

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM FRUTOS DE *Coffea canephora* EM TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

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  
2011

PAULO SÉRGIO BALBINO MIGUEL

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CULTIVÁVEIS EM  
FRUTOS DE *Coffea canephora* EM TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

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: 21 de fevereiro de 2011.

---

Prof<sup>ª</sup>. Célia Alencar de Moraes  
(Coorientadora)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Coorientador)

---

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

---

Dra. Poliane Alfenas Zerbini

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Orientador)

*A Deus.*

*À minha esposa Mara.*

*À minha mãe Aparecida e meu irmão Fábio.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força, dedicação, vitórias e conquistas. Sem Ele, com certeza não chegaria até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, que me proporcionaram um aprendizado enriquecedor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação, confiança, paciência e os sábios conselhos que muito me fizeram crescer.

Aos professores Marcos Rogério Tótola e Célia Alencar de Moraes, por disponibilizarem os seus respectivos laboratórios para a realização de parte desse trabalho, pela coorientação e ensinamentos preciosos que nunca esquecerei.

Aos professores Daniele Ferreira da Silva, Poliane Alfenas Zerbini, Wendel Batista Silveira e Antônio Galvão do Nascimento por aceitarem participar da banca examinadora.

À minha belíssima e querida esposa Mara, que caminhou comigo lado a lado, suportou os momentos difíceis, entendeu as minhas ausências e abriu mão de seus sonhos para viver os meus. Sem o seu amor não teria vencido.

À minha mãe, D. Aparecida, que sempre lutou por mim, proporcionando condições para que eu estudasse, mulher simples, vencedora, vitoriosa, que estudou seus filhos com amor e carinho, fazendo tudo o que pode para fazer deles “alguém na vida”.

Ao meu irmão Fábio, um grande amigo e companheiro que sempre demonstrou preocupação e carinho por mim.

Ao meu grande amigo Caio Antunes de Carvalho pela força e pelos conselhos.

Aos meus colegas de turma, Bruno, Cássia, Livia e Monalessa, juntos sofremos, nos dedicamos, lutamos e alcançamos a tão sonhada vitória.

Aos grandes amigos Marcelo e Júlio, pelo apoio, amizade, paciência e auxílio nesse trabalho. A ajuda de vocês foi fundamental para o meu sucesso.

A todos os professores do departamento de microbiologia com quem tive a oportunidade de aprender e muito no decorrer desses dois anos.

Aos amigos Danilo, Sr. Paulo, Evandro, Nilcéa, Laura, Rita, Karlos, e Elizabeth, pela ajuda que sempre me ofereceram.

À Eliana, Thamy, Naylor, Larissa e Alessandra, que sempre estiveram dispostos a ajudar e motivar.

Aos amigos dos laboratórios de Microbiologia Industrial, Fisiologia, Genética, Petróleo, Micorriza, Anaeróbios e Alimentos.

Aos pesquisadores Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha e Fernando Teixeira Gomes, grandes amigos que me mostraram o caminho da pesquisa, sempre me incentivando e demonstrado muita confiança em mim mesmo à distância.

Aos irmãos da Igreja Metodista Wesleyana de Viçosa pelas orações feitas pela minha vida, que me ajudaram a suportar os momentos de dificuldade.

A todos que de alguma forma me ajudaram na condução desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

PAULO SERGIO BALBINO MIGUEL, filho de Aparecida de Fátima Balbino Miguel e Francisco de Oliveira Miguel, nasceu na cidade de Astolfo Dutra – MG, no dia 19 de junho de 1981.

Em fevereiro de 2005, ingressou no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CESJF), em Juiz de Fora – MG, e, em dezembro de 2008, graduou-se em Ciências Biológicas. No ano seguinte iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa - MG.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Amostragem e desinfestação dos frutos de café .....	10
3.2. Isolamento de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café .....	11
3.3. Análise do perfil de ácidos graxos .....	11
3.4. Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise de sequências de rDNA 16S .....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
5. CONCLUSÕES .....	38
6. REFERENCIAS .....	39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Agrupamento dos isolados de bactérias endofíticas de *Coffea canephora* em três estádios de desenvolvimento, identificados por FAME..... 17
- Figura 2: Relação filogenética de isolados de bactérias endofíticas cultiváveis de frutos *Coffea canephora* do filo Firmicutes, inferida pelo método da Máxima Parcimônia. Os valores nos pontos de ramificações representam o bootstrap para 1000 replicações. *Burkholderia cepacia* M2S2 (NCBI) foi utilizada como grupo externo.....25
- Figura 3: Relação filogenética de isolados de bactérias endofíticas cultiváveis de frutos de *Coffea canephora* dos filios Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Bacteroidetes inferida pelo método da Máxima Parcimônia. Os valores nos pontos de ramificações representam o bootstrap para 1000 replicações. *Burkholderia cepacia* G4 (NCBI) foi utilizada como grupo externo. ....29
- Figura 4: Relação filogenética de isolados de bactérias endofíticas cultiváveis de frutos de *Coffea canephora* do filo Gamma-Proteobacteria inferida pelo método da Máxima Parcimônia. Os valores nos pontos de ramificações representam o bootstrap para 1000 replicações. *Burkholderia cepacia* M2S2 (NCBI) foi utilizada como grupo externo.....33
- Figura 5: Filos e clones detectados em frutos de *Coffea canephora* em 3 estádios de maturação de acordo com os perfis de ácidos graxos e sequenciamento do rDNA 16S.....35
- Figura 6: Curvas de rarefação representando a diversidade de sequências esperadas dos isolados de bactérias endofíticas provenientes de frutos nos estádios verde, verde-cana e cereja.....37



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados das comparações entre as sequências de rDNA 16Sdos isolados de bactérias endofíticas cultiváveis dos frutos de <i>Coffea canephora</i> com as similares de espécies depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) com os respectivos valores de similaridade e “e-value”, e o número do acesso.....	22
Tabela 2: Riqueza e diversidade de bactérias endofíticas isoladas de frutos de <i>Coffea canephora</i> em três estádios de desenvolvimento .....	36

## RESUMO

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de *Coffea canephora* em três estádios de maturação.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Coorientadores: Célia Alencar de Moraes e Maurício Dutra Costa.

Bactérias endofíticas em frutos são as que habitam partes internas sem causar danos ou sintomas aparentes. Entretanto, a presença e diversidade delas em frutos de *Coffea canephora* não foram ainda relatadas na literatura. Assim, o presente trabalho objetivou determinar a existência e diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis nos frutos dessa espécie em três estádios de maturação. O isolamento e a quantificação foram realizados em meio R2A, sendo obtidos 140 isolados que, pelas características morfológicas das colônias, foram agrupadas em 21 morfotipos, sendo 55 % de Gram-positivas. Na comunidade foram identificadas representantes de Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Alpha- e Gamma-Proteobacteria, com 14 gêneros e 18 espécies. *Kocuria turfanensis* e *Pantoea vagans* são pela primeira vez identificadas como espécies endofíticas. Sete das 18 espécies identificadas como endofíticas em frutos de *C. canephora* não são espécies descritas como endofíticas em frutos, a saber: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter hormaechei*, *Chryseobacterium sp.* e *Ochrobactrum sp.* A diversidade das bactérias endofíticas cultiváveis mostrou-se distinta nos três estádios de maturação de frutos de *C. canephora*, sendo maior nos frutos verdes, nos quais a predominância foi de *Bacillus subtilis*. Nos dois primeiros estádios de desenvolvimento o número de isolados de Gram-positivas foi maior que o de Gram-negativas, enquanto nos frutos maduros o número de colônias de Gram-positivas e Gram-negativas foi similar. No último estágio de maturação a diversidade de espécies de bactérias endofíticas foi menor e a *Klebsiella oxytoca* foi a espécie dominante, fato atribuído a prováveis efeitos da maior concentração de cafeína e açúcares nos frutos.

## ABSTRACT

MIGUEL, Paulo Sérgio Balbino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Endophytic bacterial diversity in *Coffea canephora* fruits in three maturation stages.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Co-advisers: Célia Alencar de Moraes and Maurício Dutra Costa.

Endophytic bacteria in fruits inhabits internal tissues without cause visible damage or symptoms. However, there is no report of their presence and the diversity in *Coffea canephora* fruits. Thereby, this work aimed to determine the existence and diversity of cultivable endophytic bacteria in fruits of that specie in three maturation stages. Bacterial isolation and quantification were performed in R2A medium and resulted in 140 isolates gathered in 21 morphotypes, being 55 % of Gram-positive bacteria. The community is composed by 14 genera and 18 bacterial species belonging to phylum Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroides, Alpha and Gamma-Proteobacteria. For the first time, *Kocuria turfanensis* and *Pantoea vagans* are identified as endophytic species. From 18 species identified as endophytic in *C. canephora* fruits, seven are not described as endophytic in fruits, namely: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter hormaechei*, *Chryseobacterium sp.* and *Ochrobactrum sp.*. The diversity of cultivable endophytic bacteria was distinct in the three maturation stages of *C. canephora* fruits, being larger in green fruits, where *Bacillus subtilis* was predominant. The number of Gram-positive isolates was higher than that for Gram-negative in the first two development stage, while in mature fruits the number of colonies from both Gram-positive and Gram-negative was similar. In the last maturation stage, diversity of endophytic bacteria species was smaller and *Klebsiella oxytoca* was the predominant specie, what was assigned to probable effects of higher caffeine and sugar concentration in the fruits.

## 1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro da espécie *Coffea canephora* é uma planta rústica, adaptada a regiões de altitudes mais baixas e temperaturas mais elevadas, tolerante a seca e a doenças, diplóide, com auto-incompatibilidade genética do tipo gametofítica e que se reproduz por fecundação cruzada. Por outro lado, difere da outra espécie extensivamente cultivada no Brasil, a *Coffea arabica* L., descrita como planta alotetraplóide, autógama, adaptada a local de altitude elevada e clima ameno. Quanto ao sistema radicular, o de *C. canephora* é mais desenvolvido e por esta razão a exigência da planta por fertilizantes é menor.

Economicamente, a importância do *C. canephora* deve-se, em especial, ao fato de se constituir como matéria-prima básica para a indústria de café solúvel, com preços médios menores em sua comercialização. É componente importante na composição dos “blends” com café arábica nas indústrias de torrado e moído, por apresentar mais sólidos solúveis e proporcionar maior rendimento ao produto final.

Na composição do mesocarpo mucilaginoso de frutos maduros de café estão os açúcares simples, polissacarídeos complexos, proteínas, lipídeos e minerais, o que faz dele meio de cultura para o crescimento e estabelecimento de bactérias, fungos ou leveduras. Nesse contexto, faz-se necessário o conhecimento da diversidade microbiana para a compreensão das interações, vias metabólicas funcionais e produtos do metabolismo microbiano durante a utilização destes substratos. Atualmente, a abordagem polifásica para estudo desta natureza é a de escolha, por tornar as análises mais robustas pelo reforço representado por resultados de sequenciamento e reconstrução filogenética à coerência morfológica e bioquímica das espécies.

Os micro-organismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos, podem estimular o crescimento das plantas, aumentar a resistência a doenças e a condições ambientais adversas, como o estresse hídrico, produzir enzimas e compostos precursores daqueles que compõem as características organolépticas da bebida, entre outros.

Os trabalhos desenvolvidos com bactérias endofíticas cultiváveis em frutos de cafeeiros envolvem a espécie *C. arabica*. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade dessas bactérias nos frutos de *C. canephora* em três estádios de desenvolvimento, com a utilização de métodos moleculares, FAMES e sequenciamento de rDNA 16S dos isolados nos estudos de filogenia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O cafeeiro é a planta de interesse econômico mais conhecida entre as da Rubiaceae, família que compreende aproximadamente 650 gêneros e mais de 13.000 espécies (ROVA et al., 2002). Dentre essas, as mais importantes são *Coffea arabica* e a *Coffea canephora* (FERRÃO, 2007). Seus frutos apresentam-se com coloração avermelhada, arroxeada ou amarelada quando maduros. Nesse estágio, apresenta mucilagem composta por pectinas, açúcares e fibras (MBURU, 1995).

As plantas de *C. canephora* são rústicas, tolerantes à seca e a doenças, diplóides, com autoincompatibilidade genética do tipo gametofítica, se reproduzem por fecundação cruzada e são adaptadas a regiões de altitudes inferiores 850 metros (KUMAR et al., 2006) e temperatura com média anual de 22 a 26 °C (FERRÃO, 2007). O sistema radicular é mais desenvolvido e, por conseqüência, a exigência por fertilizantes é menor e também menor o custo de produção. Além disso, é mais tolerante ao déficit hídrico quando comparado à *C. arabica* (FAZUOLI et al., 2007). Apresenta desenvolvimento mais lento e períodos de floração e maturação maiores que café arábica, pode chegar a cinco metros de altura e produz um número maior de frutos por roseta (MENDES, 1999). As lavouras de café robusta apresentam grande heterogeneidade, com plantas distintas em relação à parte aérea, formato e tamanho dos grãos, época de maturação dos frutos, vigor vegetativo e capacidade produtiva (CHARRIER & BERTHAUD, 1985; FERRÃO et al., 2007). Assim, difere de *C. arabica* L., a espécie mais cultivada e comercializada no mundo, a qual é alotetraplóide ( $2n=4x=44$ ), autógama, adaptada a local de altitude elevada e clima mais ameno (CONAGIN & MENDES, 1961).

