



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MÉRCIA DE FREITAS FERREIRA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM TECIDOS DE CAFEEIRO SOB DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE CO₂**

Botucatu

2017

MÉRCIA DE FREITAS FERREIRA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM TECIDOS DE CAFEIEIRO SOB DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE CO₂**

Orientador: Prof. Dr. Wagner Bettiol

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mendes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Proteção de Plantas).

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -
DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F383b Ferreira, Mércia de Freitas, 1980-
 Bactérias endofíticas em tecidos de cafeeiro sob dife-
 rentes concentrações de CO₂ / Mércia de Freitas Ferreira.
 - Botucatu :[s.n.], 2017
 72 p.: il. color., grafs., tabs.

 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
 culdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2017

 Orientador: Wagner Bettiol

 Coorientador: Rodrigo Mendes

 Inclui bibliografia

 1. Café arábica. 2. Dióxido de carbono. 3. Microbiota. I. Bettiol,
 Wagner. II. Mendes, Rodrigo. III. Universida- de Estadual Paulista "Júlio de
 Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV.
 Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM TECIDOS DE CAFEEIRO SOB DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE CO₂

AUTORA: MÉRCIA DE FREITAS FERREIRA

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

COORIENTADOR: RODRIGO MENDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. WAGNER BETTIOL
Microbiologia Ambiental / Meio Ambiente / Embrapa



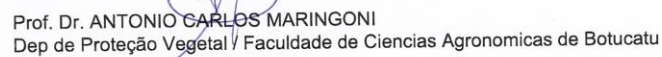
Profa. Dra. KÁTIA DE LIMA NECHET
Microbiologia Ambiental / Meio Ambiente / Embrapa



Dra FLÁVIA RODRIGUES ALVES PATRÍCIO
Laboratório de Fitopatologia / Instituto Biológico



Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA
Deppto de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Botucatu, 09 de junho de 2017.

A Deus, que é meu porto seguro que sempre me conduz ao caminho do bem me iluminando e protegendo, sem ti jamais teria chegado onde cheguei ‘...mas para os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias correm e não se cansam, caminham e não se fatigam’ (Isaias 40-31).

Aos meus amados pais Maria e Manoel por todo seu amor incondicional, apoio, dedicação, ensinamentos, educação e compreensão nos momentos difíceis, e por suportarem a ausência e a saudade e pelo incentivo em prosseguir.

Dedico.

Aos meus familiares que apesar da distância sempre me apoiaram, em especial as minhas irmãs Márcia, Mônica, Magali, Michele e Manuela, aos meus irmãos Marcos, Marcílio e Marlon, a todos os sobrinhos (as) Helena Beatriz, Maria Cecília, Maria Eduarda, Helena Sophia, Evelyn Bianca, Ana Júlia, Heloísa Cristina, João Miguel, Pedro, João Victor e João Gabriel e Benício e aos cunhados (as) Ana e Amanda, Carmélio, Júnior, Neto, Alexandre, Jamerson e a todos os meus amigos (as) uns bem de perto... uns de longe... e outros de bem longe...

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A minha infinita gratidão a Deus, por dirigir a minha vida e guiar as pessoas que amo, por conduzir e iluminar meus passos, dando-me, além de tudo sabedoria, força e coragem desde o início dessa caminhada até seu término;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À Embrapa Meio Ambiente, ao Núcleo do Café do Instituto Agronômico de Campinas e ao Departamento de Genética da ESALQ, pela receptividade, confiança e por permitirem a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, paciência, amizade e pelos ensinamentos valiosos que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho e para minha formação profissional;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Mendes, pela co-orientação, por todo o apoio no laboratório, sobretudo pela admiração e respeito;

À Prof. Dr^a. Raquel Ghini e à pesquisadora Dr^a Katia de Lima Nechet, por todo o apoio no experimento FACE, e ao Dr. Rodrigo Taketani da Embrapa Meio Ambiente, pelas sugestões no sequenciamento;

À Prof. Dr^a. Miriam Maluf e à Dr^a. Patrícia Favoreto do Núcleo do Café no Instituto Agronômico de Campinas e à Prof. Dr^a. Maria Carolina Quecine e à Paula Almeida da ESALQ, por todo o apoio, ensinamentos e amizade;

Aos Professores do Departamento de Proteção Vegetal da UNESP/FCA Dr. Carlos Gilberto Raetano, Dr. Antônio Carlos Maringoni, Dr^a. Renate Krause Sakate, Dr^a

