utilizada não é quantitativa, mas, pelos resultados, infere-se que as populações dominantes são de  $\gamma$ -Proteobacteria e Firmicutes.

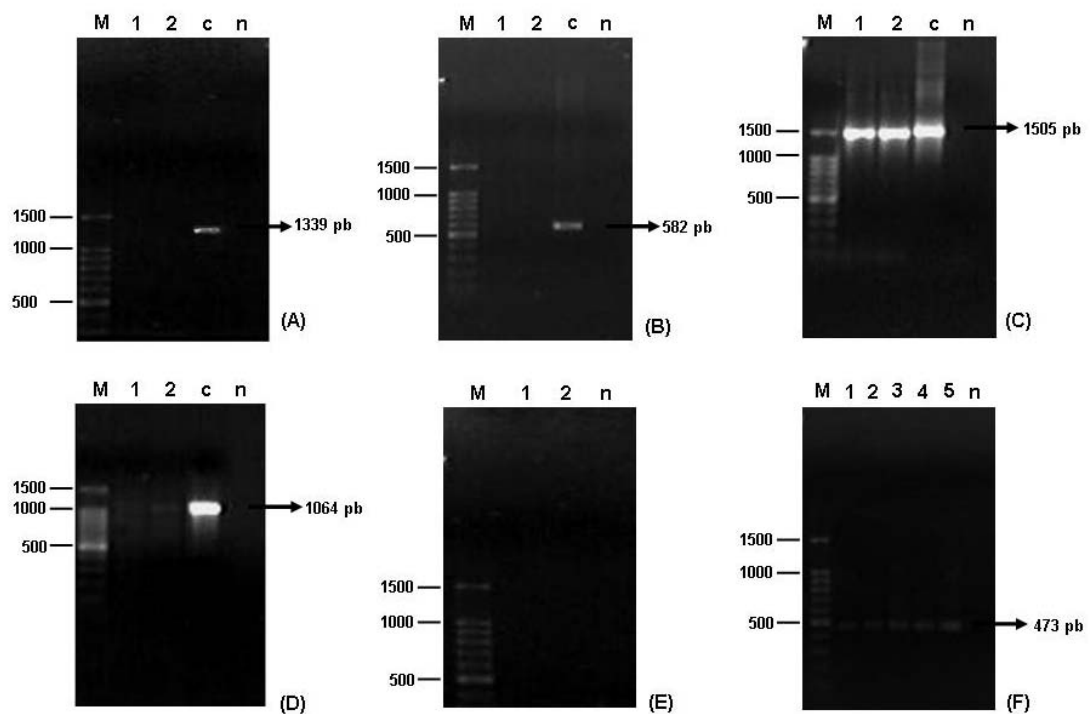


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto de amplificação por PCR, utilizando *primers* específicos, dos fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.) pertencentes a  $\alpha$ -Proteobacteria (A),  $\beta$ -Proteobacteria (B),  $\gamma$ -Proteobacteria (C), Firmicutes (D) e Actinobacteria (E). 1: Produtos de amplificações a partir de amostras de DNA extraído de frutos de café, 2: Repetição. Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto da segunda etapa de amplificação por PCR, utilizando *primers* universais (*Nested-PCR*), dos fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.) pertencentes a  $\alpha$ -Proteobacteria (1),  $\beta$ -Proteobacteria (2),  $\gamma$ -Proteobacteria (3), Firmicutes (4) e Actinobacteria (5). M: 100 pb DNA Ladder, n: Branco da reação de PCR.

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou a existência de um variado perfil de diversidade genética na amostra de DNA (Figura 9), com a existência de pelo menos 2 UTOs para cada um dos grupos analisados. A comprovação da origem microbiana da seqüência requer a confirmação por meio de seqüenciamento das bandas correspondentes do gel.

Todos os fragmentos de DNA evidenciados no gel apresentam o mesmo tamanho, em pares de bases, mas diferem quanto à seqüência de bases. Quanto maior o conteúdo G+C presente na seqüência, maior é a mobilidade eletroforética da banda, considerando o gradiente desnaturante formado ao longo do gel de DGGE. A intensidade de cada banda capturada na imagem do gel de DGGE corresponde a D.O. (em pixels) máxima, e está diretamente relacionada com a abundância relativa da UTO que representa (Tabela 2). O corante utilizado para visualização das bandas no gel de DGGE, SYBR<sup>®</sup> Gold (Invitrogen), permitiu a observação de fragmentos de DNA menos dominantes.

O resultado observado no perfil eletroforético em DGGE (Figuras 9 e 10) quando comparado com o obtido de frutos da mesma cultivar e localidade (CORDERO, 2008), não apenas complementa o resultado desse autor como também comprova que o período de estocagem, 2005 a 2008, e o modo de conservação das amostras, selagem a vácuo e congelamento a -20°C, não interferiram no perfil genético observável da comunidade de bactérias endofíticas.

A análise da imagem do gel de DGGE no programa Gel Pro Analyser<sup>®</sup> 3.1 revelou nos perfís genotípicos a presença de 2 UTOs referentes à  $\alpha$ -Proteobacteria, 16 UTOs à  $\beta$ -Proteobacteria e 13 UTOs à classe  $\gamma$ -Proteobacteria, além de 20 UTOs referentes ao filo Firmicutes e 2 UTOs referentes ao filo Actinobacteria. As UTOs correspondentes a  $\alpha$ -Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria foram numericamente equivalentes às detectadas visualmente no gel (Tabela 3).

A diversidade de bactérias endofíticas totais avaliada com a utilização da PCR-DGGE por meio da amplificação dos rDNA 16S a partir de *primers* universais F984GC/R1378 (Figura 10) não revelou o real perfil da diversidade genética bacteriana existente nos frutos de café, como se concluiu pela comparação com o obtido por amplificação a partir de *primers* específicos na etapa de *Nested*-PCR (Figura 9). Esse resultado mostra a necessidade e a importância da utilização de duas etapas de amplificação consecutivas com *primers* específicos e universais para esclarecer a real diversidade genética no sistema em estudo.

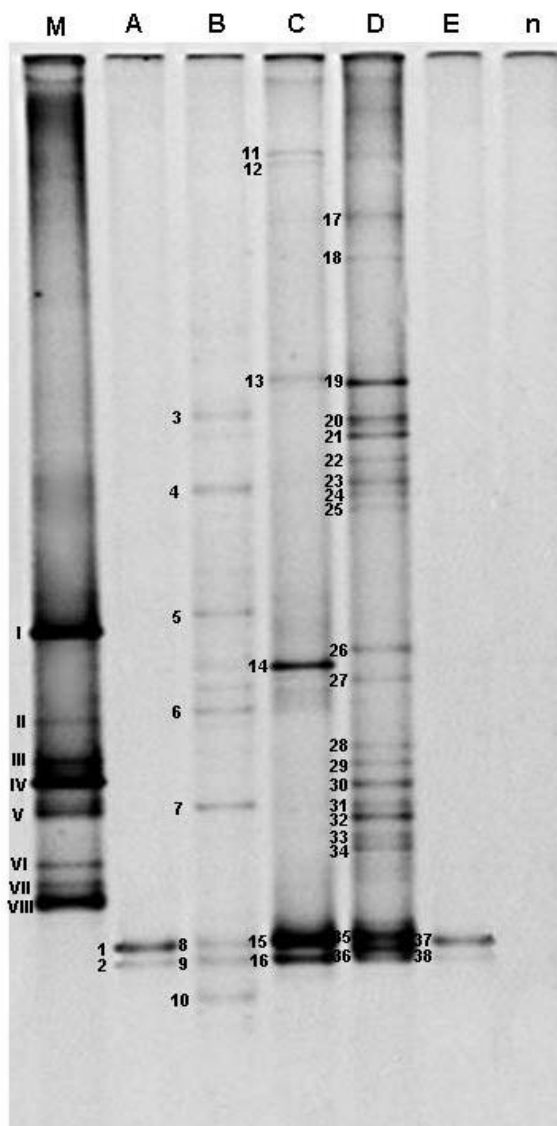


Figura 9: Perfil eletroforético em DDGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.), obtido após amplificação enzimática utilizado *primers* específicos para diferentes filós de Eubacteria e *primers* universais para Eubacteria, pela técnica de *Nested-PCR*. A:  $\alpha$ -Proteobacteria; B:  $\beta$ -Proteobacteria; C:  $\gamma$ -Proteobacteria; D: Firmicutes; E: Actinobacteria; n: Branco da reação de PCR; M: Marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias-padrão (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692; (II) (III) e (V) *Escherichia coli* ATCC 29922; (IV) e (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; (VII) *Pseudomonas putida* ATCC 15176; (VIII) *Bacillus subtilis* ATCC 23858.