A cafeicultura é uma das principais atividades da agricultura no Brasil e, para que ela continue viável, o produto para o preparo da bebida deve apresentar-se com a qualidade requerida pelos mercados, interno e externo. Vários fatores afetam a qualidade da bebida do café, dentre os quais se destacam os genéticos, ambientais, maturação dos frutos e manejo pós-colheita dos frutos, dentre outras (PIMENTA et al., 2008).

*Coffea canephora* é uma espécie originária das regiões tropicais, quentes, úmidas e de baixa altitude da África, com temperaturas médias superiores a 23 °C. A produção originária desta espécie representa cerca de 35 % do volume mundial comercializado, sendo o Vietnã, a Indonésia, o Brasil, a Costa do Marfim e Uganda os principais produtores. Os frutos apresentam maiores teores de proteína e polifenóis (FERNANDES et al., 2003) e menores de sacarose e de trigonelina, que os de *C. arabica* (KY et al., 2001)

No que diz respeito à produção nacional, o robusta participa com 27,51 % (10,75 milhões de sacas de café beneficiado) e o Estado do Espírito Santo destaca-se como o maior produtor, com 70,3 %, seguido do Estado de Rondônia com 1,70 milhões de sacas de café beneficiado, regiões essas de baixa altitude (0 a 600 metros) (CONAB, 2009). O café robusta é destinado principalmente para a indústria de café solúvel, por ser a taxa de extração de sólidos dos grãos superior a obtida com os do arábica, e também usado para se fazer as bases, também denominadas “ligas”, nas constituições dos “blends” (MORGANO et al., 2002).

A qualidade da bebida do café de cultivares do *C. arabica*, cultivadas em altitudes maiores, de modo geral é considerada como superior. Cafés originários de altitudes entre 920 e 1120 metros apresentam corpo e acidez mais fracos e doçura mais alta, em relação aos produzidos na faixa de 720 a 920 metros (SILVA et al., 2004). A altitude da lavoura também influencia a densidade de bactérias endofíticas nos frutos de *C. arabica*, bem como a cultivar, existindo uma relação positiva entre densidades de endofíticas e altitude (CORDERO, 2008). Ainda com relação à qualidade da bebida há relatos de influência positiva de fungos do gênero *Cladosporium sp.* (PEREIRA et al., 2005). Os autores constataram que a colonização é menos intensa quando os frutos ainda se encontram verdes, em razão da presença de compostos fenólicos com ação antifúngica. Quando em estágio cereja, a colonização torna-se acentuada e coincide com a conversão dos compostos fenólicos em açúcares, facilitando a colonização.

No que diz respeito ao café robusta, é também possível falar em qualidade, principalmente quando preparado por descascamento do fruto no estágio cereja. Nesse sentido, entre as características desejáveis pelas

indústrias destacam-se o maior teor de sólidos solúveis, cafeína e ácido clorogênico; a maior capacidade de suportar torrefação mais acentuada sem apresentar amargor indesejável; maior teor de açúcares complexos e menor de lipídeos, o que favorece a consistência da cremosidade no preparo da bebida do café expresso. Além disso, na composição de *blends*, a adição de pequeno percentual de robusta de qualidade não altera o resultado final da bebida, podendo inclusive corrigir algum excesso de acidez originária dos grãos de arábica (RIBEYRE, 2007).

Ácidos clorogênicos são metabólitos secundários de importância nos grãos, deles resultam compostos fenólicos no processo de torrefação que proporcionam o amargor à bebida (BERTRAND et al., 2003). Em muitas plantas, esses ácidos controlam a concentração de ácido indol acético, a biossíntese do etileno, além de induzirem ou suspenderem a dormência. Em café, é possível que apresentem funções adicionais, como a formação de pigmentos verdes, biossíntese de lignina e proteção ao ataque de micro-organismos (MENEZES, 1990).

A maioria das plantas vasculares abrigam micro-organismos endofíticos (FIRÁKOVÁ et al., 2007), com representantes de Gram-positivos e Gram-negativos dos filos Alfa-, Beta- e Gamma-Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (BACON & HINTON, 2007). Esses micro-organismos vivem intra ou intercelularmente sem causar danos aparentes à planta (BACON & HINTON, 2007), competem entre si pelos sítios na mesma (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006) e são detectados por métodos culturais ou moleculares (BACON & HINTON, 2007).

A densidade populacional de endofíticos é variável e depende essencialmente das espécies bacterianas, do genótipo e estágio de desenvolvimento do hospedeiro e das condições do ambiente (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006). Depende ainda da parte da planta a que associam, a exemplo do demonstrado em cana de açúcar em que a maior parte foi de isolados do caule e folhas (MAGNANI et al., 2010). Além disso, os endofíticos podem expressar genes requeridos para entrada, colonização, crescimento e sobrevivência no interior das plantas, estimulando o desenvolvimento delas, competindo e suprimindo patógenos e



produzindo diversas substâncias (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO 2006). Organismo envolvido em associação endofítica tem a necessidade de compartilhar recursos, e assim, o genoma codifica para diversos transportadores que permitem o transporte de nutrientes produzidos pela planta (TAGHAVI et al., 2010).

A existência dessa interação planta-micro-organismo tem sido constatada em diversas partes do vegetal, como: sementes, óvulos, frutos, caules, folhas, raízes, tubérculos, brotos, flores e inflorescências (ZHANG et al., 2006), sendo provável que a entrada deles seja controlada pela planta e pelas condições do ambiente (SILVA et al., 2006). Aos endofíticos tem sido atribuída a capacidade de produção de compostos promotores de crescimento e metabólitos antimicrobianos, além da supressão da proliferação de nematóides. Essa relação parece proporcionar outras vantagens, como inibição de patógenos e aumento do rendimento das colheitas, aumento na resistência da planta a doenças e fixação do nitrogênio atmosférico (ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006; CONTI, 2007), além da solubilização e assimilação de fosfato (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), entre outras.

Existe uma relação muito próxima entre bactérias endofíticas e rizosféricas e, por isso, muitas delas podem penetrar na planta hospedeira via raízes (VAN DER LELIE et al., 2009; SPRENT & DEFARIA, 1988). Essa colonização pode ocorrer em três etapas, onde na primeira a bactéria move-se em direção às raízes da planta, passivamente ou através do fluxo de água do solo, ou, ainda, ativamente, por meio da atividade flagelar induzida por compostos liberados por ela. Numa segunda etapa, pode ocorrer uma adsorção não específica da bactéria às raízes, seguida pelo ancoramento às mesmas. Por fim, a bactéria endofítica pode alcançar sítios específicos de tecidos danificados da planta, os quais surgem naturalmente como resultado do crescimento vegetal, através dos pêlos radiculares e em junções epidérmicas ou ainda, via ferimentos (SPRENT & DEFARIA, 1988). Dentro da planta, a colonização pode ser sistêmica pela migração através do sistema vascular e apoplasto ou local como em tecidos do córtex e xilema (HALLMANN et al., 1997).

Bactérias endofíticas podem ser utilizadas como uma alternativa de menor impacto ambiental no controle da ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* (SILVA et al., 2008), uma vez que ao colonizarem as folhas impedem a germinação dos uredósporos pela secreção de substâncias antimicrobianas (SHIOMI et al., 2006). Dentre as espécies que apresentam melhor desempenho nesse tipo de controle estão: *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, e *Klebsiella pneumoniae* (SHIOMI et al., 2006).

Em folhas, ramos, raízes e frutos de cafeeiro cultivados no Havai, Colômbia e México, foram isoladas bactérias endofíticas, sendo a maior quantidade dessas nas sementes (VEGA et al., 2005). Os autores constataram o predomínio de *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*. Em frutos de café arábica, as ocorrências de *Staphylococcus simulans*, *Bacillus niacini*, *Pectobacterium carotovorum/carotovorum*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter amnigenus*, *Brevibacterium epidermis/iodium*, já foram também demonstradas (CORDERO, 2008).

Fungos endofíticos foram isolados em raízes, caules, folhas, frutos, sementes e pedúnculos de *Coffea canephora*, *Coffea congensis*, *Coffea liberica*, *Coffea macrocarpa*, *Coffea racemosa*, e *Coffea stenophylla*, plantas provenientes da Colômbia, Havai, México e Porto Rico. Os taxa mais abundantes foram *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, e *Xylariaceae*, sendo o primeiro o mais comum, com diversidade média menor no México (VEGA et al., 2010). Os autores não encontraram nenhuma evidência de que as comunidades endofíticas dos fungos estudados diferissem notavelmente entre as espécies de café, sugerindo que elas são muito mais influenciadas pelos sítios que pelas espécies hospedeiras. Representantes endofíticos entomopatogênicos dos gêneros *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* e *Isaria* também têm sido isolados de plantas de café (VEGA et al., 2008).

Um método bioquímico considerado como discriminador taxonômico para a identificação de espécies em comunidades microbianas é a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) (HILL et al., 2000). Tal

método consiste na esterificação dos lipídeos extraídos da amostra, seguida da separação e identificação por cromatografia gasosa, baseados nos tempos de retenção na coluna cromatográfica, comparados aos tempos de retenção dos padrões submetidos ao mesmo processo (KIRK et al., 2004). Ele tem sido utilizado para estudar a composição da comunidade microbiana e mudanças na população em razão de contaminantes químicos (SICILIANO & GERMIDA, 1998), bem como na identificação de isolados de bactérias em folhas, ramos, talos e raízes (VEGA et al., 2005) e também de endofíticas cultiváveis em frutos de café (CORDERO, 2008)..

Outra ferramenta frequentemente utilizada para se identificar isolados desconhecidos é o sequenciamento do gene rDNA 16S e subsequente comparação da sequência com as depositadas nos Bancos de dados, como o Genbank (National Center for Biotechnology Information) (TEMMERMAN et al., 2004). O gene rDNA 16S é alvo de *primers* para estudos da diversidade porque está presente em todos os organismos e pouco sujeito a transferência horizontal (KIRK et al., 2004). A sequência ainda contém regiões variáveis espécie-específica, o que permite a identificação dos isolados bacterianos em nível de espécie. Assim, é o de escolha para a construção de *primers*, reação em cadeia de polimerase (PCR), sequenciamento e alinhamento de sequências (CAI et al., 2003). Com esse tipo de análise é possível conhecer os gêneros bacterianos em mais de 90 % dos casos e as espécies entre 65 a 83 % (JANDA & ABBOTT, 2007), e, quando o poder discriminatório não é suficiente, a análise filogenética exclui outros gêneros e espécies. Assim, os dados de sequenciamento são mais apurados em razão das relações filogenéticas disponíveis (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). Como dificuldades encontradas listam o reconhecimento de novos táxons e a existência das poucas sequências depositadas nos bancos de dados (JANDA & ABBOTT, 2007). A maior limitação da técnica ocorre quando duas espécies bacterianas distintas compartilham sequência rDNA 16S muito similares (WOO et al., 2008).

O sequenciamento do gene rDNA 16S origina dados não ambíguos e reprodutíveis, mesmo para isolados raros (DRANCOURT et al., 2000), e tem se tornado o método de referência para a taxonomia e identificação bacterianas (MIGNARD & FLANDROIS, 2006). O uso de sequências do

rDNA 16S tem levado a reclassificação e renomeação de gêneros e espécies bacterianas, além de permitir a classificação de micro-organismos não cultivados e facilitar a descoberta e classificação de novas espécies (WOO et al., 2008).

O presente trabalho objetivou avaliar a diversidade dessas bactérias nos frutos de *C. canephora* em três estádios de desenvolvimento, com a utilização de métodos moleculares, FAMES e sequenciamento de rDNA 16S dos isolados nos estudos de filogenia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem e desinfestação dos frutos de café

Foram coletadas amostras de frutos sadios de *Coffea canephora* nos estádios verde, verde cana e cereja, no Campo Experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, latitude 20°45'20" S, longitude de 45°52'40" W e 658 m de altitude. Na ocasião da coleta, as amostras foram assepticamente colocadas em sacos plásticos e transportadas em caixas com gelo, fracionadas em 200 gramas, embaladas a vácuo e armazenadas em congelador a -20 °C para análises posteriores. A amostragem correspondeu à coleta individual de frutos sadios, com pedúnculo do terço médio de cafeeiros da espécie, escolhidos durante a caminhada pela lavoura.