Adriana Kronka e Dr^a. Silvia Renata Siciliano Wilcken, pelos conhecimentos, experiências e ensinamentos transmitidos;

Às professoras de biologia molecular Dr^a Janete Desiderio e Dr^a Sônia Zingaretti, da pós-graduação em Melhoramento Genético de Plantas da UNESP/FCAVJ, pelos ensinamentos transmitidos; e ao Prof. Dr. Leandro Borges Lemos da Produção Vegetal, pela oportunidade em realizar o estágio em docência;

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente Aline Holanda, Alfredo Luiz, Daniel Terao, Lourival Paraíba e Sônia Queiroz, pelo incentivo, amizade e os momentos de descontração;

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente Anamaria, Elke, João, Márcia, Roseli e Tatiana, por todo o apoio nos momentos de necessidade;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental Regiane, Michele, Dalton, Daniel, Abrahão, Thiago, Carlos, Mirian, Thamires, Vanessa, Maike, Wallace, Diego, Leonardo, Camila, Marta, Laura, Juanita, Danilo, Harold, Jorge, Josi e outros não mencionados aqui, por toda amizade;

Aos amigos, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização dessa conquista, Daniel Goulart, Alisson Esdras, Dasmília Cruz, Isaneli Batista, Ana Paula Frugeri, Edpo Jacob, Erika Correia e também aos que chegaram para ocupar um espaço no meu coração, os futuros psicólogos da Faculdade de Jaguariúna (FAJ), Suelen Fogaça, Mariana Martins, Vanessa Marcatto, Fernanda Júlio, Juliana Rossi, Bruna Rocha, Débora Lacerda e em especial a Odail Marques pelo carinho, companheirismo e paciência nos momentos difíceis.

RESUMO

Os microrganismos endofíticos ocorrem naturalmente em todas as partes do cafeeiro e produzem metabólitos secundários que podem influenciar as características da expressão da bebida, bem como a resistência da planta às doenças e pragas. O aumento da concentração atmosférica de CO₂ vem sendo observado nas últimas décadas e pode afetar positiva, negativamente ou ser neutro na planta de café, e também influenciar na comunidade de microrganismos endofíticos. A melhor forma de se realizar os estudos com o aumento da concentração de CO₂ é por meio de experimento tipo FACE (Free Air Carbon Dioxide Enrichment), o qual possibilita obter uma resposta sem alterar o microclima em áreas extensas de amostragens. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo estudar a comunidade bacteriana endofítica em folhas, frutos e ramos de cafeeiro da variedade Catuaí Vermelho IAC 144, cultivados no experimento ClimapestFACE da Embrapa Meio Ambiente, bem como identificar as bactérias endofíticas presentes em frutos e ramos de café por meio de sequenciamento em larga escala. O experimento FACE é composto por 12 anéis, dos quais seis com a concentração atual de CO₂ que é de aproximadamente 400 ppm e os outros seis enriquecidos com CO₂ até uma concentração de 550 ppm. Em cada anel, foram coletados folhas, ramos e frutos nas safras de 2013 a 2015. Com os tecidos amostrados foi realizada análises por meio da técnica de T-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), onde na amplificação do gene 16S rDNA de todas as amostras foram utilizados primers específicos para bactérias universais. Para a identificação da comunidade endofítica foi utilizado 16S rDNA de oito amostras de frutos e de três fragmentos de ramos, provenientes de quatro anéis com CO₂ ambiente e quatro anéis enriquecido com CO₂ de uma mesma planta, dos dois anos de coleta, totalizando 16 amostras selecionadas para o sequenciamento realizado pela técnica Ion Torrent. Os dados da técnica de T-RFLP foram analisados pelo teste ANOSIM e observadas diferenças quando comparados os agrupamentos entre folhas, frutos e ramos, contudo não foram observadas diferenças entre os tratamentos com CO₂ ambiente e com enriquecimento de CO₂. A Análise de Componentes Principais veio a confirmar o resultado do teste ANOSIM revelando que a estrutura das comunidades bacterianas