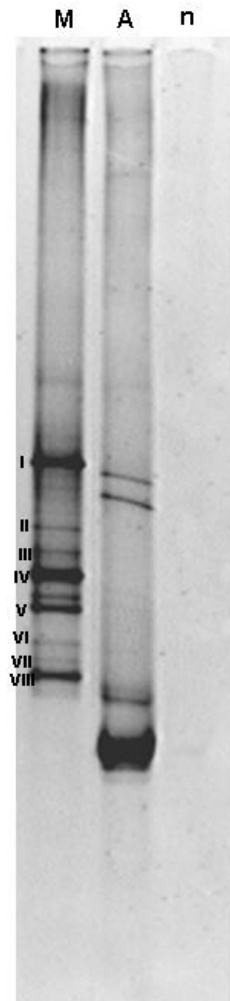


Figura 10: Perfil eletroforético em DDGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias endofíticas presentes em frutos de café (*Coffea arabica* L.), obtido após amplificação enzimática utilizado *primers* universais para Eubacteria. A: Eubacteria; n: Branco da reação de PCR; M: Marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias-padrão (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692; (II) (III) e (V) *Escherichia coli* ATCC 29922; (IV) e (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; (VII) *Pseudomonas putida* ATCC 15176; (VIII) *Bacillus subtilis* ATCC 23858.



Tabela 2: Abundância das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), correspondentes aos diferentes grupos, em gel de DGGE.

UTO	Filos de Eubacteria				
	$\alpha$ -Proteobacteria	$\beta$ -Proteobacteria	$\gamma$ -Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria
<b>Abundância [Densidade óptica (pixels<sup>2</sup>)]</b>					
1	12.362				
2	11.860				
3		11.625			
4		9.955			
5		6.851			
6		13.424			
7		8.104			
8		7.676			
9		6.489			
10		8.014			
11			5.067		
12			8.450		
13			9.006		
14			22.177		
15			32.779		
16			15.253		
17				13.174	
18				25.320	
19				8.768	
20				15.981	
21				16.083	
22				17.963	
23				8.597	
24				6.928	
25				12.703	
26				10.808	
27				17.479	
28				26.401	
29				9.483	
30				33.410	
31				13.830	
32				9.145	
33				16.158	
34				15.728	
35				10.098	
36				12.942	
37					9.939
38					8.074
<b>SOMA</b>	<b>24.222</b>	<b>72.138</b>	<b>92.732</b>	<b>3,01E+05</b>	<b>18.013</b>

Tabela 3: Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), correspondentes aos diferentes filos de Eubacteria estudados, observada em gel de DGGE.

Número de UTOS visualizadas no gel de DGGE para cada um dos filos de Eubacteria estudados		
	Detecção com auxílio do programa Gel Pro Analyser <sup>®</sup> 3.1	Detecção visual <sup>A</sup>
$\alpha$ -Proteobacteria	2	2
$\beta$ -Proteobacteria	16	8
$\gamma$ -Proteobacteria	13	6
Firmicutes	20	20
Actinobacteria	2	2

<sup>A</sup> Corresponde ao número de bandas que foram purificadas do gel de DGGE para re-amplificação por PCR e seqüenciamento.

A detecção visual foi o critério utilizado para enumeração das bandas (Figura 9) e purificação, a partir do gel de DGGE, para uso na re-amplificação e seqüenciamento.

### 2.3.3. Filogenia de bactérias endofíticas presentes em frutos de café

Todas as UTOS visualizadas em gel de DGGE e purificadas foram re-amplificadas. A pureza e a posição relativa de cada um dos amplicons foram confirmadas por DGGE (dados não mostrados) antes do seqüenciamento.

Do total de 38 bandas purificadas a partir do gel de DGGE, foi possível seqüenciar 22. Dessas, 10 bandas, correspondentes aos números 1, 2, 8, 9, 15, 16, 35, 36, 37 e 38, mostraram alta identidade (98%) com seqüências de rDNA 16S de cloroplasto de *C. arabica* L. (EF044213) e, embora também apresentassem alta identidade com grupos de bactérias não cultiváveis, não foram utilizadas para as análises. Esse resultado mostra que, embora os *primers* utilizados fossem específicos para os grupos individuais, há uma limitação associada à amplificação de rDNAs 16S de cloroplasto. A recomendação é a de que, futuramente, outros conjuntos de *primers* específicos ou universais sejam construídos para minimizar a interferência do DNA de origem vegetal. Adicionalmente, deve-se procurar um

protocolo que possibilite o fracionamento seletivo das diferentes fontes de DNA dos frutos para separar bactérias.

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia com as seqüências obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE agrupou todas as bandas de acordo com o filo e classes aos quais elas pertencem, considerando a especificidade dos *primers* utilizados (Figura 11). Esse resultado foi interpretado como uma garantia de que as seqüências apresentaram a qualidade mínima adequada para serem utilizadas na análise filogenética.

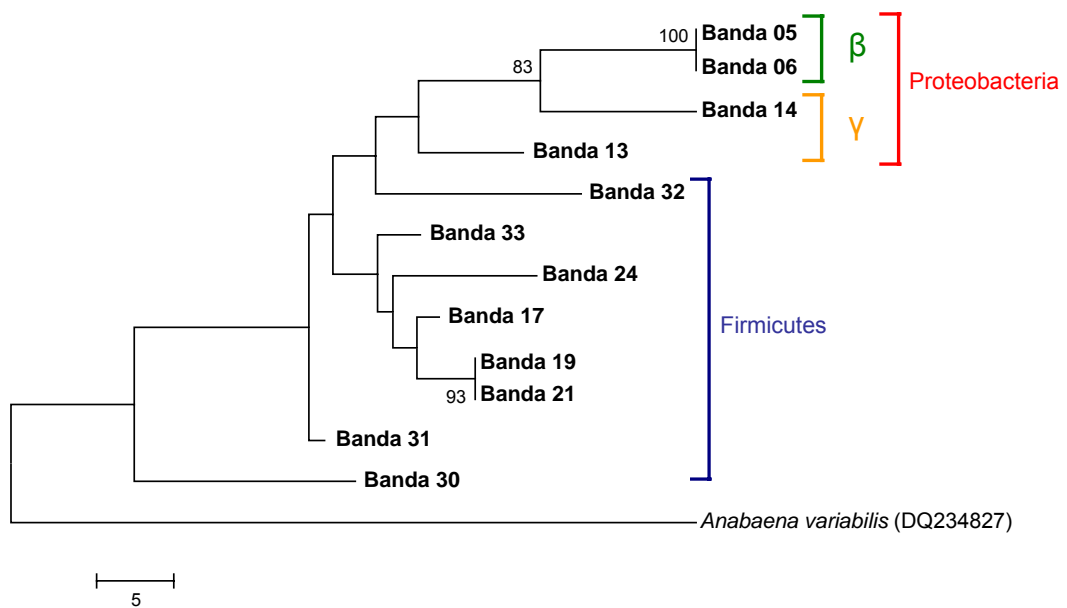


Figura 11: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética das seqüências dos genes rDNA 16S obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Anabaena variabilis* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. O número indicado entre parênteses refere-se ao número de acessos no banco de dados GenBank.

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia com as seqüências dos genes rDNA 16S pertencentes à classe  $\beta$ -Proteobacteria obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE agrupou as seqüências referentes às Bandas 05 e 06 no mesmo ramo e não mostrou diferença entre as mesmas (Figura 12). Elas foram definidas como um grupo irmão das bactérias não-cultiváveis EF050123 e DQ532154.

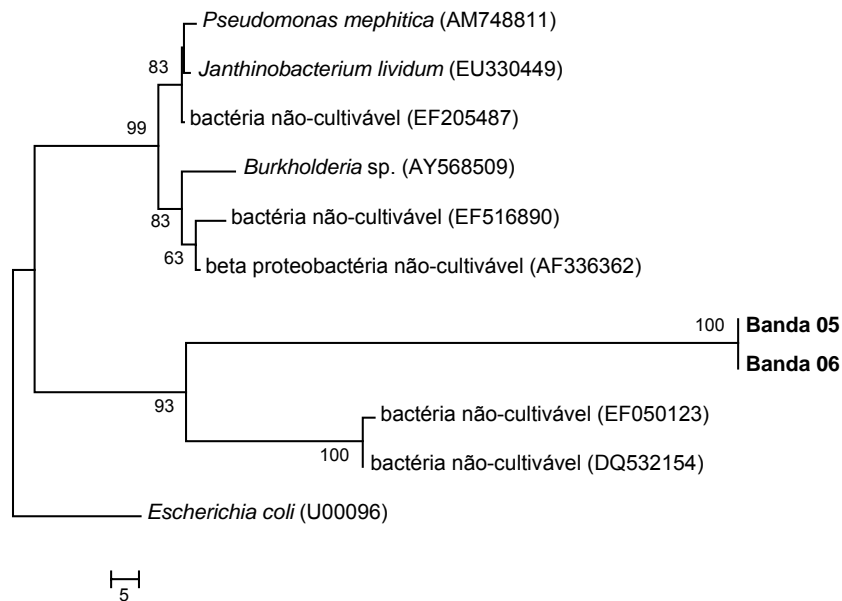


Figura 12: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de  $\beta$ -Proteobacteria. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0®. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank.