Os frutos sadios e com pedúnculo de cada um dos estádios foram desinfestados superficialmente (SAKIYAMA, 2001a), omitindo-se a etapa de flambagem, uma vez que os frutos avaliados apresentam o exocarpo mais fino. Para isso, realizou-se uma seleção aleatória na amostra e os frutos pré-selecionados foram lavados em água da torneira, água destilada adicionada de detergente neutro e em água destilada corrente para retirada das impurezas.

Em condições assépticas, cada um dos frutos foi submetido a etapas de lavagem, em duplicata: duas lavagens em água destilada, seguidas de agitação por 15 minutos em solução tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0) a fim de manter o equilíbrio osmótico; 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 % e agitação final por 15 minutos em solução tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0). No final da última etapa, para avaliação da eficiência do procedimento de desinfestação, alíquotas de 100 µL da última solução de lavagem dos frutos foram espalhadas em duplicata em meio de cultura R2A (REASONER & GELRDREICH, 1985) e as placas incubadas a 28 °C durante 72 horas. Além desse controle, os frutos desinfestados foram colocados em tubos contendo meio de cultura líquido R2A e incubados a 28 °C durante 72 horas. Após o

tempo de incubação, os frutos nos tubos em que não se observou crescimento microbiano foram os selecionados para o isolamento de bactérias endofíticas.

### **3.2 Isolamento de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café**

Com o material proveniente de oito frutos submetidos ao processo de desinfestação superficial realizou-se a determinação da densidade de bactérias endofíticas cultiváveis por fruto (UFC.fruto<sup>-1</sup>). Cada fruto desinfestado foi triturado separadamente em homogeneizador de tecido, em tubo contendo 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0).

A suspensão obtida foi filtrada em seringas contendo gaze e o filtrado diluído em séries de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> em tubos contendo tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,0) como diluente. Em triplicatas, alíquotas de 100 µL foram espalhadas em placas contendo o meio R2A com o uso de alça de Drigalsky, seguindo-se a incubação a 28 °C por 72 horas.

### **3.3 Análise do perfil de ácidos graxos**

Os isolados endofíticos foram agrupados por suas características morfológicas e em seguida identificados por meio da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos totais das células (FAME – “Fatty Acid Methyl Ester”), utilizando-se cromatografia gasosa acoplada ao sistema de identificação microbiana - The Sherlock<sup>®</sup> Microbial **Identification System** MIDI, Inc. (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 2000). Para essa identificação, cada isolado selecionado foi transferido para o meio de cultura TSA (Trypticase Soy, 30 g.L<sup>-1</sup>, ágar 15 g.L<sup>-1</sup>) e mantido em incubação a 30 °C por 24 horas. Para alguns isolados foi necessário estender o tempo de incubação para 48 horas.

Para a análise de FAME foi feita a remoção das células de colônias isoladas do terceiro quadrante da placa com o auxílio de uma alça de repicagem e transferência para o fundo de um tubo de ensaio. As células removidas foram submetidas à saponificação, por meio da adição de 1,0 mL de reagente 1 (hidróxido de sódio, 45 g; metanol, 150 mL; água *milli-Q*, 150

mL), agitação em vórtex por 5 a 10 segundos, incubação em banho-maria a 100 °C por 5 min, seguida de agitação e nova incubação a 100 °C por 25 minutos. Após a saponificação, a suspensão foi submetida ao processo de metilação dos ácidos graxos, para a formação dos ésteres metílicos, mediante a adição de 2,0 mL de reagente 2 (ácido clorídrico 6,0 N, 325 mL; metanol, 275 mL), agitação por 5 a 10 segundos e incubação em banho-maria a 80 °C por 10 min. A seguir, adicionou-se 1,25 mL de reagente 3 (hexano, 200 mL; éter metil ter-butil, 200 mL) e o volume total foi homogeneizado durante 10 minutos, por inversão dos tubos. A seguir, procedeu-se o descarte da fase aquosa. À fase orgânica, contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, adicionou-se 3,0 mL do reagente 4 (hidróxido de sódio, 10,8 g; água *milli-Q*, 900 mL), o volume total foi homogeneizado por seguidas inversões do tubo durante 5 minutos e 2/3 da fase aquosa final foram transferidos para o tubo e utilizados para injeção no cromatógrafo a gás. As identificações foram realizadas com base nos índices de similaridade (IS), sendo o isolado considerado como desconhecido quando o IS mostrava-se inferior a 0,2, como identificado em nível de gênero quando maior que 0,2 e, considerado como identificado em nível de espécie, quando maior que 0,5 (BUYER, 2003).

### **3.4 Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e análise de sequencias de rDNA 16S**

Os 140 isolados analisados por FAME/MIDI foram agrupados pelo programa do sistema MIDI, obtendo-se 51 isolados diferentes e não identificados por esse método. As culturas puras dos 51 isolados das bactérias endofíticas selecionadas foram ativadas por cultivo em placas contendo meio sólido LB (Luria-Bertani) e incubados a 30 °C por 24 horas. Após esse período, realizou-se a transferência das colônias para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo LB, seguindo-se a incubação por 24 horas sob agitação a 150 rpm.

O DNA total dos isolados das bactérias endofíticas foi extraído com Kit de purificação de DNA (PROMEGA™, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA precipitado foi lavado em etanol 70

%, secado em temperatura ambiente e ressuspendido em 30  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada. A presença do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8 % em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) e brometo de etídeo ( $0,02 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Alíquotas de 1  $\mu\text{L}$  das amostras de DNA foram acrescidas de 1  $\mu\text{L}$  de corante (0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % de xilenocianol e 15 % de ficol) para a aplicação no gel e a eletroforese efetuada por 1 hora a 70V, utilizando-se uma fonte Power Pac Basic™ BIO-Rad. O DNA de fago,  $\square$  clivado com a enzima de restrição HindIII (PROMEGA™, Madison, EUA), foi utilizado como padrão para a quantificação do DNA. O DNA no gel foi visualizado em sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene) e as imagens armazenadas em arquivos *Joint Photographic Experts Group* (.jpeg). A quantificação foi feita utilizando-se de marcadores de quantidade de DNA de fago  $\square$  na concentração de  $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e  $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$

A amplificação de rDNA 16S foi realizada utilizando-se um par de *primer* universais para Eubacteria F27/R1392 (HEUER et al., 1997; BLACKWOOD et al., 2005). As misturas das reações em volume final de 25  $\mu\text{L}$  continham aproximadamente 20 ng de DNA molde, tampão (PROMEGA™, Madison, EUA) sem corante, 2,25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 210 nM de cada primer, 250  $\mu\text{M}$  desoxinucleotídeos (dNTP's), 0,02 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA™, Madison, EUA). Em todas as reações foi utilizado um controle negativo sem DNA molde.

A reação de amplificação foi efetuada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany), programado para realizar a desnaturação inicial à 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto, extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72 °C e extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Os produtos resultantes da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,2 % p/v), em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM de EDTA) e brometo de etídeo ( $0,02 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (SAMBROOCK et al., 1989). Alíquotas de 1  $\mu\text{L}$  de DNA foram acrescidas de corante (0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % de xilenocianol e 15 % de ficol) para serem aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 1 hora a 70 volts, utilizando-se uma fonte Power Pac Basic™ BIO-Rad. O DNA de fago  $\square$



(lambda), clivado com enzima de restrição HindIII (PROMEGA™, Madison, EUA), foi utilizado como padrão para a quantificação de DNA obtido. O perfil de bandas de DNA no gel foi visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene), em arquivo .jpeg. A quantificação foi feita utilizando-se de marcadores de quantidade de DNA de fago lambda nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ . Para visualizar a quantidade de DNA do fragmento amplificado, 1  $\mu\text{L}$  do marcador de quantidade de DNA de fago lambda foi utilizado como referência.

Após a quantificação, 100 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  dos produtos não purificados de PCR, juntamente com o primer universal 27F, foram enviados para sequenciamento na empresa MACROGEN Inc.. As identidades das sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as armazenadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). O alinhamento das bases foi realizado por meio do programa Clustal W e a análise de correção com o programa MEGA 4.0. As inferências filogenéticas foram obtidas por método de máxima parcimônia com teste *bootstrap* (1000 réplicas). As árvores para as análises da filogenia das sequências foram reconstruídas com o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

A diversidade dos isolados na biblioteca foi investigada por análise de rarefação (HECK et al., 1975), com uso do programa PAST 1.4 (HAMMER et al., 2001).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de desinfestação superficial dos frutos de *Coffea canephora* nos estádios verde, verde-cana e no maduro mostrou-se eficaz, uma vez que os tubos contendo o meio R2A que foram inoculados com os frutos desinfestados, ou com alíquotas da última solução de lavagem, não apresentaram crescimento microbiano após 72 horas de incubação a 28 °C. Essa demonstração é de fundamental importância por assegurar a natureza endofítica das bactérias isoladas dos frutos.

A densidade populacional de bactérias endofíticas cultiváveis em meio R2A nos frutos de *C. canephora* variou de  $2,80 \cdot 10^3$  a  $8,20 \cdot 10^6$  UFC.fruto<sup>-1</sup> em frutos verdes, de  $1,6 \cdot 10^4$  a  $9,8 \cdot 10^6$  UFC.fruto<sup>-1</sup> no estágio verde cana e de  $2,8 \cdot 10^3$  a  $6,7 \cdot 10^6$  UFC.fruto<sup>-1</sup> em frutos maduros. As médias dos valores nos três estádios não diferiram entre si e expressam densidades de populações endofíticas indígenas as quais se encontram, em ordem de grandeza, similares as da maioria das espécies vegetais, ou seja, variando de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/g de tecido fresco (HALLMAN et al., 1997).

Em frutos de *Coffea arabica* em estádios distintos de desenvolvimento, a densidade de bactérias endofíticas, expressa em UFC/g, variou entre  $10^2$  a  $10^4$  UFC/g de fruto (SAKIYAMA, 2001b). As médias das densidades dessas bactérias em frutos no estágio cereja de cultivares de *C. arabica* de lavouras da Zona da Mata Norte em Minas Gerais em altitudes entre 676 até 1.187 metros, em UFC.fruto<sup>-1</sup>, variaram de  $1,2 \cdot 10^4$  a  $6,2 \cdot 10^6$  (CORDERO, 2008). O autor demonstrou que as densidades são influenciadas significativamente tanto pela cultivar como também pela altitude da lavoura. As densidades determinadas em frutos de *C. canephora* foram consideradas como equivalentes às determinadas em *C. arabica* por Cordero (2008).

Os resultados do isolamento demonstraram uma variada diversidade morfológica de colônias, totalizando 21 morfotipos entre os 140 isolados obtidos.

Pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) sistema Sherlock<sup>®</sup> (MIDI), foi possível relacionar 58 dos 140 isolados com perfis

existentes na biblioteca de referência armazenada em banco de dados para micro-organismos aeróbios de amostras ambientais do sistema (TSBA 50 5.00). Os perfis revelados foram comparáveis aos de cinco espécies incluídas em Firmicutes, todas correspondentes a *Bacillus* - *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* - e também uma Gamma-Proteobacteria identificada como *Shigella sonnei*. Após agrupamentos pelo sistema MIDI (Figura1), 51 isolados foram identificados com os dados obtidos por sequenciamento do rDNA 16S, realizados pela MACROGEN Inc.. Em *C. arábica*, as presenças de *B. subtilis* e *B. megaterium* em frutos e de *B. cereus* em folhas da planta foram anteriormente relatadas (VEGA et al., 2005). Essa última espécie é descrita como endofítica e eficiente para o controle da ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix*, a principal doença do cafeeiro e responsável por perdas de até 40 % na produtividade. Essa bactéria, quando coloniza as folhas da planta, impede a germinação do uredósporos pela secreção de substâncias antimicrobianas (SHIOMI et al., 2006). *Bacillus cereus* é também descrita como produtora de quitinases ativas contra diversos patógenos de plantas, a exemplo do controle do crescimento de *Fusarium roseum* em tubérculos de batata (SADFI et al., 2001). Outras espécies desse gênero, *B. thuringiensis* e de *B. licheniformis*, isoladas da rizosfera de plantas de café arábica (MULETA et al., 2009) também apresentam tal capacidade (SADFI et al., 2001). *Bacillus licheniformis* é espécie descrita como capaz de produzir peptideos cíclicos e aminoglicosídeos, os quais induzem a resistência sistêmica na planta contra doenças (WANG et al., 2009). A literatura consultada não registra essas duas últimas espécies, *B. thuringiensis* e *B. licheniformis*, como endofíticas em frutos de cafeeiros ou de outras plantas, constituindo o presente trabalho na primeira comprovação da natureza endofítica de bactérias dessas espécies em frutos de café.