endofíticas apresentam maior dissimilaridade quando comparadas as partes das plantas (folha, fruto e ramo). Mas ao comparar os tratamentos com CO₂ ambiente e com enriquecimento de CO₂, houve uma similaridade e em alguns casos havendo sobreposição, o que mostra que não houve distinção das comunidades entre os tratamentos. O sequenciamento em larga escala de amostras de frutos e ramos de cafeeiro revelou que a microbiota endofítica, que habita estes tecidos vegetais, são na sua grande maioria bactérias pertencentes aos filos Proteobactéria, Actinobactéria e Firmicutes. Quando se comparou os tecidos em que estes microrganismos vivem (frutos e ramos), a maior abundância foi encontrada colonizando os tecidos dos ramos. As plantas desenvolvidas na concentração de CO₂ ambiente apresentaram maior predominância de bactérias endofíticas que as cultivadas em ambiente enriquecido com CO₂.

Palavras chave: Microbiota endofítica. FACE. Café arábica. Polimorfismo. Dióxido de carbono.

ABSTRACT

ENDOPHYTIC BACTERIA IN COFFEE TISSUES UNDER DIFFERENT CO₂ CONCENTRATIONS

Endophytic microorganisms occur naturally in coffee plant and produce secondary metabolites that can influence the beverage characteristics, as well as the resistance of plant diseases and pests. The increase in the atmospheric CO₂ concentration has been observed in the last decades and can affect positively, negatively or be neutral to coffee plant, and also influence the endophytic microorganisms. The best way to carry out the studies with the increase of CO₂ concentration is in FACE experiment (Free Air Carbon Dioxide Enrichment). The objective of this study was to study the endophytic bacterial community in leaves, fruits and branches of coffee grown in the ClimapestFACE experiment at Embrapa Environment, as well as to identify the endophytic bacteria in fruits and branches of through large-scale sequencing. The FACE experiment consists of 12 rings, of which six maintains the ambient CO₂ concentration (400 pm) and other six enriched with CO₂ at 550 ppm. In each ring were collected leaves, branches and fruit between 2013 and 2015. Samples were analyzed using T-RFLP technique, where specific universal bacteria primers were used in the amplification of 16S rDNA gene. For identification of endophytic community sequencing was performed through Ion Torrent technique. The data of T-RFLP technique were analyzed by ANOSIM test and differences were observed when comparing the groupings between leaves, fruits and branches, however no differences were observed between treatments with or without CO₂ enrichment. The Principal Component Analysis confirmed the ANOSIM test and revealed that the structure of endophytic bacterial communities presents greater dissimilarity when comparing leaf, fruit and branch. However, in the comparison between treatments with and without CO₂ enrichment there was a similarity and in some cases overlap, which shows that there was no distinction between communities. The large-scale sequencing of coffee fruit and branches revealed that endophytic microbiota, which inhabits these plant tissues, are Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes. When comparing the community of microorganisms in the tissues, the branches present

greater abundance than the fruits. Plants developed in the ambient CO₂ concentration had a greater predominance of endophytic bacteria than those grown in an environment enriched with CO₂.

Keywords: Endophytic microbiota. FACE. Coffee Arabica. Polymorphism. Carbon dioxide.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Características gerais da cultura do café.....	18
2.2	Mudanças climáticas, CO ₂ e efeitos das mudanças climáticas sobre as doenças de plantas.....	20
2.3	Microrganismos endofíticos.....	23
2.4	Principais filos de bactérias endofíticas de importância para as plantas.....	26
2.5	Técnicas moleculares para estudos da diversidade molecular de endofíticos.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Área experimental, amostragem e desinfestação superficial do vegetal.....	31
3.2	Extração de DNA genômico total de folhas de cafeeiro.....	36
3.3	Extração de DNA genômico total de frutos e ramos de café, purificação e quantificação de DNA.....	37
3.4	Amplificação de 16S rDNA de bactéria endofítica e purificação dos produtos da PCR.....	39
3.5	Digestão com enzima de restrição dos produtos da PCR para análise de TRFL-P e precipitação dos produtos da digestão.....	40
3.6	Análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (TRFL-P) do gene 16S de rDNA de bactérias endofíticas.....	40
3.7	Reação de amplificação de 16S de rDNA e purificação dos produtos da PCR de frutos e ramos de cafeeiro para sequenciamento	41