O fato de duas bandas originalmente posicionadas em locais diferentes no gel de DGGE apresentarem a alta identidade verificada no alinhamento entre as Bandas 05 e 06 (dados não mostrados) e estarem agrupadas da forma como mostrado na reconstrução filogenética (Figura 12) foi atribuído a possível existência de polimorfismo em múltiplos operons *rrn* da espécie. Estudos sobre diversidade mostram que em um gel de DGGE bandas distintas podem não corresponder a diferentes espécies bacterianas, uma vez que uma espécie pode conter múltiplos operons *rrn* que apresentam polimorfismo, resultante de microheterogeneidade nesses operons (NÜBEL et al., 1999; VALLAEYS et al., 1997; KIRK et al., 2004).

Das seqüências pertencentes às bactérias endofíticas cultiváveis representadas na árvore, a que mostrou maior identidade (99%) com as Bandas 05 e 06 foi a correspondente a *Burkholderia* sp. (AY568509). O gênero *Burkholderia* compreende 19 diferentes espécies, que incluem bactérias do solo e da rizosfera, bem como patógenos de humanos e plantas (VANDAMME et al., 1997; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001). Muitas espécies desse gênero são também importantes agentes de biocontrole, fixadores biológicos de nitrogênio e têm a capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana e de degradar pesticidas (DAUBARAS et al., 1996; BEVIVINO et al., 1998; CHIARINI et al., 1998; PERIN et al., 2006). A presença de *Burkholderia* endofíticas em frutos de café originários da Colômbia já foi relatada, a exemplo de *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. glathei* e *B. pyrrocinia* (VEGA et al., 2005).

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia com as seqüências dos genes rDNA 16S pertencentes à classe  $\gamma$ -Proteobacteria obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE agrupou a seqüência de *Klebsiela oxytoca* (AJ871856) e da Banda 13 no mesmo ramo, pertencentes ao clado da Banda 14 (Figura 13). A seqüência referente à Banda 13 mostrou identidade de 98% com a de *K. oxytoca* (AJ871856).

*Klebsiela oxytoca* também já foi isolada de frutos de café sadios, caracterizada com relação ao crescimento em meio mínimo adicionado de pectina cítrica e teve demonstrada a produção de pectato-liase intracelular. As características do crescimento e a síntese induzida da pectinase são características funcionais que possivelmente contribuem para os processos metabólicos que resultam em compostos precursores de café com qualidade superior. Embora produtora de pectato-liase, a bactéria deve apresentar algum mecanismo regulatório para controlar a síntese e a atividade da enzima, já que não causa danos visíveis à planta (GENARI, 1999; SAKIYAMA, 2001).

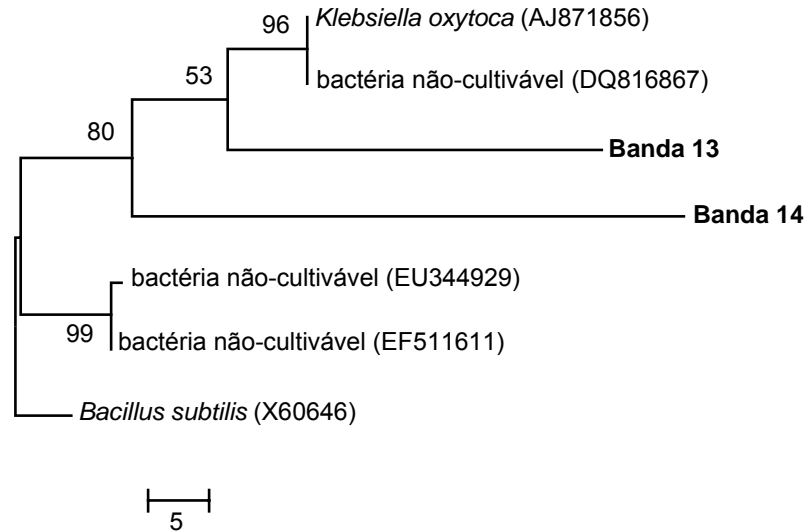


Figura 13: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de  $\gamma$ -Proteobacteria. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Bacillus subtilis* foi utilizado como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank.

Espécies de *Klebsiela* endofíticas já foram isoladas de *C. arabica* L. originários da Colômbia, a exemplo de *K. planticola*, *K. pneumoniae*, *K. trevisanii* (VEGA et al., 2005). *Klebsiela pneumoniae* também já foi encontrada como endofítica em milho (CHELIUS & TRIPLETT, 2000) e, quando inoculada na rizosfera de *Arabidopsis* e trigo, mostrou altos níveis de colonização e capacidade de promover crescimento (DONG et al., 2003).

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia com as seqüências dos genes rDNA 16S pertencentes ao filo Firmicutes obtidas a partir

de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE agrupou a seqüência de uma bactéria de solo (AF083571) e da Banda 31 no mesmo ramo e como pertencentes ao clado da Banda 17 (Figura 14). A seqüência referente a esta bactéria é originária de um estudo não publicado que contrasta microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis de solos amazônicos.

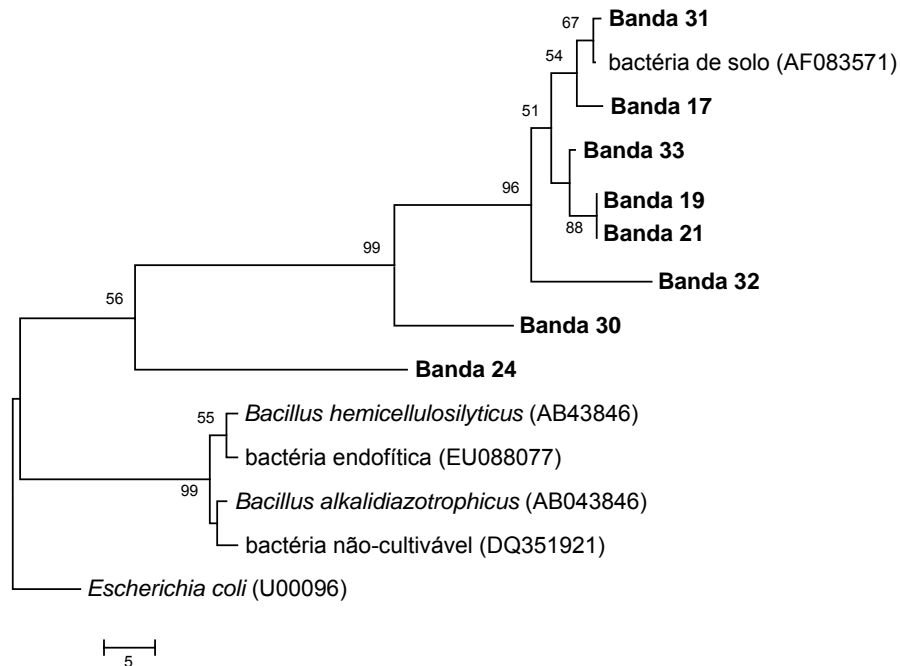


Figura 14: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de Firmicutes. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de fragmentos de DNA purificados do gel de DGGE. *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank.

De acordo com a análise, em um clado se agrupam as seqüências das Bandas 17 e 31 e, no outro, as seqüências das Bandas 33, 19 e 21 (Figura 14). As seqüências referentes às Bandas 19 e 21 foram agrupadas no mesmo ramo e não mostraram diferença entre si pelo alinhamento (dados não mostrados). Todas as seqüências referentes às bandas purificadas do gel de DGGE são apresentadas como sendo um grupo irmão de *Bacillus*. Nesse gênero incluem-se isolados de endofíticas do café, a exemplo de *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. cereus* (VEGA et al., 2005).