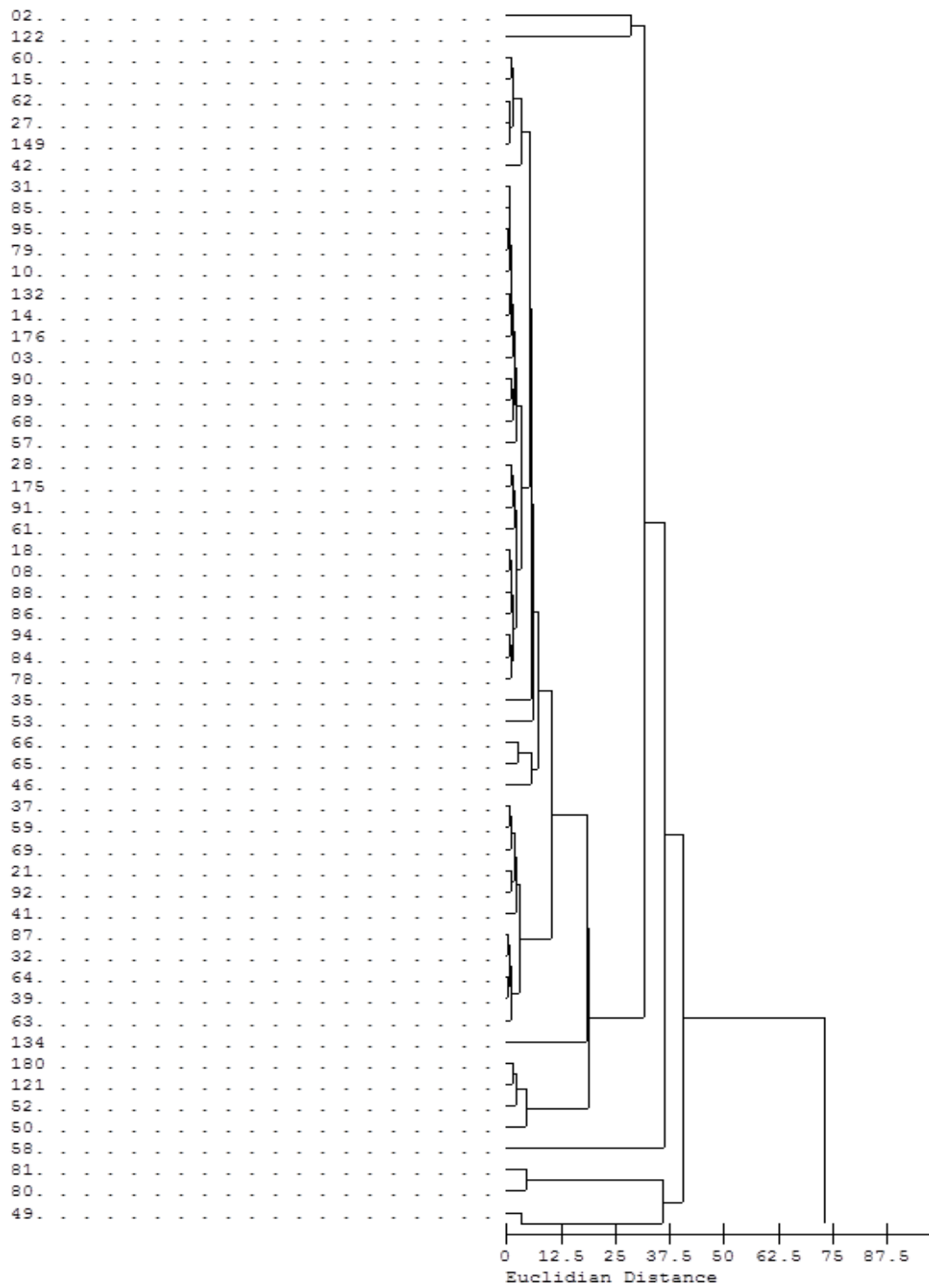
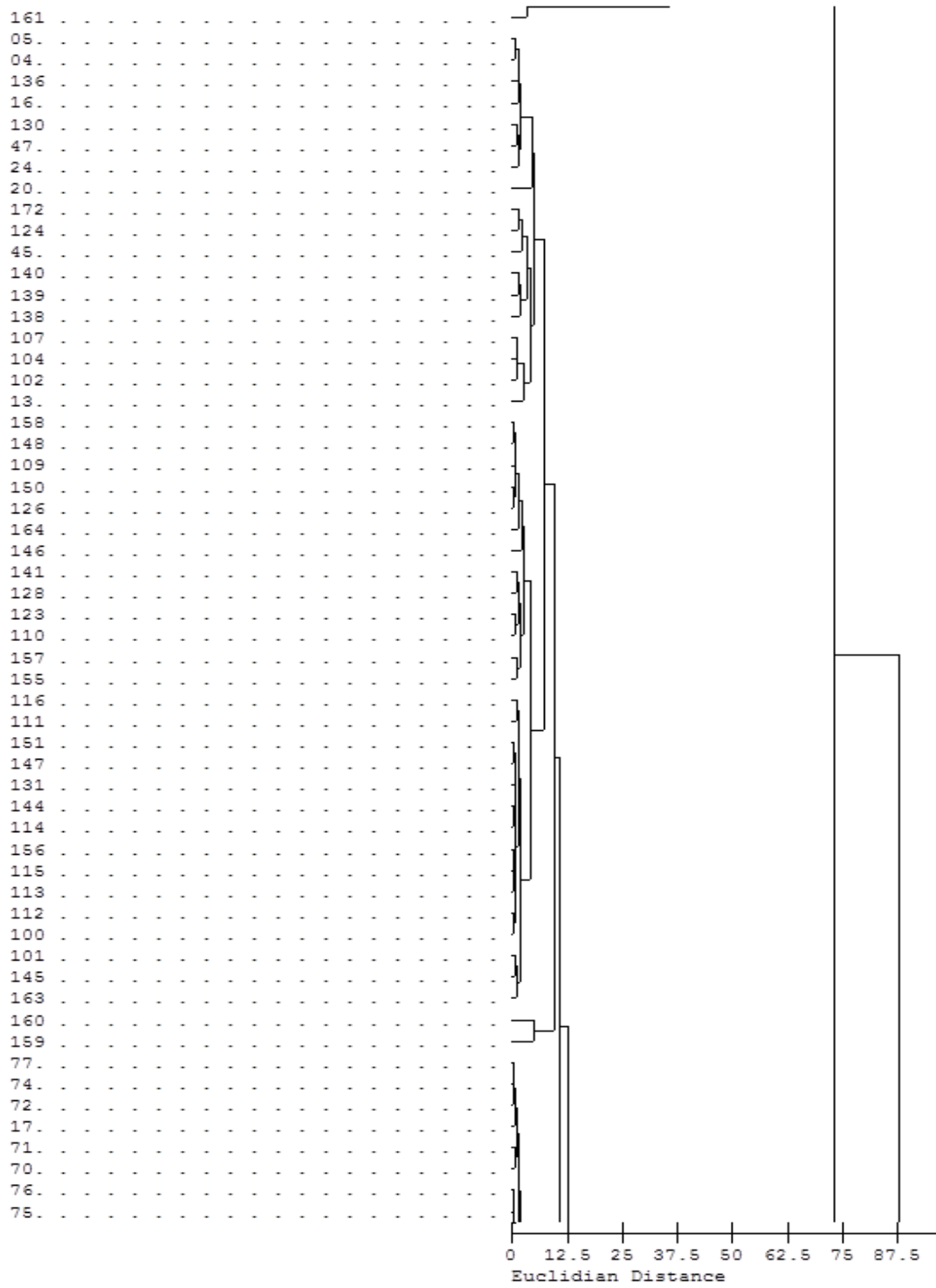


Figura 1: Agrupamento dos isolados de bactérias endofíticas de *Coffea canephora* em três estádios de desenvolvimento identificados por FAME.

Continuação da figura 1





As árvores filogenéticas construídas pelo método de Máxima Parcimônia, com 1000 réplicas, utilizadas para agrupar as sequências mostraram isolados pertencentes a grupos filogenéticos correspondentes aos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Alfa- e Gamma-Proteobacteria (Figuras 2, 3, 4, 5). Atualmente, a abordagem polifásica é a de escolha (VANDAMME et al., 1996), por tornar as análises mais robustas pela adição à coerência morfológica e bioquímica das espécies, reforçadas por resultados de sequenciamento e reconstrução filogenética (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Máxima parcimônia é o método mais utilizado para reconstrução filogenética (PARK et al., 2010). Ele é baseado no pressuposto que as melhores árvores são aquelas que apresentam o menor número de mudanças e que minimiza o número de mutações ao longo de seus ramos. Assim, uma característica compartilhada por dois taxa é considerada ser herdada do último ancestral comum a ambos. O método ainda assume que o critério de parcimônia leva ao maior número total de acertos da árvore verdadeira, quando minimiza o número de passos evolutivos aceitos (SCHNEIDER, 2007). Esse método proporciona análises robustas quando os ramos das árvores são curtos, o que ocorre se as sequências são proximamente relacionadas ou se o táxon amostrado é denso (MAURO et al., 2010). A parcimônia, ainda apresenta maior poder estatístico que o método de Neighbor-joining e é quase sempre mais precisa (RICE & WARNOW 1997). Além disso, quando comparada a Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana apresenta vantagem quando forte suporte é requerido para aceitar a árvore como resolvida (KOLACZKOWSKI & THORNTON, 2004).

No que se refere à Firmicutes, todos os isolados agrupados apresentaram valores de bootstrap considerados como significativos e moderados, uma vez que quando acima de 95 são assumidos como significativos; os entre 70 e 94 como moderados; e fracos, os abaixo de 70 (SCHNEIDER, 2007). Os bootstraps referentes ao isolado LEM 58, com valor de 81, LEM 97, com 86 (Figura 2), são considerados moderados. Entretanto, esses ramos apresentam sustentação filogenética pelo valor de bootstrap que une os dois, de 99, o que significa que eles fazem parte do

gênero *Bacillus*. Entre as bactérias endofíticas, esse gênero está entre os mais comumente encontrados, sendo predominante no solo, na rizosfera e nas comunidades endofíticas das raízes (HALLMAN et al., 1997).



Tabela 1: Resultados das comparações entre as sequências de rDNA 16S dos isolados de Bactérias endofíticas cultiváveis dos frutos de *Coffea canephora* com as depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) com o número do acesso, o “E-value”, valor de identidade e estágio de maturação.

Isolado	Sequencia do Banco de Dados (NCBI)	Número do Acesso	“E-value”	Identidade %	Estádio de maturação
LEM166LEM167	<i>Microbacterium sp.</i>	HM036663.1	0	99	Cereja
LEM169LEM179	NII-1012				
LEM171LEM168	<i>Kocuria turfanensis</i> strain GJM817	HM209734.1	0	100	Cereja
LEM38LEM40	<i>Ochrobactrum sp.</i> MJ25	GQ250447.1	0	100	Verde
LEM170	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	FJ581441.1	0	100	Cereja
LEM168	<i>Janibacter melonis</i> strain MA1B-GFJ	FJ811878.1	0	100	Cereja
LEM165	<i>Chryseobacterium sp.</i> MH28	EU182856.1	0	100	Cereja

Continuação da tabela 1

<b>LEM80</b>	<i>Bacillus pumilus</i> strain DYJL55	HQ317196.1	0	100	Verde-cana
<b>LEM56</b>	<i>Bacillus pumilus</i> strain FWC42	EU833939.1	0	100	Verde
<b>LEM58 LEM27 LEM83 LEM93 LEM13 LEM36LEM55 LEM41LEM34</b>	<i>Bacillus subtilis</i> strain CH1	FR773878.1	0	100	Verde- cana/Verde- cana
<b>LEM97</b>	<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> strain EII-5	FJ613553.1	0	99	Verde-cana
<b>LEM29</b>	<i>Bacillus megaterium</i> strain P3	HQ423376.1	0	100	Verde
<b>LEM25LEM26</b>	<i>Paenibacillus</i> sp. J16-10	AM162327.1	0	99	Verde
<b>LEM134</b>	<i>Bacillus firmus</i>	HQ285922.1	0	100	Cereja

Continuação da tabela 1

<b>LEM81 LEM96 LEM98</b>						
<b>LEM155LEM159LEM45</b>						
<b>LEM146 LEM153LEM</b>						
<b>157LEM 30LEM 58LEM169</b>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	GQ496665.1	0	99	Verde/Verde-cana/cereja	
	strain NFS18					
<b>LEM01 LEM22</b>						
<b>LEM5 LEM47 LEM20</b>	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain HDYM-06	EF428236.2	0	99	Verde	
<b>LEM44</b>	<i>Escherichia coli</i> strain JCM12	GQ202138.1	0	100	Verde	
<b>LEM17</b>	<i>Citrobacter freundii</i> strain F1 16S	FJ608234.1	1,00E-76	77	Verde	
<b>LEM67</b>	<i>Pantoea vagans</i> C9-1	CP002206.1	0	97	Verde-cana	
<b>LEM145</b>	<i>Pantoea eucrina</i>	HQ455824.1	0	100	Cereja	