3.8 Análise da comunidade bacteriana em frutos e ramos de café de gene 16S rDNA para sequenciamento pela técnica Ion Torrent.....	43
3.9 Análise das sequências geradas no sequenciamento em larga escala.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Análises do TRFL-P pelo teste ANOSIM e SIMPER e análise de Unidades Taxonômicas Operacionais.....	47
4.2 Análise dos Componentes Principais dos perfis de T-RFL.....	49
4.3 Identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) associadas a amostras de frutos e ramos de cafeeiro.....	53
4.4 Identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) associadas aos tecidos da planta de café.....	56
4.5 Identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais associadas ao cafeeiro submetido a concentrações de CO ₂ e análise de rarefação.....	58
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, além disso também é um dos maiores consumidores da bebida. A cafeicultura envolve milhares de empregos diretos e indiretos, que vai desde a produção no campo até a comercialização. Os principais países consumidores são Estados Unidos, Brasil e Japão. Os principais estados produtores de café no Brasil são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Bahia.

A importância socioeconômica da cultura do café para o Brasil remonta dois séculos, e mais recentemente se deve ao aumento do consumo no mercado interno, melhores condições econômicas da população e dedicação dos produtores para obter um produto de qualidade, o que, conseqüentemente, reflete na qualidade da bebida. Isso tem feito com que as pesquisas e os incentivos tenham aumentado nesse setor.

A qualidade da bebida do café é um aspecto de grande importância que depende da união de diversos fatores, tais como, variedade da planta, ambiente, manejo da cultura, processamento dos grãos e outros. Todos estes fatores reunidos são fundamentais para a prevalência da microbiota endofítica, a qual pode influenciar na constituição final do fruto, isso podendo ter reflexo positivo ou negativo na qualidade da bebida (PIMENTA, 2003; SILVA et al., 2005; SCHMIDT et al., 2008).

Os microrganismos endofíticos são aqueles que não causam doenças nas plantas, sendo, em sua maioria, fungos e bactérias que podem ser obtidos de tecidos vegetais superficialmente esterilizados (HALLMANN et al., 1997). Os endófitos podem proteger as plantas contra fitopatógenos, insetos e animais, tanto devido a produção de toxinas, como também de fitormônios e enzimas (AZEVEDO, 2000). Os endofíticos ocorrem naturalmente nos frutos de café e podem produzir metabólitos secundários que influenciam nas características da expressão da bebida (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997).

Há relatos no Brasil sobre os impactos das mudanças climáticas no cafeeiro relacionados ao zoneamento agroclimático (ASSAD et al., 2004), bem como às doenças e pragas (POZZA e ALVES, 2008; GHINI et al., 2015). Contudo, as mudanças climáticas podem influenciar positiva ou negativamente a microbiota endofítica e desta

forma, o controle biológico por eles efetuados, inexistindo estudos com esses microrganismos na cultura do cafeeiro considerando as mudanças climáticas.

Manning e Tiedemann (1995) afirmaram que o aumento da concentração de gases, como o CO₂, altera a composição das comunidades microbianas, o que faz com que a microbiota sofra mudanças e, com isso, também altere a ocorrência de doenças através do controle biológico natural (COAKLEY et al., 1999; GRÜTER et al., 2006).

Para analisar o efeito do aumento da concentração de CO₂ podem ser realizados experimentos em condições controladas. Uma possibilidade, e mais adequada, é a condução de experimentos em condições de campo com a liberação de CO₂, que são denominados experimentos do tipo Free Air Carbon Dioxide Enrichment (FACE), que possibilita obter uma resposta sem que haja influência do microclima nas áreas extensas de amostragens.

O aumento da concentração de CO₂ pode alterar a ocorrência das doenças de plantas e também pode ter impacto sobre os agentes de controle biológico, além de alterar o metabolismo, o crescimento e os processos fisiológicos das plantas. De maneira geral, o aumento da concentração de CO₂ causa efeitos benéficos diretos na planta, como o aumento da biomassa e a densidade da copa (GHINI, 2005).

Agentes de controle biológico têm sido encontrados em tecidos de várias espécies de vegetais, podendo ser microrganismos endofíticos, os quais, em estreita relação com seus hospedeiros, podem ser componentes naturais do controle biológico de doenças. Esses organismos ocupam um nicho ecológico parecido aos habitados por patógenos e apresentam potencial para o controle biológico.

No estado de Minas Gerais, Oliveira et al. (2013), relataram pela primeira vez microrganismos endofíticos colonizando frutos de café arábica, sendo os estudos realizados por meio de técnicas independentes de cultivo, e assim verificaram uma ampla diversidade de bactérias presentes nos frutos.