A diversidade observada em DGGE é um indicativo da possível composição e complexidade das populações endofíticas presentes nos frutos de café. Contudo, faz-se necessário ressaltar que a resolução dos perfis genotípicos obtidos em DGGE, em termos de número de UTOs no gel, nem sempre é suficiente para ilustrar a real diversidade microbiana mesmo sendo a técnica de PCR-DGGE incluída entre as mais indicadas para estudos de ecologia ou *fingerprinting* de populações microbianas.



## 2.4. CONCLUSÕES

As populações de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café apresentam variado perfil genotípico, como demonstrado na análise por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).

A presença de bactérias endofíticas pertencentes ao gênero *Burkholderia* e à espécie *Klebsiela oxytoca* é inferida com base no alinhamento e nas análises filogenéticas das seqüências nucleotídicas.

O maior conhecimento da diversidade genética e funcional de microrganismos que, possivelmente, contribuam para as características sensoriais da bebida do café deverá ser obtido por estudos de metagenômica, para determinação do microbioma dos frutos de café.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410. 1990.
- AMANN, R.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p.143-169. 1995.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J.D. van; VUURDE, J.W.L. van; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914. 2002.
- BLACKWOOD, C.B.; OAKS, A.; BUYER, J.S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6193-6198. 2005.
- BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: Effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v.27, p.225-237. 1998.
- BROSIUS, J., DULL, T.J., SLEETER, D.D., NOLLER, H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v.148, p.107-127. 1981.
- BUNGE, M.; LECHNER, U. Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from river sediments: Diversity of the dehalogenating community. **Anaerobic Dehalogenation**, p.69-81. 2001.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.183-187. 2000.

- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on Sorghum bicolor: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.81-87. 1998.
- COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, 5113-5121. 2001.
- CORDERO, F.P.C. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café**. 2008. 89f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.213-217. 2002.
- DAUBARAS, D. L.; DANGANAN, C. E.; HÜBNER, A., YE, R. W.; HENDRICKSON, W.; CHAKRABARTY, A. M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: Evolutionary insight. **Gene**, v.179, p.1-8. 1996.
- DEMEKE, T; ADAMS, R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. **Biotechniques**, v. 12, p.332-334. 1992.
- DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4008. 1991.
- DONG, Y.; INIGUEZ, L.A.; TRIPLETT, E.W. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Plant and Soil**, v.257, p.49-59. 2003.
- ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MOSCHETTI, G.; COPPOLA, S. Evaluation of PCR-DGGE analysis for molecular typing of cheeses. **Annals of Microbiology**, v.52, p. 81-87. 2002.
- ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.297-314. 2004.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 2790-2798. 2001.
- FUNGARO, M.H.P.; VISSOTTO, P.C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; FURLANETO, M.C.; TANIWAKI, M.H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v.49, p.123-127. 2004.
- FISHER, S.G.; LERMAN, L.S. DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.80, p.1579-1583. 1983.

- GARBEVA, P.; OVERBEEK, L.S. van; VUURDE, J.W.L. van; ELSAS, J.D. van. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v.41, p.369-383. 2001.
- GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.91-102. 2006.
- GENARI, R. **Características de crescimento e produção de pectinases por Klebsiella oxytoca isolada de frutos de café**. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GOMES, N.C.; HEUR, H.; SCHOLFED, J.; COSTA, R.; MENDOÇA-HANGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Plant and Soil**, v.232, p.167-180. 2001.
- GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v.345, p.60-63. 1990.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914. 1997.
- HARUTA, S.; UENO, S.; EGAWA, I.; HASHIGUCHI, K.; FUJII, A.; NAGANO, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p.79-87. 2006.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, p.1-21. 1998.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 3233-3241, 1997.
- HORI, T.; HARUTA, S.; UENO, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Direct comparison of Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p.165-169. 2006.
- KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.169-188. 2004.
- LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M-A.; ROSA, C.A. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentation during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.213-219. 2005.

- LI, M.; WANG, B.; ZHANG, M.; RANTALAINEN, M.; WANG, S.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; SHEN, J.; PANG, X.; ZHANG, M.; WEI, H.; CHEN, Y.; LU, H.; ZUO, J.; SU, M.; QIU, Y.; JIA, W.; XIAO, C.; SMITH, L.M.; YANG, S.; HOLMES, E.; TANG, H.; ZHAO, G.; NICHOLSON, J.K.; LI, L.; ZHAO, L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.2117-2122. 2008.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Review**, v.15, p155-173. 1994.
- MANNING, K. Isolation nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, v.195, p.45-50. 1991.
- MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. **Yeast**, v.21, p.549-556. 2004.
- MEROTH, C.B.; HAMMES, W.P.; HERTEL, C. Identification and population dynamics of yeast in sourdough fermentation processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.7453-7461. 2003.
- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700. 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Eletrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141. 1998.
- MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GCclamp can be detected by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-3145. 1985a.
- MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; MANIATIS, T.; LERMAN, L. S. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3111-3129. 1985b.
- NIELSEN, D.S.; HØNHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis (DGGE). **Yeast**, v.22, p.271-284. 2005.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KÜHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: Morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.422-430. 1999.
- ØVREÅS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities, **Microbial Ecology**, v. 36, p.303-315. 1998.

- ØVREÅS, L.; JENSEN, S.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Microbial community changes in perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches, **Applied and Environmental Microbiology**, v.64 p.2739-2742. 1998.
- PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.3103-3110. 2006.
- RANJARD, L., POLY, F., NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. **Research in Microbiology**, v.151, p.167-177. 2000.
- REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.1-7. 1985.
- ROESELERS, G.; NORRIS, T.B.; CASTENHOLZ, R.W.; RYSGAARD, S.; GLUD, R.N.; KÜHL, M.; MUYZER, G. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). **Environmental Microbiology**, v.9, p.26-38. 2007.
- SAKIYAMA, C.C.H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001. 72f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. Paginação irregular.
- SANTOS, T.M.A. **Diversidade e sucessão de microrganismos durante a seca natural do café**. 2006. 58f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas - Microbiologia) - Universidade federal de Viçosa, Viçosa.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p.23-32. 2002.
- SPANO, G.; LONVAUD-FUNEL, A.; MASSA, S. In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. **Current Microbiology**, v.54, p.9-13. 2007.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599. 2007.
- VALLAEYS, T., TOPP, E., MUYZER, G. Evaluation of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, v.24, p.279-285. 1997.
- VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.;

- GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.1188-1200. 1997.
- VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L.. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p.371-380. 2005.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v.345, p.63-65. 1990.
- WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J.. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703. 1991.
- ZHANG, M.; LIU, B.; ZHANG, Y.; WEI, H.; LEI, Y.; ZHAO, L. Structural shifts of mucosa-associated lactobacilli and *Clostridium leptum* subgroup in patients with ulcerative colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.496-500. 2007.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE CLONES rDNA 16S DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**



## RESUMO

A complexidade da microbiota epifítica e endofítica presente nos grãos de café (*Coffea arabica* L.) e o limitado conhecimento dos microrganismos envolvidos nas diferentes etapas do processamento dos frutos dificultam a avaliação conclusiva dos fatores que interferem com a qualidade da bebida do café. A diversidade bacteriana em frutos de café da Zona da Mata Norte de Minas Gerais, Brasil foi analisada pela construção de uma biblioteca de rDNAs 16S. Ela foi obtida pela clonagem de fragmentos dos rDNAs 16S amplificados a partir de oligonucleotídeos iniciadores específicos e DNA metagenômico extraído diretamente dos frutos de café, como molde. Um total de 50 clones positivos da biblioteca de rDNAs 16S de  $\gamma$ -Proteobacteria endofíticas e 25 clones positivos da biblioteca de rDNAs 16S de Firmicutes endofíticas foram parcialmente seqüenciados e identificados. O resultado da análise das seqüências mostrou 3 gêneros de Firmicutes na biblioteca de rDNAs 16S, sendo que 60% corresponderam ao gênero *Bacillus*, 8% ao gênero *Staphylococcus* e 4% ao gênero *Paenibacillus*. Os testes conduzidos mostraram que a biblioteca foi representativa e suficiente para refletir a diversidade de Firmicutes endofíticos de frutos de café. A seqüência única detectada na amostra aproxima-se do número total de seqüências únicas dentro desta biblioteca. O alinhamento das seqüências obtidas mostrou que 44% das seqüências contidas na biblioteca apresentam 96% de identidade com seqüências de *Bacillus firmus*, 16% apresentam 98% de identidade com seqüências de *Bacillus cereus*, 8% apresentam 98% de identidade com seqüências de *Staphylococcus epidermidis*, e 4% apresentam 100% de identidade com seqüências de *Paenibacillus* sp.. As seqüências contidas na biblioteca de rDNAs 16S de