LEM - Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade

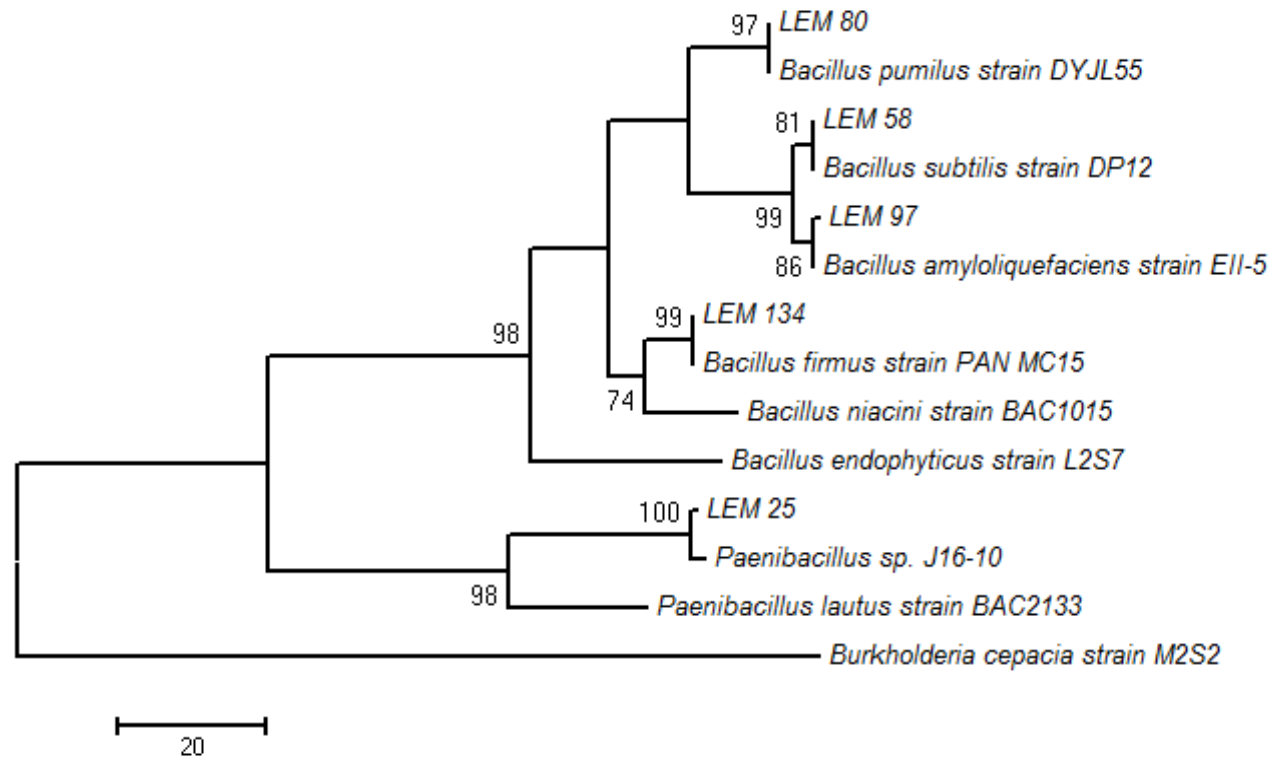


Figura 2: Relação filogenética de isolados de bactérias endofíticas cultiváveis de frutos *Coffea canephora* do filo Firmicutes, inferida pelo método da Máxima Parcimônia. Os valores nos pontos de ramificações representam o *bootstrap* para 1000 replicações. *Burkholderia cepacia* M2S2 (NCBI) foi utilizada como grupo externo.

LEM 134 com valor de *bootstrap* 99, agrupou com *Bacillus firmus*. LEM 25 agrupou com *Paenibacillus lautus*, valor de *bootstrap* 98, e LEM 80 agrupou com *B. pumilus* e *bootstrap* de 97, todos apoiados significativamente (Tabela 1). LEM 97 apresentou alta identidade com *Bacillus amyloliquefaciens* (Tabela 1). Essa bactéria é encontrada em solos e é relatada como endofítica isolada de caule de *Chelidonium majus*, conhecida como erva-andorinha (GORYLUK et al., 2009). Ela apresenta potencial para utilização efetiva em biorremediação terrestre para o éter metil terc-butil (MTBE) (MAUBERT et al.; 2003). Os autores ainda relatam que a bactéria foi capaz de crescer nesse composto e em seu maior metabólito, álcool terc-butil (TBA) como única fonte de carbono, com crescimento significativo associado com o desaparecimento simultâneo de MTBE do meio de crescimento. Pela habilidade em formar esporos, podem ser adaptáveis a formulações comerciais de inóculos e aplicação no campo. O uso de formulações contendo *B. firmus* foi considerado promissor no controle do nematóide *Meloidogyne incognita*, um patógeno de diversas plantas. Possivelmente, a bactéria secreta toxinas que danificam os ovos do nematoide (TEREFE et al., 2009). Além desse, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. licheniformis* apresentaram essa capacidade, sendo o primeiro o mais efetivo (MEKETE e al., 2010).

Bactérias do gênero *Bacillus* já foram relatadas como endofíticas, Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, com alta tolerância a condições ambientais adversas e colonizadoras de diversas plantas. Podem promover o crescimento vegetal pela produção de giberelinas e auxinas, uma característica marcante de *B. pumilus*, além de fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato (FORCHETTI et al., 2007). *Bacillus sp.* apresenta capacidade de produzir enzimas pectinolíticas, principalmente poligalaturonase e pectina liase, além de atividade muito baixa de metiltransferase. Atribui-se à alta capacidade pectinolítica de *Bacillus sp.* durante a fermentação do fruto do cacauzeiro o aumento da velocidade do processo e a melhor qualidade do produto final (OUATTARA et al., 2008). Em estudos realizados na Indonésia, essas espécies permaneceram em altas populações até o final do processo, quando a abundância de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. pumilus* foram mais significativas, com essa

última apresentando dominância (ARDHANA & FLEET, 2003). Todas as quatro espécies foram encontradas como endofíticas cultiváveis em frutos de *C. canephora* no presente estudo (Tabela 1, Figura 2). Considerando a presença e distribuição dessas quatro espécies nos três estádios de desenvolvimento dos frutos, a indagação lógica será sobre a contribuição delas na associação.

A relação filogenética de seis dos isolados das bactérias endofíticas de espécies dos filos Actinobacteria, Alfa-Proteobacteria e Bacteroidetes (Figura 3) mostra altos valores de *bootstrap* para os agrupamentos, um apoio significativo à análise. Os resultados do sequenciamento demonstram que quatro dos isolados, LEM166; LEM 167; LEM 169 e LEM179 são *Microbacterium*, com 99 % de identidade, todos provenientes de isolamento de frutos de *C. canephora* no estágio cereja (Tabela 1). Deles, apenas LEM166 foi utilizado para a reconstrução filogenética e agrupou com *Microbacterium flavascens* com alto *bootstrap* (Figura 3). O gênero *Microbacterium* foi relatado como endofítico de raízes de tomate (MARQUEZ-SANTACRUZ et al., 2010) e em grãos de milho (ZINNIEL et al., 2002). Trata-se de bactérias Gram-positivas de alto conteúdo GC no DNA, quimiorganotróficas, aeróbias, com alguns representantes que fazem fermentação e outros que produzem ácidos em meio com peptona quando utiliza glicose e outros açúcares (SMEATH et al., 1998). Em grãos maduros de *C. arabica* foram isolados duas espécies desse gênero: *Microbacterium barkeri* e *M. luteolum* (CORDERO, 2008). Com o presente trabalho, mais uma espécie de *Microbacterium* é acrescida ao universo das endofíticas isoladas em fruto de cafeeiro, agora em *C. canephora*.

Outra *Actinobacteria* encontrada nesse estudo corresponde aos isolados LEM 171 e 178, os quais apresentaram alta identidade com *Kocuria turfanensis* (Tabela 1) e alta relação filogenética com *Kocuria sp.*(Figura 3). Bactérias desse gênero eram descritas como *Micrococcus* e são caracterizados como cocos Gram-positivos, aeróbios e não-encapsulados (ZHOU et al., 2008). Seus habitats incluem pele de mamíferos, solo, rizoplano, água e sedimentos marinhos (KIM et al., 2004). *Kocuria palustris* e *Kocuria rhizophila* foram descritas como novas espécies em interação com o rizoplano de *Typha angustifolia* (KOVÁCS et al., 1999). *Kocuria sp.* foi

relatada como endofítica em folhas de cafeeiro arábica (VEGA et al., 2005), cana de açúcar (VELASQUEZ et al., 2008) e banana (THOMAS & SOLY, 2009).

*Kocuria turfanensis* já foi isolada do ar na China (ZHOU et al., 2008 ) e de solos da Índia (dados não publicados-NCBI). Contudo, não foram encontrados relatos da espécie em interação endofítica. O agrupamento do isolado LEM 171 com essa bactéria, pelo valor de *bootstrap* 97 que os une, demonstra sustentação filogenética (Figura 3).

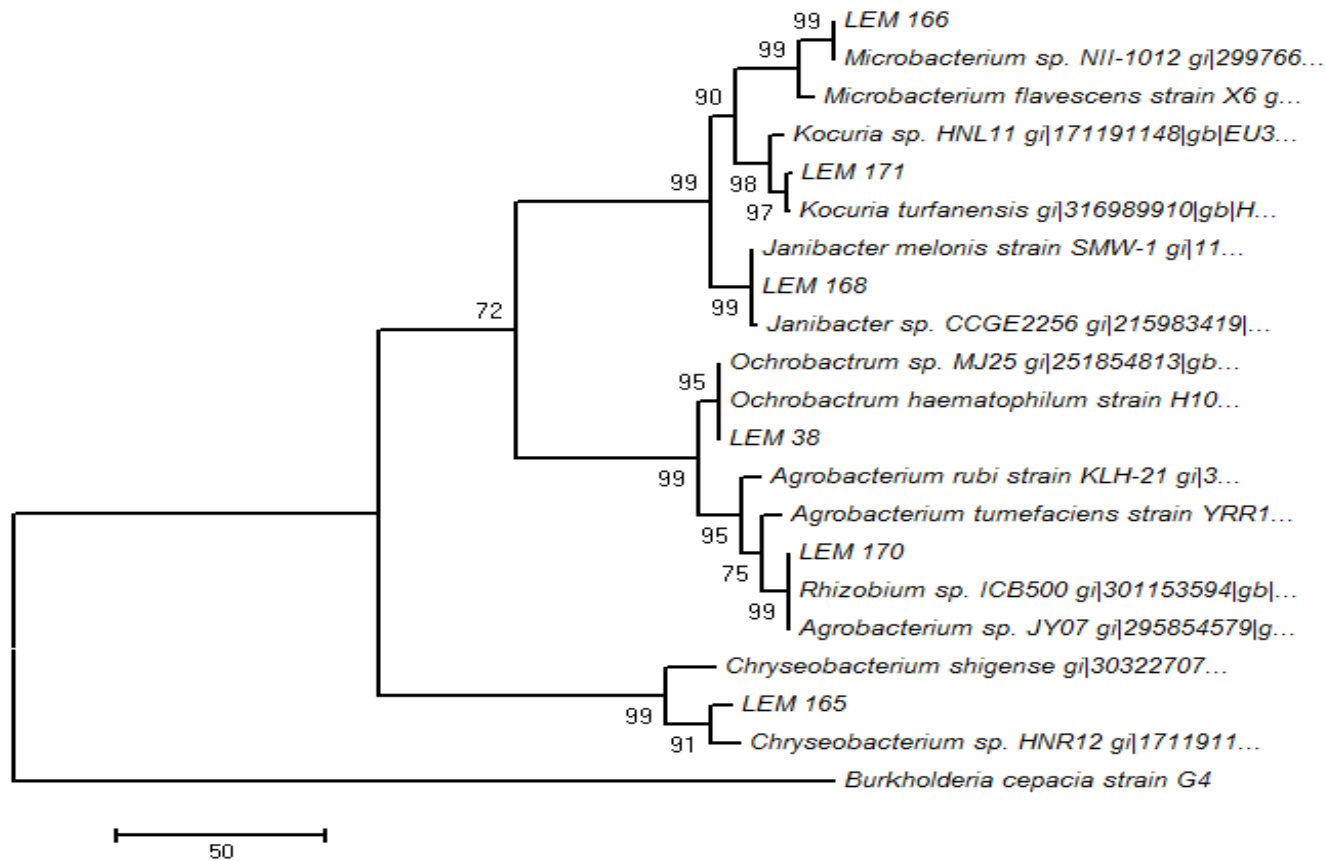


Figura 3: Relação filogenética de isolados de bactérias endofíticas cultiváveis de frutos de *Coffea canephora* dos filos Actinobacteria, Alfa-Proteobacteria e Bacteroidetes inferida pelo método da Máxima Parcimônia. Os valores nos pontos de ramificações representam o *bootstrap* para 1000 replicações. *Burkholderia cepacia* G4 (NCBI) foi utilizada como grupo externo. *Burkholderia cepacia* foi utilizada como grupo externo.