representantes do filo Firmicutes foram utilizadas para análise comparativa com seqüências disponíveis no banco de dados GenBank por meio do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*). Árvore filogenética reconstruída pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup> mostrou o padrão filogenético dos grupos dominantes de ocorrência na biblioteca. Estudos mais aprofundados de genética comparativa e funcional, assim como estudos de ecologia microbiana em frutos de café, devem ser realizados utilizando-se uma abordagem metagenômica para a determinação do microbioma de frutos do café. Estudar o *pool* de genes, assim como a funcionalidade microbiana em frutos de café (*C. arabica* L.), pode auxiliar no conhecimento da complexidade de microrganismos associados aos frutos e fornecer evidências da participação destes microrganismos na produção de compostos possivelmente envolvidos na interconversão de metabólitos precursores daqueles sensoriais que conferem qualidade à bebida. Além disso, essa abordagem pode auxiliar no entendimento dos princípios fisiológicos e genéticos envolvidos nas relações microrganismo-hospedeiro e microrganismo-microrganismo.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as estimativas são de que menos de 1% dos microrganismos existentes tenham sido descritos e caracterizados (TORSVIK et al., 1990; AMANN et al., 1995). Assim, o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se focos importantes da era biotecnológica ao descortinar novas formas de utilização desses microrganismos em áreas como a de alimentos, saúde, meio ambiente e indústria. Frente à vasta diversidade representada pelos microrganismos ainda não cultivados, e às limitações de cultivo e manipulação, torna-se premente a adoção de novas estratégias para a exploração plena e preservação desses recursos (LORENZ & ECK, 2005; STEELE & STREIT, 2005; SCHMEISSER et al., 2007).

O entendimento da conexão entre os genes microbianos e o ambiente implica no repensar dos sistemas água, solos, seres vivos e atmosfera, a partir de dados sobre comunidades microbianas não cultiváveis, da quantificação da expressão e atividade de genes; e da identificação de microrganismos em nível de espécies. Esses dados em conjunto estarão contribuindo para a construção de propostas de modelagens bioquímicas e fisiológicas que demonstrem como funcionam as comunidades e como elas se modificam ou são modificadas pelo ambiente (ALLEN & BANFIELD, 2005). A predição *in silico*, a análise de homologia com genes previamente caracterizados, a manipulação genética e os experimentos biogeoquímicos fornecem elementos para lidar este novo desafio.

A viabilização das bibliotecas metagenômicas como um método de estudo de diversidade e função microbiana, e para a seleção de novos compostos de interesse, depende de uma abordagem integrada que combine metodologias de

triagem de alto desempenho (*highthroughput*), como os recém-desenvolvidos ensaios enzimáticos miniaturizados e tecnologia de hibridização em microarranjos de DNA, associadas ao seqüenciamento em larga escala, a bioinformática e aos ensaios *in situ* (ALLEN & BANFIELD, 2005; XU, 2006). Esta nova abordagem substitui a atitude reducionista de analisar os genes e os produtos gênicos um a um, por uma postura holística de estudo da microbiologia no ambiente.

O estudo do rDNA 16S tem sido a base para a construção do conhecimento da diversidade procariótica e tem criado uma riqueza considerável de informações para a Ecologia Microbiana ao permitir a identificação de condições ambientais que afetam essa diversidade (AMANN, 2000; THERON & CLOETE, 2000). Análise das comunidades microbianas por meio desta abordagem tem contribuído para aumentar o conhecimento das relações funcionais e biogeográficas de microrganismos nos mais diferentes ambientes (SINGLETON et al., 2001; KEMP & ALLER, 2004), revelando que essa diversidade é muito maior do que inicialmente se imaginava (PACE et al., 1985; PACE, 1997; KEMP & ALLER, 2004; LOZUPONE & KNIGHT, 2005).

Esta abordagem para acessar as populações microbianas diretamente nos diferentes ecossistemas tem sido utilizada com sucesso para caracterização da comunidade de fitoplâncton marinho (SCHMIDT et al., 1991), estudo de biodiversidade em lodo ativado (SUENAGA et al., 2007), comparação da diversidade microbiana em diferentes tipos de solo (DUNBAR et al., 1999) e em diferentes partes do trato intestinal humano (WANG et al., 2005), entre outras. A construção de bibliotecas de rDNA 16S tem sido também utilizada para investigação da comunidade endofítica em milho (CHELIUS & TRIPLETT, 2001), batata (SESSITSCH et al., 2002) e, mais recentemente, em arroz (SUN et al., 2008). Nenhum estudo semelhante foi ainda realizado para acessar a microbiota endofítica presente em frutos de café. Essa estratégia de estudo é utilizada em combinação com outros métodos de análise baseados no rDNA 16S, a exemplo de DGGE/TGGE, T-RFLP e ARDRA (CHELIUS & TRIPLETT, 2001; SESSITSCH et al., 2002; SUN et al., 2008).

A análise de comunidade microbiana por meio de bibliotecas de seqüências de rDNA 16S baseia-se, resumidamente, na amplificação de fragmentos do rDNA 16S, a partir de DNA metagenômico, utilizando-se *primers* universais ou específicos, clonagem dos amplicons obtidos em vetores apropriados e seqüenciamento dos insertos (AMANN, 2000; THERON & CLOETE, 2000; DAHLLÖF, 2002; HUR & CHUN, 2004).

A caracterização da seqüência do 16S rRNA tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos. Há razões definitivas que justificam a utilização de rRNAs para exploração filogenética; eles são considerados cronômetros moleculares nos estudos de evolução por preencherem todos os requisitos que definem um marcador filogenético (PACE et al., 1985; LUDWIG & SCHLEIFER, 1994; LAWRENCE et al., 2005). Além disso, há um grande número de seqüências disponíveis nos bancos de dados acreditados e de acesso remoto aberto, o que permite a realização de alinhamento de seqüências e a identificação das regiões distintas.

A avaliação da diversidade e a comparação das comunidades microbianas são baseadas no grau de identidade entre seqüências de rDNA 16S, as quais são agrupadas em Unidade Taxonômicas Operacionais (UTO) ou filotipos (NÜBEL et al., 1999). Seqüências de rDNA 16S com identidade maiores do que 97% são considerados como sendo da mesma espécie, embora esse nível de identidade não seja consenso na literatura (NÜBEL et al., 1999; KEMP & ALLER, 2004; LOZUPONE & KNIGHT, 2005). Como os níveis de identidade entre as seqüências de rDNA 16S não são consensuais para a definição de UTO, a estimativa da diversidade deve sempre ser cautelosamente interpretada. Além disso, uma das limitações da utilização de PCR para obtenção de clones representativos de uma comunidade é a amplificação preferencial de algumas populações mais abundantes, em detrimento das menos abundantes (HEAD et al., 1998).

A estratégia para se estudar a biodiversidade com a utilização de seqüências de rDNA 16S, de modo geral, confirma os resultados obtidos por uma série de outras abordagens, inclusive a de taxonomia polifásica com um grande número de estirpes (VANDAMME et al., 1996) e, mesmo se considerando as limitações, o seu valor é inquestionável.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Extração de DNA total, em média escala, de microrganismos endofíticos associados aos frutos de café**

A extração de DNA total de microrganismos endofíticos associados aos frutos de café foi realizada pelo método de lise direta utilizando-se o protocolo estabelecido por Fungaro et al. (2004), com modificações, efetuadas no LEM para favorecer a extração dos DNAs bacterianos, em media escala e com maior pureza.