LEM 168 cuja identidade é de 100 % com *Janibacter melonis*, é também mais uma incluída entre as Actinobacteria endofíticas cultiváveis isoladas de frutos de *C. canephora* (Tabela 1). Esse isolado, na reconstrução da filogenia, agrupou com *Janibacter sp.* e *J. melonis*, sendo o *bootstrap* 99 (Figura 3). Essa espécie é endofítica em raízes da planta medicinal *Maytenus austroyunnanensis* (QIN et al., 2009) e descrita como cocos Gram-positivos, aeróbios e não móveis (YOON et al., 2004). Os autores demonstraram que *J. melonis* é responsável pela deterioração anormal do melão oriental (*Cucumis melo*), e causa perdas econômicas significativas na Coreia do Sul (YOON et al., 2004). No entanto, ela não foi isolada de frutos de café em processo de deterioração, uma vez que todos os coletados de *C. canephora* apresentavam-se sadios. LEM 168, *J. melonis*, é espécie endofítica em frutos de cafeeiro robusta, identificada por sequenciamento do rDNA 16S, com suporte do valor de identidade (Tabela 1) e a filogenia molecular pelo alto valor de *bootstrap* (Figura 3).

A sequência de rDNA 16S do isolado LEM 170 apresentou identidade de 100 % com a de *Agrobacterium tumefaciens*, e LEM 38, também com 100 % com a de *Ochrobactrum sp.*, ambas Alfa-Proteobacteria (Tabela 1). Essas bactérias já foram isoladas da rizosfera de plantas de café arábica na Etiópia (MULETA et al., 2009) e também em raízes de café (MEKETE et al., 2009). No entanto, não foram encontrados relatos delas como endofíticas em frutos de cafeeiro, como está demonstrado para *C. canephora* no presente estudo.

O isolado LEM 170, identificado como *Agrobacterium tumefaciens* (Tabela 1), está relacionado genotipamente com os de *Agrobacterium* e *Rhizobium*, como mostrado pelo alto *bootstrap* no clado em que se agrupou (Figura 3). Os dois gêneros apresentam perfil quimiotaxonômico similar e autores sugerem a combinação deles em único gênero: *Rhizobium* (YOUNG et al., 2001). *Agrobacterium tumefaciens* é encontrada em solos e considerada como fitopatogênica. Entretanto, existem relatos dela como endofítica em tubérculos de batata (STURZ et al., 1999) e também em caules de cana de açúcar, como fixadora de nitrogênio (XING et al., 2006).

O isolado LEM 38, que se agrupou com *Ochrobactrum sp.* e *Ochrobactrum haematophilum*, forma um clado com proximidade filogenética ao de *Agrobacterium*, com valor de *bootstrap* 99 (Figura 3). A proximidade é

justificada pelas características similares a *A. tumefaciens*. Bactérias desse gênero são bastonetes curtos, Gram-negativos, móveis e com número variável de flagelos, polares ou peritríquios (LEBUHN et al., 2000). *Ochrobactrum* é também endofítica em sementes de soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2009) onde apresenta ação antagônica sobre três fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum* e *Cercospora kikuchii* (ASSUNPÇÃO et al., 2009).

A sequência do rDNA 16S do isolado LEM 165 correspondeu a *Chryseobacterium sp.* (Tabela 1), um dos gêneros em Bacteroidetes. Essas bactérias são Gram-negativas, não-móveis, quimiorganotróficas, com estirpes distribuídas em habitats como solo, água doce, esgoto e em associação com plantas, entre outros (CHO et al., 2010). Segundo esses autores, algumas espécies do gênero isoladas da rizosfera são capazes de reduzir nitrato a nitrito. A descrição de uma nova espécie requer estudos de taxonomia polifásica para a caracterização fenotípica, envolvendo comparações de propriedades fisiológicas e perfil de ácidos graxos das células, complementados por análises de sequências de genes rRNA 16S de isolados em comparações filogenéticas, além de estudos de hibridações DNA-DNA entre os próximos no clado, a exemplo do realizado para a descrição de *Chryseobacterium luteum* (BEHRENDT et al., 2007). As relação filogenética do LEM 165 com *Chryseobacterium sp* HNR12 em clado com *Chryseobacterium shigense* são suportadas pelos altos valores de *bootstrap* (Figura 3).

Em relação ao filo Gamma-Proteobacteria, seis dos isolados dos frutos de *C. canephora* – LEM 67, LEM 145, LEM 01, LEM 44, LEM 05 e LEM 17, por comparações ao rDNA 16S são espécies de Enterobacteriaceae, a saber: *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter hormaechei*, *Pantoea eucrina* e *Pantoea vagans*, *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* (Tabela 1). À exceção dessa última, todas as outras apresentaram valores altos de identidade. Bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Pantoea*, além de *K. oxytoca*, já foram anteriormente isoladas e descritas como endofíticas em frutos de *C. arabica* (GENARI, 1999; SAKIYAMA, 2001a; CORDERO, 2008), sendo agora confirmada a presença delas também em *C. canephora*. Em análise da filogenia dos isolados, pelo método da Máxima Parcimônia, os

altos valores de *bootstraps* nos cladogramas (Figura 4) confirmam todos os seis como da família Enterobacteriaceae, o que conferiu maior confiabilidade às identidades encontradas (Tabela 1). Entretanto, análises filogenéticas para Enterobacteriaceae podem ser feitas utilizando-se de outras sequências menos conservadas, como *dnaJ* e *gyrB*, utilizadas como alternativa ao rDNA 16S por ser essa muito conservada e proporcionar agrupamentos não esperados em Gamma-Proteobacteria (DAUGA, 2002; NHUNG et al., 2007).

A endofítica cultivável LEM 01, com 98 % de identidade com a sequência de *K. oxytoca* (Tabela 1), agrupou com *Enterobacter gergoviae* pela análise filogenética (Figura 4). *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp., por ocuparem nicho ecológico similar, estão sujeitas à transferência lateral de genes e assim nas análises filogenéticas, as sequências de ambos os gêneros podem ser agrupados (DAUGA et al., 2002). *Klebsiella oxytoca*, já foi descrita como endofítica de frutos sadios de *C. arabica* tendo sido demonstrada a sua capacidade de produzir pectato-liase intracelularmente quando em crescimento em meio mínimo adicionado de pectina cítrica (GENARI, 1999).

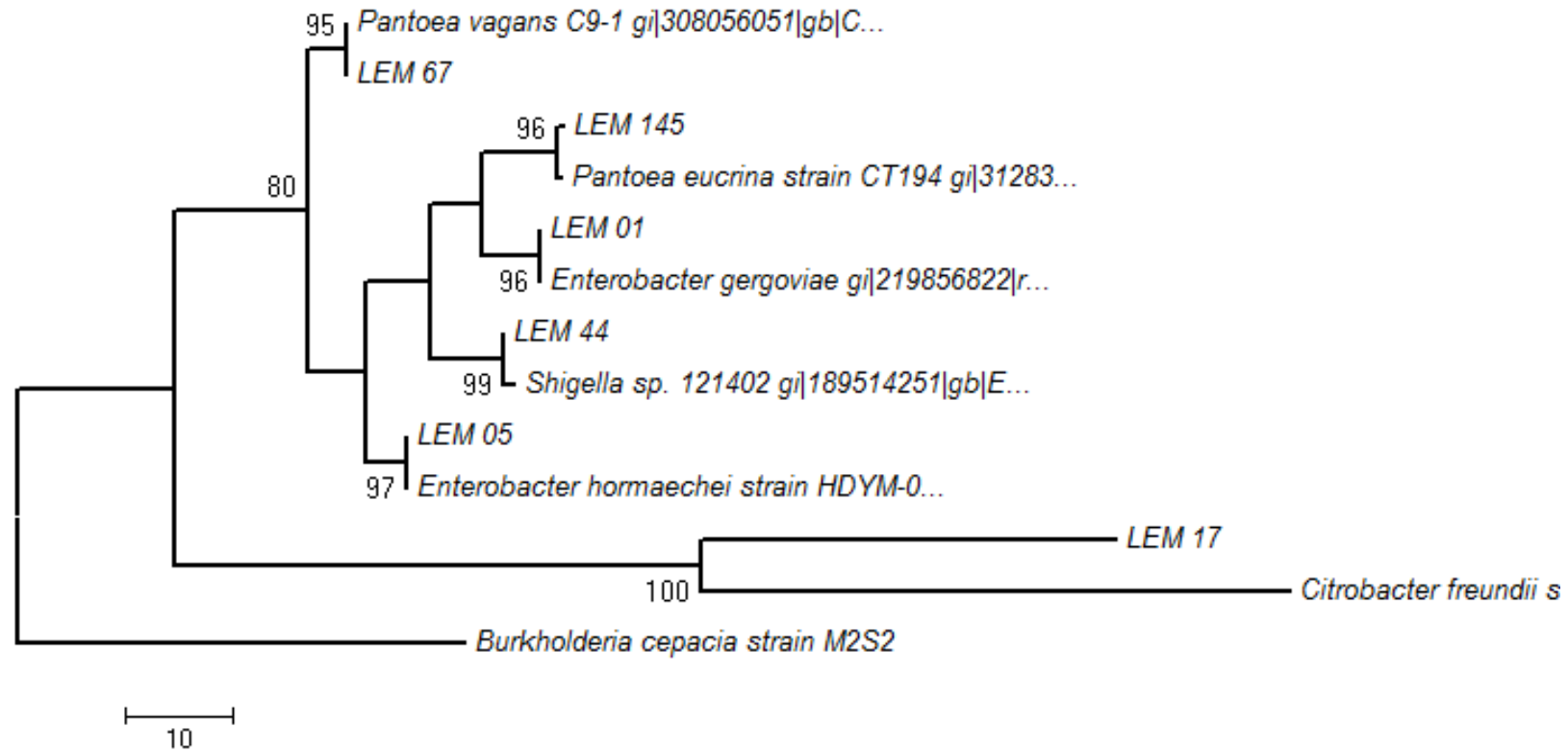


Figura 4: Relação filogenética de isolados de bactérias endofíticas cultiváveis de frutos de *Coffea canephora* do filo Gamma-Proteobacteria inferida pelo método da Máxima Parcimônia. Os valores nos pontos de ramificações representam o *bootstrap* para 1000 replicações. *Burkholderia cepacia* M2S2 (NCBI) foi utilizada como grupo externo.

O isolado LEM 44 agrupou com *Shigella* (Figura 4). Essa bactéria já foi descrita como presente em solos (SABAT et al., 2000), mas não em interação com plantas. Outro representante de Gamma-Proteobacteria isolado de frutos sadios de *C. canephora* é LEM 05, com altos valores de identidade (Tabela 1) e *bootstrap* (Figura 4) quando agrupada com *Enterobacter hormaechei*. Essa espécie é Gram-negativa, tolerante a sais e já foi isolada da rizosfera de trigo (EGAMBERDIEVA et al., 2008). Ela também é descrita como endofítica em raízes de milho. Nessa planta, ela reduz a infecção por *Fusarium verticillioides* e o conteúdo de fumosina (PEREIRA et al., 2010), uma micotoxina com efeitos tóxicos em animais, principalmente equinos e suínos, e com propriedades cancerígenas em ratos (DUVICK, 2001).

Os altos valores de identidade (Tabela 1) e *bootstrap* (Figura 4) apresentados por LEM 67 com *Pantoea vagans* confirmam a identificação desse isolado como pertencente a essa espécie. Essa bactéria é Gram-negativa e caracterizada como epifítica de várias plantas, além de agente de biocontrole da ferrugem do fogo, uma doença de peras e macieiras causada por *Erwinia amylovora* (SMITS et al., 2010). Entretanto, não existe relato dela como endofítica, sendo esse o primeiro. Bactérias do gênero *Pantoea* são frequentemente associadas às plantas e colonizam rizosfera, sementes e outras partes vegetais. Em arroz, por exemplo, apresenta capacidade de promoção de crescimento, pela fixação de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento e solubilização de fosfato (VERMA et al., 2001). Ela também foi descrita em interação com folhas e sementes de cafeeiro cultivadas no Havaí, Colômbia e México (VEGA et al., 2005).