Oito frutos de café desinfestados superficialmente foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O pó fino resultante foi transferido para um tubo de polipropileno esterilizado e 10 mL de tampão de extração (CTAB 4%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 48  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e lisozima (150  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) foram adicionados. A suspensão foi incubada a 37°C por 1 hora e o tubo transferido para novo período de incubação em banho-maria a 65°C por 20 minutos, seguido de resfriamento a temperatura ambiente por 10 minutos. À suspensão contida no tubo foi adicionado 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1,v/v) e durante 5 minutos o tubo sofreu inversões ocasionais. A suspensão foi submetida à centrifugação, 10.000 g por 30 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foi adicionado 0,6 volume de isopropanol acondicionado em temperatura ambiente e a preparação foi incubada nessa temperatura por 10 minutos. Em seguida, a preparação foi centrifugada a 2.000 g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol 70% gelado e ressuspendido em 500  $\mu$ L de tampão TE

[Tris-HCl 100mM (pH 8.0) e EDTA 1mM] (pH 8.0), sendo a suspensão transferida para tubo de microcentrífuga. Nele foram adicionados  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de RNase (Sigma-Aldrich) e realizada nova incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, seguida da adição de  $500\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1,v/v), para proceder à desproteinização. A solução foi misturada gentilmente por 5 minutos e centrifugada a  $10.000 g$  por 5 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo de microcentrífuga e  $500 \mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1,v/v) foram adicionados. A solução foi agitada gentilmente, por 5 minutos, e centrifugada a  $10.000 g$  por 5 minutos. A fase superior foi coletada e transferida para um tubo de microcentrífuga novo. Neste, adicionou-se 0,6 volume de isoprano e a suspensão foi mantida por 10 minutos em temperatura ambiente, seguindo-se a centrifugação durante 5 minutos a  $10.000 g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sedimento de DNA foi finalmente ressuspenso em  $30 \mu\text{L}$  de água desionizada (Milli Q) esterilizada.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8% em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8,3)] e brometo de etídio ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (SAMBROOK et al., 1989). A quantificação foi feita por comparação com marcadores de quantidade de DNA de fago  $\lambda$  nas concentrações de  $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  e  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

O DNA extraído foi visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

### **3.2.2. Construção de bibliotecas de rDNAs 16S das populações bacterianas associadas aos frutos de café**

#### **3.2.2.1. Amplificação dos rDNAs 16S**

O DNA metagenômico foi utilizado como molde para amplificar fragmentos dos rDNAs 16S dos grupos específicos de Eubacteria avaliados neste estudo. Com base nos resultados prévios sobre a aparente ausência de representantes da classe  $\alpha$  do filo Proteobacteria e do filo Actinobacteria, não houve tentativa de se clonar os produtos de PCR obtidos a partir de *primers* específicos para os referidos grupos.

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes à classe  $\beta$ -Proteobacteria foi realizada com o uso dos *primers* específicos F948 $\beta$ /R1492 (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001)

(Quadro 3). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 3), 5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (Milli Q) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (GELSOMINO & CACCO, 2006): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 61°C por 1 minuto, para anelamento dos *primers*, e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. DNA de *Alcaligenes xylosoxidans* ATCC 13138 foram utilizados como controle positivo para as reações de amplificação.

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes à classe γ-Proteobacteria foi realizada com o uso dos *primers* específicos fD2/rP1 (WEISBURG et al., 1991) (Quadro 3). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 250 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,21 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 3), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (Milli Q) esterilizada, para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (BUNGE & LECHNER, 2001): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15 segundos para a desnaturação, 52°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para a extensão dos *primers*. As últimas 20 etapas de extensão foram realizadas usando incrementos na temperatura de 20 segundos por ciclo. DNA de *Pseudomonas putida* ATCC 15176 foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

A amplificação de fragmentos dos rDNAs 16S de grupos específicos de Eubacteria pertencentes ao filo Firmicutes foi realizada com o uso de *primers* específicos BLS342F/1392R (BLACKWOOD et al., 2005) (Quadro 3). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 160 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), 0,1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 3), 2,5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (Milli Q) esterilizada, para completar o volume final. A



PCR foi realizada sob as seguintes condições (BLACKWOOD et al., 2005): temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 57°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 90 segundos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. DNA de *Bacillus subtilis* ATCC 23858 foi utilizado como controle positivo da reação de amplificação.

Em todas as reações para os diferentes grupos foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf).

Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) e brometo de etídio (0,25 µg mL<sup>-1</sup>) (SAMBROOK et al., 1989). Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

Quadro 3: Seqüência dos *primers* usados para amplificar fragmentos de genes rDNA 16S nos experimentos de PCR.

Primer <sup>A</sup>	rDNA 16S alvo (Posição) <sup>B</sup>	Seqüência (5'→3')	Referência
F948β	β-Proteobacteria (931-948)	CGCACAAAGCGGTGGATGA	Gomes et al., 2001
R1492	Eubacteria (1492-1513)	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	Heuer et al., 1997
fD2	Bactérias entéricas (8-27)	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Weisburg et al., 1991
rP1	Bactérias entéricas (1492-1512)	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	Weisburg et al., 1991
BLS342F	Gram-positivas de baixo conteúdo G+C (325-342)	CAGCAGTAGGGAATCTTC	Blackwood et al., 2006
1392R	Eubacteria (1392-1406)	ACGGGCGGTGTGTACA	Blackwood et al., 2006

<sup>A/</sup> gc.: seqüência rica em G+C (Grampo-GC) ligada à extremidade 5' (MUYZER et al., 1993).

<sup>B/</sup> Posição no genoma de *Escherichia coli* (BROSIUS et al., 1981).

### 3.2.2.2. Clonagem e seqüenciamento dos rDNAs 16S

Os amplicons obtidos foram separadamente ligados ao vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA), conforme recomendações do fabricante.

Células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foram feitas competentes pelo método de cloreto de cálcio (SAMBROOK et al., 1989). Ao tubo contendo as células competentes adicionou-se 0,06 ng de DNA ligado ao vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) e o tubo foi mantido em gelo por 30 minutos. A suspensão foi submetida a um choque térmico a 42°C por 45 segundos e, em seguida, foram adicionado 600  $\mu$ L de SOC (2% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 0,05% NaCl, 0,25 M KCl, 2 M MgSO<sub>4</sub>, 5 M NaOH e 1 M Glicose) pré-aquecido a 37°C e o tubo de microcentrífuga contendo a suspensão foi incubado em banho-maria a 37°C por uma hora sob agitação.

Foram espalhados 100 $\mu$ l desta cultura na superfície de placas contendo o ágar Luria Bertani (LB), como o controle positivo de viabilidade, e ágar LB adicionado de Ampicilina (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), X-gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo] (80  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e IPTG [isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo] (200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Um segundo controle foi feito pelo espalhamento de *E. coli* DH5 $\alpha$  competente na superfície de placas contendo ágar LB e ágar LB adicionado de Ampicilina (Sigma-Aldrich) na concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 37°C por 12-16 horas.

A confirmação do fenótipo adquirido foi feita realizando-se estrias múltiplas em placa contendo o antimicrobiano na concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, adicionado de X-gal e IPTG nas concentrações anteriormente citadas. Pelo menos 500 clones positivos de cada grupo foram repicados e a presença do inserto clonado foi confirmada pelo método de lise rápida e por amplificação a partir dos *primers* para o vetor utilizado, M13F e M13R (Promega, Madison, USA). Todos os clones contendo inserto do tamanho correto foram armazenados a -80°C em meio LB adicionado de glicerol 20% (v/v).

A extração de plasmídeos para o seqüenciamento do inserto clonado foi realizada com uso do Wizard<sup>®</sup> SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA). Foram extraídos os plasmídeos de pelo menos 25 clones de cada biblioteca de rDNA 16S construída.

As reações de seqüenciamento foram realizadas no Laboratório de Clonagem e Seqüenciamento de DNA da UFV com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados em cada uma das reações 100 ng a 150 ng de DNA, 0,5 µM do oligonucleotídeo iniciador M13F ou M13R (Promega, Madison, USA), 2,0 µL de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pre-Mix para um volume final de 5 µL. As condições da PCR foram 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 2 minutos. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 µL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 M. Após 10 minutos em temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 minutos a 2.000 g. O DNA sedimentado foi lavado com 100 µL de etanol 70%, centrifugadas por 10 minutos a 2.000 g e armazenado em temperatura ambiente por 10 minutos para secar. Em seguida, o DNA foi ressuspendido em 5 µL de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em seqüenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

### **3.2.3. Análise comparativa das seqüências dos rDNAs 16S das populações bacterianas associadas aos frutos de café**

Todas as seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). Para cada gene foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1990). Múltiplas seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW, e analisadas filogeneticamente com reconstrução de árvores filogenéticas pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o método de distância p com auxílio do programa MEGA 4.0® (TAMURA et al., 2007), para esclarecer o padrão filogenético dos grupos dominantes.

### **3.2.4. Estimativa da diversidade e representatividade de clones na biblioteca metagenômica**

A diversidade de clones na biblioteca foi investigada por análise de rarefação. A curva de rarefação foi calculada usando o programa Analytic Rarefaction 1.3 (aRarefactWin). Uma UTO foi definida como o grupo de clones que

apresentaram a mesma seqüência de rDNA 16S após o alinhamento utilizando o programa CLUSTALW.

Para estimar a representatividade dos ribotipos, a cobertura (C) dos clones analisados foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$C = 1 - (n_1/N)$$

Em que:

$n_1$  = é o número de clones únicos<sup>1</sup>;

$N$  = é o número total de clones examinados.