Para a visão do relacionamento dos dados, considerando o número de clones e as análises das endofíticas cultiváveis isoladas de frutos de *C. canephora* em três estádios de maturação, de acordo com os perfis de ácidos graxos e sequenciamento do rDNA 16S, foi construída uma biblioteca contendo os 22 representantes dos filos Bacteroidetes, Alfa-Proteobacteria, Actinobacteria, Gamma-Proteobacteria e Firmicutes (Figura 5). O gênero predominante foi *Bacillus*, sendo *B. subtilis* a espécie dominante nos estádios verde e verde-cana, porém no de cereja o predomínio foi da *Klebsiella oxytoca* (Figura 5).

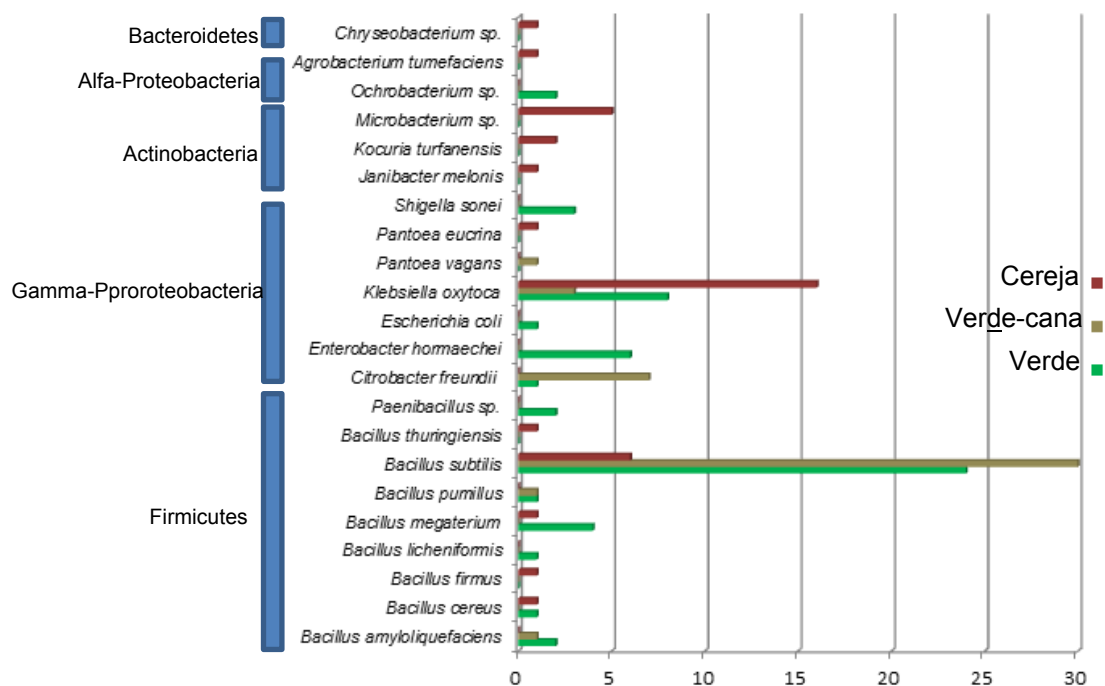


Figura 5: Filos e clones de Eubacteria detectados em frutos de *C. canephora* em três estádios de maturação de acordo com os perfis de ácidos graxos e sequenciamento do rDNA 16S.

A maior diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis ocorreu em frutos verdes, seguida das em frutos maduros e em verde-cana (Tabela 2). Um dos gêneros que provavelmente mais contribuiu para isso foi *Bacillus*. Contudo, considerando que no último estágio de desenvolvimento dos frutos a concentração de cafeína é maior (CHAVES et al., 2004; ALMEIDA, 2007) pode ser inferido que o predomínio da *K. oxytoca* em frutos maduros se deu em razão dos efeitos da concentração desse composto. É relatado que as bactérias Gram-positivas, quando na presença de cafeína, podem sofrer lise celular, em razão da inibição de funções como a síntese de proteínas (DASH & GUMMADI., 2008). Além disso, já foi demonstrado o predomínio de representantes do gênero *Klebsiella* na fermentação de café africano, como resultado de variações no mesocarpo, o que pode afetar o grau de polimerização dos componentes da pectina, influenciando na seleção do grupo microbiano predominante (OLIVEIRA et al., 2001). *K. oxytoca* apresenta capacidade para transportar e metabolizar celobiose, celotriose, xilobiose, xilotriose, sacarose e todos os outros açúcares monoméricos presentes na biomassa lignocelulósica (GRANGE et al., 2010). Como a

sacarose representa quase a totalidade de açúcares livres em grãos maduros de café, (ROGERS et al., 1999), é possível que o predomínio de *K. oxytoca* nesse estágio de desenvolvimento seja em razão da concentração desse substrato. Por outro lado, nos estádios de desenvolvimento verde e verde cana há maior concentração de polissacarídeos (TARZIA et al., 2010), e o predomínio de *B. subtilis* possivelmente se deve à característica dessa bactéria em secretar enzimas despolimerizantes, as quais degradam polissacarídeos (ZHANG & ZHANG, 2010).

Tabela 2. Riqueza e diversidade de bactérias endofíticas isoladas de frutos de *Coffea canephora* em três estádios de desenvolvimento.

Variáveis	-----Estádios de desenvolvimento-----		
	Verde	Verde-cana	Cereja
Indivíduos	56	43	37
Riqueza	13	6	11
Shannon	1,942	0,995	1,866

A literatura registra melhor desempenho de extratos de *C. canephora* como agentes antimicrobianos que os provenientes de *C. arabica*, o que pode resultar também em diferenças na diversidade da microbiota endofítica em frutos dessas duas espécies de plantas. Esses compostos também apresentaram ação inibitória em bactérias da cavidade oral pertencente ao filo Firmicutes, como *Streptococcus mutans* (ANTÔNIO et al., 2010). Por outro lado, a cafeína não é tão efetiva assim para outras espécies, como *Klebsiella oxytoca* (ALMEIDA et al., 2006).

A curva de rarefação dos isolados provenientes dos frutos verdes atingiu o “plateau”, enquanto a dos verdes-cana e cereja mostraram uma tendência a entrar nesse estágio (Figura 6). O declínio na taxa de detecção

de sequências, mostrado pelas curvas, indica que grande parte da diversidade presente nos grãos foi detectada.

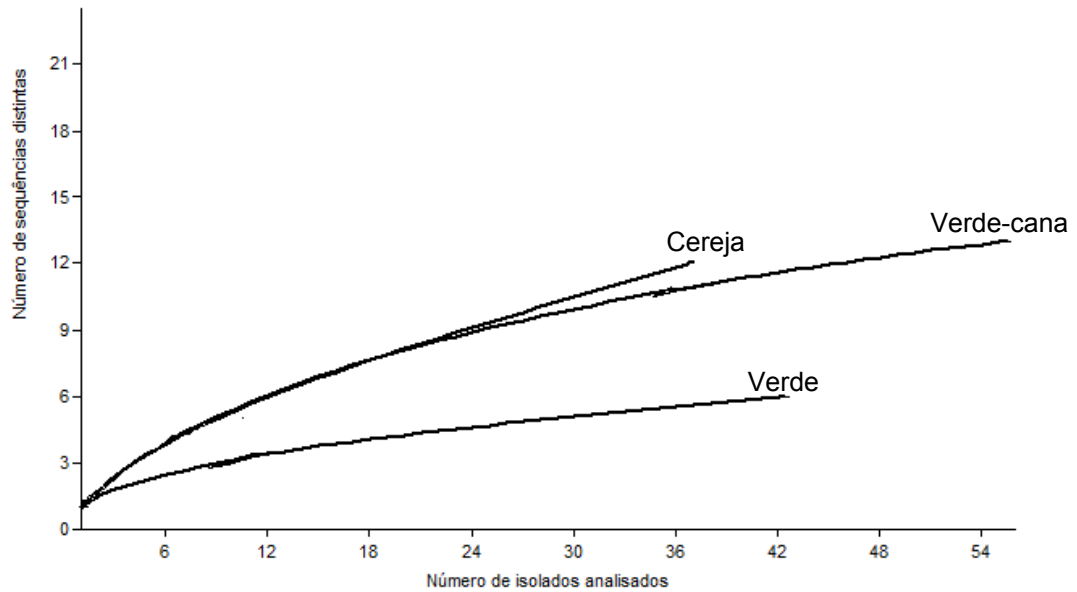


Figura 6: Curvas de rarefação representando a diversidade de sequências esperadas dos isolados de bactérias endofíticas provenientes de frutos de café nos estádios verde, verde-cana e cereja.



## 5. CONCLUSÕES

Os perfis revelados pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) sistema Sherlock<sup>®</sup> (MIDI) foram comparáveis aos de cinco espécies incluídas em Firmicutes, todas correspondentes a *Bacillus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*, e também uma Gamma-Proteobacteria, identificada como *Shigella sonnei*.

A análise por sequenciamento do rDNA 16S revelou alta identidade para os gêneros *Microbacterium sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Paenibacillus sp.*, e as espécies *Kocuria turfanensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Janibacter melonis*, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *Bacillus firmus*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter hormaechei*, *Escherichia coli*, *Pantoea vagans* e *Pantoea eucrina*.

O isolado LEM 17 apresentou baixa identidade, o que pode significar que ele seja uma espécie ainda não descrita.

*Kocuria turfanensis* e *Pantoea vagans* foram pela primeira vez registradas como endofíticas e *Bacillus thuringiensis*, *B. licheniformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter hormaechei*, *Chryseobacterium sp* e *Ochrobactrum sp* como endofíticas em frutos de café.

Os frutos verdes de *Coffea canephora* apresentaram a maior diversidade de bactérias endofíticas seguidos dos estádios cereja e verde-cana.

## 6. REFERÊNCIAS

- AL-BATAYNEH, K. M.; JACOB, J. H.; HUSSEIN, E. I. Isolation and molecular identification of new thermophilic bacterial strain of *Geobacillus pallidus* and *Anoxybacillus flavithermus*. **International Journal of Integrative Biology**, v. 11, n. 1, p. 39-43, 2011.
- ALMEIDA, A. M. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. 2007. 137f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007.
- ALMEIDA, A. M. P.; FARAH, A.; SILVA, D. A. M.; NUNAN, E. A.; GLORIA, M. B. A. Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8738–8743, 2006.
- ANTÔNIO, A. G.; IORIO, N. L. P.; PIERRO, V.S.S.; CANDREVA, M. S.; FARAH, A.; SANTOS, K. R. N.; MAIA, L. C. Inhibitory properties of *Coffea canephora* extract against oral bacteria and its effect on demineralisation of deciduous teeth. **Archives of Oral Biology**. (2010), doi:10.1016/j.archoralbio.2010.12.001.
- ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, n. 2, p. 87– 99, 2003.
- ASSUMPÇÃO, I. C.; LACAVAL, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.5, p.503-510, 2009.
- BACON, C. W & HINTON, D. M. Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In: GNANAMANICKAM, S. S. 1 ed. **Plant-Associated Bacteria**. Netherlands: Springer. 2007, p. 155-195.
- BEHRENDT, U.; ULRICH, A.; SPROER, C.; SCHUMANN, P. *Chryseobacterium luteum* sp. nov., associated with the phyllosphere of grasses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.57, n. 8, p. 1881–1885, 2007.
- BERTRAND, C.; NOIROT, M.; DOULBEAU, S.; KOCHKO, A.; HAMON, S.; CAMPA, C. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Qualitative comparison with leaves. **Plant Science**, v. 165, n. 6, p. 1355-1361, 2003.

- 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, n. 10, p.6193-6198, 2005.
- BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p.191–205, 2009.
- BUYER, J. S. Improved fast gas chromatography for FAME analysis of bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 54, n. 1, p.117-120, 2003.
- CAI, H.; ARCHAMBAULT, M & PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence–based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, n. 5, p. 465–469, 2003.
- CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical classification of Coffee. In: CLIFFORD, M.N. e WILLSON, K.C. **Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage**. 1 ed. New York: America Edition. 1985. p.13-47.
- CHAVES, J. C. D.; MIYAZAWA, M.; BLOCH, M. F. M.; YAMAKAMI, J. K. Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, n. 3, p. 287-292, 2004.
- CHO, S. H.; LEE, K. S.; SHIN, D. S.; HAN, J. H.; PARK, K. S.; LEE, C. H.; PARK, K. A.; KIMAN, S. B. Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaerae* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 122–127, 2010.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – **CONAB**. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 2009.
- CONAGIN, C. H. T. M & MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*. Autoincompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner. **Bragantia**, v. 20, n. 34, p. 787-804, 1961.
- CONTI, R. **Diversidade e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos da planta medicinal *Borreria verticillata* L.** G. F. W. Meyer. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2007.
- CORDERO, A. F. P. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café**. 2008. 78f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

- DASH, S. S.; GUMMADI, S. N. Inhibitory effect of caffeine on growth of various bacterial strains. **Research of Journal of Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 457-465, 2008.
- DAUGA, C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, n. 2, p. 531–547, 2002.
- DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARLIOZ, A.; MARTELIN, R.; GAYRAL, J. P.; RAOULT, D. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3623–3630, 2000.
- DUVICK, J. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 337–342. 2001.
- EGAMBERDIEVA, D.; KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; GAFUROVA, L.; KUCHAROVA, Z.; LUGTENBERG, B. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2008.
- FAZUOLI, L. C.; BRAGHINI, M. T.; MISTRO, J. C.; SILVAROLLA, M. B. Café robusta: uma nova opção para a cafeicultura paulista. **O Agrônomo**, v. 59, n. 1, p. 71-74, 2007.
- FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; PINTO, N. A. V. D. P.; NERY, M. C.; PÁDUA, F. R. M. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e conilon (*Coffea canephora* Pierre) torrados. **Ciência Agrotécnica**, v. 27, n.5, p.1076-1081, 2003.
- FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; BRAGANÇA, S. M.; FERRÃO, M. A. G.; MUNER, L. H. **Café Conilon**. 1 ed. Vitória, ES: Incaper. 2007. 702 p.
- FIRÁKOVÁ, S, ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v.62, n.3, p. 251-257, 2007.
- FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 76, p.1145–1152, 2007.