---

<sup>1</sup> Clones únicos foram considerados aqueles cuja seqüência só foi encontrada uma única vez entre todos os clones analisados da biblioteca.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Seqüenciamento das bibliotecas de rDNAs 16S das populações bacterianas associadas aos frutos de café

A construção de uma biblioteca com fragmentos de rDNAs 16S de representantes da classe  $\beta$ -Proteobacteria tornou-se inviável pela dificuldade em se obter amplicons com qualidade e concentração adequadas para os procedimentos de clonagem padrão.

As seqüências de 50 clones positivos, aleatoriamente analisados na biblioteca construída com fragmentos de rDNAs 16S amplificados a partir do DNA metagenômico com *primers* específicos para a classe  $\gamma$ -Proteobacteria mostrou, para todos os clones, 100% de identidade com DNA de cloroplasto de *C. arabica* L. (EF044213). Ressalta-se, novamente, a necessidade de, no futuro, construir novos conjuntos de *primers* específicos ou universais para minimizar a interferência do DNA de origem vegetal neste tipo de estudo. Estudos de diversidade de microrganismos endofíticos em tubérculos de batata (SESSITSCH et al., 2002) detectaram o mesmo problema resultante da amplificação de DNA de cloroplasto. Em outros estudos de diversidade de microrganismos em raízes de milho (CHELIUS & TRIPLETT, 2001) e de arroz (SUN et al., 2008), um conjunto de *primers* (799F/1492R) foi utilizado com sucesso e não foi detectado nenhum clone carregando fragmentos de rDNA 16S de mitocôndria ou cloroplasto.

O seqüenciamento de 25 clones positivos, aleatoriamente analisados na biblioteca construída com fragmentos de rDNAs 16S amplificados a partir do DNA

metagenômico com *primers* específicos para o filo Firmicutes, mostrou a ocorrência de três gêneros na biblioteca (Figura 15), de acordo com a busca de identidade com seqüências disponíveis no banco de dados GenBank utilizando o algoritmo BLASTn. Entre os gêneros encontrados, 60% corresponderam ao gênero *Bacillus*, 8% ao gênero *Staphylococcus* e 4% mostraram alta identidade com *Paenibacillus*.

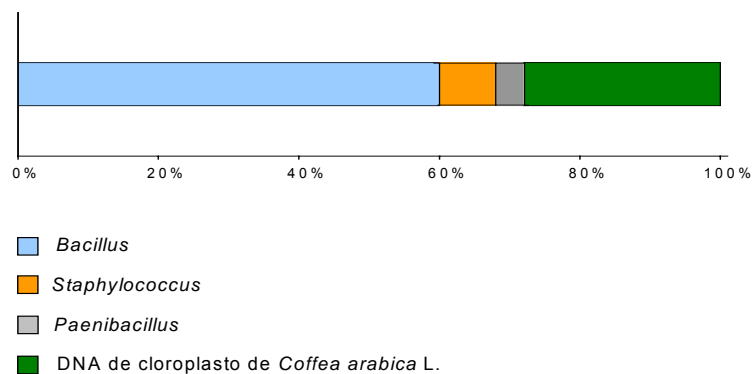


Figura 15: Frequência de representação dos gêneros de Firmicutes endofíticos de frutos de café (*Coffea arabica* L.), com base na afiliação filogenética. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas com o seqüenciamento de clones (n=25) da biblioteca construída com fragmentos dos rDNAs 16S, presentes no DNA metagenômico, amplificados a partir de *primers* específicos para o filo Firmicutes.

Do total de seqüências analisadas para o filo Firmicutes, 28% mostraram identidade com DNA de cloroplasto de *C. arabica* L. (EF044213).

### 3.3.2. Análise do tamanho da amostra e da diversidade de ribotipos na biblioteca de clones rDNA 16S de Firmicutes endofíticos de frutos de café

O cálculo de uma curva de rarefação requer tanto dados qualitativos quanto quantitativos para todos os tipos de seqüência em uma biblioteca de clones. Se nenhuma etapa do processo (extração de DNA, PCR, clonagem) é limitante, esta curva reflete a diversidade taxonômica, ou seqüências de fragmentos de rDNA 16S, dentro da amostra (SIMBERLOFF, 1978 citado por CHELIUS & TRIPLETT, 2001). No presente trabalho, essa técnica estatística é mais apropriadamente aplicada para medir a diversidade dentro da biblioteca de clones e inferir qual o tamanho da amostra que resulta numa determinada fração das espécies presentes.

A curva de rarefação tendeu ao *plateau*, indicando que o número de clones analisados na biblioteca de clones rDNA 16S de Firmicutes endofíticos de frutos de café mostrou-se suficiente para revelar o número total de diferentes tipos de seqüência dentro desta biblioteca e também que a biblioteca foi completamente amostrada (Figura 16).

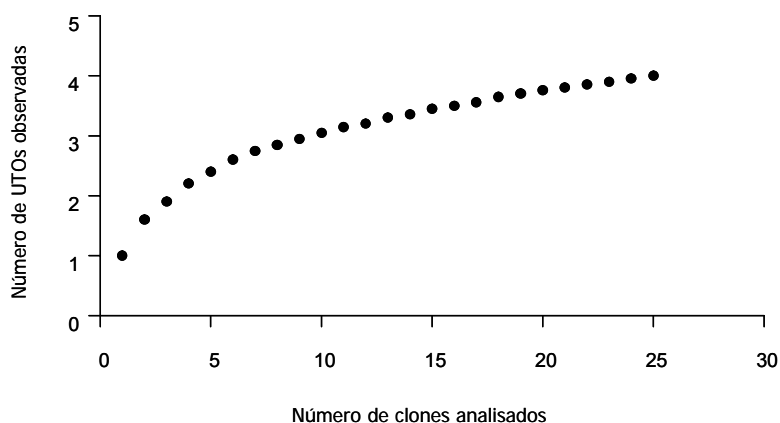


Figura 16: Curva de rarefação de clones rDNA 16S de Firmicutes endofíticos de frutos de café (*Coffea arabica* L.).



Para a biblioteca de clones rDNA 16S de Firmicutes endofíticos de frutos de café, a cobertura correspondeu a 96%, portanto, infere-se que o número de seqüências únicas detectadas na amostra aproxima-se do número total de seqüências únicas dentro desta biblioteca. A cobertura mostra a quantidade estimada de quão bem o tamanho da amostra reflete a aparente diversidade dentro da biblioteca de clones (CHELIUS & TRIPLETT, 2001).

### 3.3.3. Filogenia de bactérias endofíticas presentes em frutos de café

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia, com as seqüências dos genes rDNA 16S pertencentes ao filo Firmicutes obtidas a partir de clones componentes da biblioteca, agrupou 60% das seqüências com seqüências de bactérias do gênero *Bacillus* (Figura 17). Destas, 44% mostraram, de acordo com o alinhamento, identidade de 96% com *Bacillus firmus* (AJ491843) e 16% mostraram 97% de identidade com *Bacillus cereus* (EU871042) (Quadro 4). *B. cereus* endofíticos já foram isolados de folhas de plântulas de café provenientes da Colômbia (VEGA et al., 2005) e de citrus (ARAÚJO et al., 2001).

Quadro 4: Identificação dos clones presentes na biblioteca de rDNA 16S pertencentes ao filo Firmicutes.

Clone	Número de clones (% do total de clones)	Seqüência mais similar presente no banco de dados <sup>A</sup>	% de identidade	Número de acesso
F1.23	11 (44%)	<i>Bacillus firmus</i>	96	(AJ491843)
F6.4	4 (16%)	<i>Bacillus cereus</i>	98	(EU871042)
F3.47	1 (4%)	<i>Paenebacillus</i> sp.	100	(DQ444989)
F3.14	2 (8%)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	(AM157439)

<sup>A/</sup> NCBI, National Center for Biotechnology Information.

A análise também agrupou 8% das seqüências com a de *Staphylococcus epidermidis* (AM157439) (Figura 17), e o alinhamento mostrou identidade de 98% entre elas (Quadro 4).

Embora o gênero *Staphylococcus* não seja freqüentemente observado em estudos de isolamento de microrganismos endofíticos (HALLMANN et al. 1997; LODWEYCKX et al., 2002) e não tenha o caráter endofítico confirmado, estudos de isolamento e identificação por análise de ácidos graxos das bactérias endofíticas de algodão e milho (McINROY & KLOEPPER, 1995) mostraram a ocorrência de 39 isolados representando as espécies *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. warneri*. Adicionalmente, estudos de avaliação da resposta da comunidade de bactérias endofíticas a infecção com *Erwinia carotovora* em batata mostrou a presença de clones de rDNAs 16S com alta identidade com seqüências de *S. warneri* (SW16SRRNA) e *S. xylosus* (SS1F0916S) (REITER et al., 2002). O destaque do resultado como o primeiro relato de identidade de seqüências com a de *Staphylococcus epidermidis* (AM157439) em fruto de café requer o cuidado de se efetuar outras análises para comprovação mais segura da natureza endofítica da bactéria. A constatação de *S. epidermidis* como endofítica em frutos de café representaria relato novo sobre nicho de ocorrência do gênero e espécie.

As seqüências agrupadas de 4% dos clones (Figura 17) mostraram 100% de identidade no alinhamento (dados não mostrados) com a seqüência de *Paenebacillus* sp. (DQ444989) (Quadro 4). Sakiyama et al. (2001) isolaram e caracterizaram fenotipica e genotipicamente uma bactéria pectinolítica endofítica de café, cuja seqüência parcial do rDNA 16S mostrou 96% de identidade com a seqüência de *Paenibacillus amylolyticus* e 90% a 95% de identidade com a seqüência do rDNA 16S de *P. pabuli*, *P. acquariensis* e *P. lautus*.

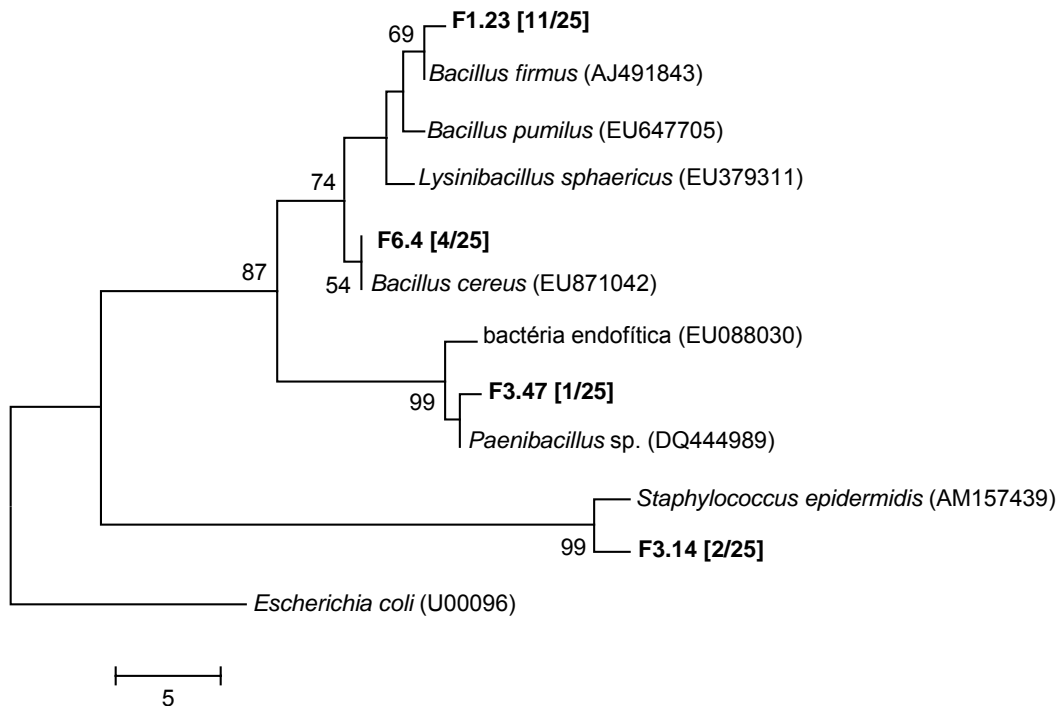


Figura 17: Árvore filogenética mostrando a afiliação filogenética de Firmicutes. As seqüências dos genes rDNA 16S foram obtidas a partir de clones componentes da biblioteca de rDNAs 16S. *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de bootstrap (1000 replicatas) maiores que 50 são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0<sup>®</sup>. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no banco de dados GenBank.

### 3.4. CONCLUSÕES

Foram identificados 3 gêneros de Firmicutes na biblioteca de rDNAs 16S, sendo que pela análise das seqüências , 60% corresponderam a *Bacillus*, 8% a *Staphylococcus* e 4% mostraram alta identidade com *Paenibacillus*.

A curva de rarefação demonstra que a biblioteca foi representativa o suficiente para refletir a diversidade de Firmicutes endofíticos de frutos de café.

O teste de cobertura mostrou que a seqüência única detectada na amostra aproxima-se do número total de seqüências únicas dentro desta biblioteca.

O estudo filogenético mostrou que as seqüências contidas na biblioteca de rDNAs 16S agrupam com seqüências de *Bacillus firmus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Paenibacillus* sp..

A confirmação da presença de *Staphylococcus epidermidis* requer o cuidado de se efetuar outros estudos para comprovação mais segura da natureza endofítica da bactéria.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E.E.; BANFIELD, J.F. Community genomics in microbial ecology and evolution. **Nature**, v.3, p.489-498. 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410. 1990.
- AMANN, R.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p.143-169. 1995.
- AMANN, R. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.1-8. 2000.
- ANALYTIC RAREFACTION 1.3. aRarefactWin program. University of Georgia, Athens. Disponível em <<http://www.uga.edu/%7Eestrata/software/>>. Acesso em 10 de agosto de 2008.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236. 2001.
- BLACKWOOD, C.B.; OAKS, A.; BUYER, J.S. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6193-6198. 2005.
- BROSIUS, J., DULL, T.J., SLEETER, D.D., NOLLER, H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v.148, p.107-127. 1981.
- BUNGE, M.; LECHNER, U. Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from river sediments: Diversity of the dehalogenating community. **Anaerobic Dehalogenation**, p.69-81. 2001.

- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v.41, p.252-263. 2001.
- DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.213-217. 2002.
- DUNBAR, J.; TAKALA, S. BARNES, 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 and Environmental Microbiology**, v.65, 1662-1669. 1999.
- FUNGARO, M.H.P.; VISSOTTO, P.C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; FURLANETO, M.C.; TANIWAKI, M.H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v.49, p.123-127. 2004.
- GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.91-102. 2006.
- GOMES, N.C.; HEUR, H.; SCHOLFED, J.; COSTA, R.; MENDOÇA-HANGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Plant and Soil**, v.232, p.167-180. 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914. 1997.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 3233-3241, 1997.
- HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, p.1-21. 1998.
- HUR, I.; CHUN, J. A Method for Comparing Multiple Bacterial Community Structures from 16S rDNA Clone Library Sequences. **The Journal of Microbiology**, v.42, p.9-13. 2004.
- KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us?. **FEMS Microbiology Ecology**, v.47, p.161-177. 2004.
- LAWRENCE, J.W.; ELSER, J.J.; CREASE, M.M.; COTNER, J.B.; MARKOW, T.A. The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: Impacts on the evolutionary ecology of organisms. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.36, p.219-242. 2005.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; van DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their

- potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.583-606. 2002.
- LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature**, v.3, p.510-516. 2005.
- LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p.8228-8235. 2005.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Review**, v.15, p155-173. 1994.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, p.337-342. 1995.
- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700. 1993.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KÜHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: Morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.422-430. 1999.
- PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. Analyzing natural microbial population by ribosomal rRNA sequences. **ASM News**, v.51, p.4-12. 1985.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-740. 1997.
- REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268. 2002.
- SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.117-121. 2001.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. Paginação irregular.
- SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbial Biotechnology**, v.75, p.955-962. 2007.
- SCHMIDT, T.M.; DeLONG, E.F.; PACE, N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.4371-4378. 1991.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on

- eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p.23-32. 2002.
- SINGLETON, D.R.; FURLONG, R.A.; RATHBUN, S.L.; WHITMAN, W.B. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.4374-4376. 2001.
- STEELE, H.L.; STREIT, W.R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v.247, p.105-111. 2005.
- SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, v.9, p.2289-2297. 2007.
- SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, v.55, p.415-424. 2008.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599. 2007.
- THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Review in Microbiology**, v.26, p.37-57. 2000.
- TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, L.F. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.782-787. 1990.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438. 1996.
- VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L.. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p.371-380. 2005.
- WANG, M.; AHRNÉ, S.; JEPPSSON, B.; MOLIN, G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.219-231. 2005.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J.. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703. 1991.
- XU, J. Microbial Ecology in the age of genomics and metagenomics: Concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v.15, p.1713-1731. 2006.



*“Todos os fins são também começos. Apenas não sabemos disso.”*

Mitch Albom