- 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, MG, 1999.
- GORYLUK, A.; REKOSZ-BURLAGA, H.; BLASZCZYK, M. Isolation and characterization of Bacterial Endophytes of *Chelidonium majus* L. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 355-361, 2009.
- GRANGE, D. C.; HAAN, R. D & ZYL, W. H. Z. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 87, n. 3, p.1195-1208, 2010.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.895-914. 1997.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., & RYAN, P. D.,. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**. v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HECK, K.L.; VAN BELLE, G.; SIMBERLOFF, D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. **Ecology**, v.56, p.1489-1461. 1975.
- 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, n. 8, p. 3233-3241, 1997.
- HILL, G.T.; MITKOWSKI, A.; Aldrich-Wolfe, L.; EMELEA, L.R.; JURKONIE, D.D.; Ficke, A.; Maldonado-Ramirez, S.; LYNCHA, S.T & NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 25–36, 2000.
- JANDA, J. M & ABBOTT, S. L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.
- KERFELD C. A.; SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-tionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, n. 2, p. 1-4, 2011.
- KIM, S.B., NEDASHKOVSKAYA, O.I., MIKHAILOV, V.V., HAN, S.K., KIM, K.O., RHEE, M.S. AND BAE, K.S. *Kocuria marina* sp. nov., a novel Actinobacterium isolated from marine sediment. **International Journal**

- Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 54, n. 5, 1617–1620, 2004.
- KIRK, J.; BEAUDETE, L.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIROMONOS, J.; LEE, H & TREVORS, J. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- KOLACZKOWSKI, B & THORNTON, J. W. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. **Nature**. v. 431, p. 980-984, 2004.
- KOVÁCS, G.; BURGHARDT, J.; PRADELLA, D.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E.; MHRIALIGETI, K. *Kocuria palustris* sp. nov, and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, n. 1, p. 167-173, 1999.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.
- KUMAR, V.; NAIDU, M. M & RAVISHANKAR, G. A. Developments in coffee biotechnology—in vitro plant propagation and crop improvement. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. v. 87, n. 1, p. 49–65, 2006.
- KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S & NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**. v. 75, n. 2, p. 223–230, 2001.
- LEBUHN, M.; ACHOUAK, W.; SCHLOTTER, M.; BERGE, O.; MEIER, H.; BARAKAT, M.; HARTMANN, A.; HEULIN, T. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 50, n. 6, p. 2207–2223, 2000.
- MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F., PEDROSA, F. O & SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Journal Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.250-258, 2010.
- MARQUEZ-SANTACRUZ, H. A.; HERNANDEZ-LEON, R.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; VELAZQUEZ-SEPULVEDA, I.; SANTOYO, G. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants

- (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**. v.9, n. 4, p. 2372-2380, 2010.
- MAUBERT, M.E.; HARTZ, C. B.; WILLSON, K. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) strain able to bioremediate methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in vitro and in situ. **Journal of Young Investigators**, v.17, n. 1, p. 1-9, 2009.
- MAURO, D. S & AGORRETA, A. Molecular systematics: a synthesis of the common methods and the state of knowledge. *Cellular & Molecular Biology Letters*. v.15, p. 311-341, 2010.
- MBURU, J. K. Notes on coffee processing procedures and their influence on quality. **Kenya Coffee**, v. 60, n. 2, p. 2131-2135, 1995.
- MEKETE, T.; HALLMANN, J.; KIEWNICK, S.; SIKORA, R. Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 11, n.1, p. 117-127, 2009.
- MENDES, L. C. **Otimização do processo de torração do café robusta (*Coffea Canephora* Conilon) para formulação de blends com café arábica (*Coffea arabica*)**. 1999. 101f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1999.
- MENEZES, H. C. **Variação dos monoisômeros e diisômeros dos ácidos cafeoilquínicos com maturação do café**. 1990. 90f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1990.
- MIGNARD, J.P.; FLANDROIS, S. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 3, p. 574–581, 2006.
- MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M. B.; MORY, E. E. Determinação de minerais em café cru. **Ciência Tecnologia e Alimentos**. Campinas, v. 22, n. 1, p. 19-23, 2002.
- MULETA, D.; ASSEFA, F.; HJORT, K.; ROOS, S.; GRANHALL, U. Characterization of Rhizobacteria isolated from Wild *Coffea arabica* L. **Engineering Life Science**, v. 9, n. 2, p. 100–108, 2009.
- NHUNG, P. H.; OHKUSUA, K.; MISHIMA, N.; NODA, M.; SHAHA, M. M.; SUNA, X.; HAYASHI, M.; EZAKI, T. Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 2, p.153–161, 2007.

- OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; SILVEIRA, I. A. Influência da diversidade microbiana na qualidade da bebida do café. **Interação**, v. 3, n.3, p. 15-21, 2001.
- OUATTARA, H. G.; KOFFI, B. L.; KAROU, G. T.; SANGARÉ, A.; NIAMKE, S. L. DIOPOH, J. K. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24, n. 8, p.1753–1760, 2008.
- PARK, H. J.; JIN, G.; NAKHLEH, L. Methodology article Bootstrap-based Support of HGT Inferred by Maximum Parsimony. **BMC Evolutionary Biology**. v. 10, p. 1-11, 2010.
- PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; SCHMIDT, S.; LÜTTICHEN, R.; HAASE, G. Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the Microbial Identification System (MIS) for *Candida (Torulopsis) glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 4, p. 213-221, 2000.
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; CASTILLO, C.; ETCHEVERRY, M. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control**. v.53, n. 3, p. 258–266, 2010.
- PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H & CASTRO, A. C. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, 2005.
- PIMENTA, C. J.; CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; TAVARES, L. S.; MARTINS, R, T. Avaliação físico-química e de qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera para secagem. **Revista Brasileira Armazenamento**. v. 33, n. 10, p. 36- 41, 2008.
- QIN, S.; LI, J.; CHEN, H. H.; ZHAO, G. Z.; ZHU, W. Y.; JIANG, C. L.; XU, L. H & LI, . J. Rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rainforests, Xishuangbanna: isolation, diversity and antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6176–6186, 2009.
- 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,n. 1, p.1-7. 1985.
- RIBEYRE, F. Reconhecendo a qualidade do café robusta. In: SALVA, T. J. G.; GUERREIRO-FILHO, O.; THOMAZIELLO, R.A.; FAZUOLI, L.C. **Ca-**



**fés de qualidade: aspectos tecnológicos, científicos e comerciais.** 1. Ed. Campinas: IAC. 2007, p. 371-387.

RICE, K & WARNOW, T. Parsimony is hard to beat. In JIANG, T & LEE, D.T. eds. **Lecture notes in computer science**, Vol. 1276. Springer, Berlin. v. 1276, p. 124-133, 1997.

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 developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v. 149, n. 1, p. 115-123, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions** MPMI v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.

ROVA, J. H. E.; DELPRETE, P. G.; ANDERSSON, L & ALBERT, V. A. A. Trn1-f cpdna sequence study of the condamineeae-rondeletieae-sipaneae complex with implications on the phylogeny of the rubiaceae. **American Journal of Botany**. v. 89, n. 1, p. 145-159, 2002.

SABAT, G.; ROSE, P.; HICKEY, W. J.; HARKIN, J. M. Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA Genes in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 2, p. 844–849, 2000.

SADFI, N.; CHÉRIF, M.; FLISS, I.; BOUDABBOUS, A.; ANTOUN, H. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. **Journal of Plant Pathology** v. 83, n. 2, p. 101-118, 2001.

SAKIYAMA, C. C. H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento.** 2001. 102f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001a.

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, n. 2, p. 117–121, 2001b.

SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual.** 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. Paginação irregular.

- SCHENIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 2ed. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética, 2007. 200p.
- SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. N. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting Endophytic Bacteria for Biological Control of Coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SICILIANO, S. D., GERMIDA, J.J. Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that Pseudomonad inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 13, p. 1717–1723, 1998.
- SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S NUNES, F. V. Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. n. 38, 2006, 25p.
- SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; BETTIOL, W. Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 49-54, 2008.
- SILVA, R. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; BORÉM, F. M.; MUNIZ, J. A. Qualidade do café-cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, 2004.
- SMEATH, P.; MAIR, N.; SHARPE, E & HOLT, H. **Bergey's manual systematic of bacteriology**. v. 2, p. 157-165, Springer-Verlag. Berlin 1988.
- SMITS, T. H. M.; REZZONICO, F.; KAMBER, T.; GOESMANN, A.; SHIMARU, C.; STOCKWELL, V. O.; FREY, J. E.; DUFFY, B. The Genome Sequence of the Biocontrol agent *Pantoea vagans* Strain C9-1. **Journal of Bacteriology**. v.192, n. 24, p. 6486–6487, 2010.
- SPRENT, J. I.; DEFARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 1988.
- STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. “Taxonomic parameters re-visited: tarnished gold standards,” **Microbiology Today**, v.33, n. 4, p. 152-155, 2006.
- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; ARSENAULT, W. J. BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of

- potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, v. 48, n. 3, p. 360–369, 1999.
- TAGHAVI, S.; DER LELIE, D. V.; HOFFMAN, A.; ZHANG, Y. B.; WALLA, M. D.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, N.; MONCHY, S. Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**. v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n. 8, p.1596-1599, 2007.
- TARZIA, A.; SCHOLZ, M. B. S & PETKOWICZ, C. L. O. Influence of the postharvest processing method on polysaccharides and coffee beverages. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 45, n. 1, p. 2167-2175, 2010.
- TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n. 7, p.348–359, 2004.
- TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.100, n. 2, p. 94-99, 2009.
- THOMAS, P.; SOLY, T. A. Endophytic Bacteria Associated with Growing Shoot Tips of banana (*Musa sp.*) cv. Grand Naine and the Affinity of Endophytes to the Host. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 952-964, 2009.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.
- VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; MONCHY, S.; SCHWENDER, J.; MILLER, L.; FERRIERI, R.; ROGERS, A.; WU, X.; ZHU, W.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 346-358, 2009.
- VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 277-279, 2008.
- VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, v 45, n. 5, p371–380, 2005.

- VEGA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M. C.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; REHNER, A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, E. A. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, n. 3, p. 122–138, 2010.
- VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; RIVAS, R.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E. J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118–124, 2008.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. N. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2, p.127–141, 2001.
- WANG, H.; WEN, K.; ZHAO, X.; WANG, X.; LI, A.; HONG, H. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. **Crop Protection**, v. 28, n. 12, p.634–639, 2009.
- WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n. 10, p. 908-934, 2008.
- XING, Y. X.; YANG, L. T.; HUANG, S. L.; L, Y. R. Identification of a New Nitrogen Fixing Endo-bacterium Strain Isolated from Sugarcane Stalk. **Indian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 49-53, 2006.
- YOON, J. H.; LEE, H. B.; YEO, S. H.; CHOI, J. E. *Janibacter melonis* sp. nov., isolated from abnormally spoiled oriental melon in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1975-1980, 2004.
- YOUNG, J. M., KUYKENDALL, L. D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A., SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 89-103, 2001.
- ZHANG, H.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**. v. 23, n. 5, p. 753–771, 2006.
- ZHANG, X. Z & ZHANG, Y. H. P. One-step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*:

Opportunities and challenges. **Engineering Life Science**, v. 10, n. 5, p. 398-406, 2010.

ZHOU, G.; LUO, X.; TANG, Y.; ZHANG, L.; YANG, Q.; QIU, Y & FANG, C. *Kocuria flava* sp. nov. and *Kocuria turfanensis* sp. nov., airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, n. 6, p. 1304–1307, 2008.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.; 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, n. 5, p. 2198-2208, 2002.