Estudos moleculares têm sido realizados visando a análise mais aprofundada destes microrganismos endofíticos. Neste estudo foram empregadas algumas técnicas que vêm sendo utilizadas para identificação desses microrganismos, como por exemplo a de Polimorfismos do Tamanho de Fragmentos de Restrição (T-RFLP) e o

sequenciamento de DNA, a fim de acessar a diversidade genética em comunidades endofíticas ao nível de DNA.

Dessa forma, com o auxílio de técnicas moleculares, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular da comunidade de microrganismos endofíticos em folhas, frutos e ramos de cafeeiros cultivados condições em experimento tipo FACE sob condições de alta concentração de CO₂ do ar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais da cultura do café

O café é originário do sul da Etiópia e de lá as primeiras sementes chegaram ao Brasil no século XVIII, no ano de 1727, provavelmente trazidas da América e das Guianas Francesas. A cafeicultura tornou-se uma das atividades agrícolas mais importantes no país e foi a responsável pelo crescimento das exportações brasileiras (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2016). O cafeeiro é um dos representantes da família Rubiaceae, sendo o gênero *Coffea* L. constituído por 104 espécies, das quais *Coffea arabica* e *Coffea canephora* apresentam grande importância comercial (DAVIS et al., 2007; DAVIS et al., 2006).

Em 2016, o Brasil possuía uma área estimada plantada com café de 2.220.080 ha, sendo 1,3% menor do que em 2015. O café arábica é responsável por 79,11% de área, enquanto que o conilon representa 20,89%. O maior produtor de café arábica, em 2015, foi Minas Gerais, já o Espírito Santo foi o maior produtor de conilon (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).

Na safra 2015, o Brasil foi o maior produtor e exportador mundial, além de ser um dos maiores consumidores do produto. As exportações foram de 37,1 milhões de sacas de 60 kg, com receita de US 6 bilhões, representando 7% das exportações do agronegócio brasileiro (ABIC, 2016). A estimativa de produção para 2016 foi de 49,64 milhões de sacas de 60 quilos, com um aumento de 14,8% em relação a 2015, que foi de 43,24 milhões de sacas. Desse total o café arábica deverá representar 83,2% da produção total (aproximadamente 41,29 milhões de sacas, com um aumento de 28,8%), sendo o restante de conilon, estimada em 8,35 milhões de sacas (CONAB, 2016).

A cultura do café apresenta ciclo fenológico bienal. Essa bienalidade é originada da natureza fisiológica da planta, sendo assim precisa vegetar por um ano para poder produzir bem no próximo (RENA e MAESTRI, 1985). O período de frutificação ocorre de outubro a maio, onde, neste momento, a planta exige uma maior disponibilidade de água; já na época da colheita, a exigência por água torna-se menor sem haver prejuízo para a cultura (MATIELLO, 1991).

Os estudos com melhoramento genético do cafeeiro no Brasil foram decisivos para o seu desenvolvimento agrônomo e tecnológico. Cultivares com alto potencial de produtividade, além de outras características de interesse, foram liberados por diversas instituições brasileiras. As cultivares mais plantadas no Brasil são: Mundo Novo, Bourbon, Icatu, Catuaí, Obatã, Catuacai, Acaiá e outras (SAKIYAMA et al., 2015).

A qualidade da bebida é fundamental para obter um valor agregado no ato da sua comercialização e esse aspecto ganha espaço no mercado mundial continuamente. A qualidade da bebida do café é resultante de componentes genéticos (LEROY et al., 2006), ecofisiológicos (DaMATA et al., 2007), agrônômicos e edafoclimáticos (VAAST et al., 2005), bem como dos processos de pré e pós-colheita (armazenamento, fermentação, torrefação, moagem, preparo da infusão) e também da microbiota associada (SCHMIDT et al., 2008; SOUZA e CARVALHO, 1997). A bebida café é uma mistura de diversos compostos químicos, incluindo alcaloides, compostos fenólicos, vitaminas, carboidratos, lipídeos, minerais, cafeína, aminoácidos e outros (HIGDON e FREI, 2006).

Uma composição rica em nutrientes no mesocarpo mucilaginoso possibilita o desenvolvimento de microrganismos tanto durante a maturação do fruto como na fermentação do café (MASOUD e JESPERSEN, 2006). Bactérias, fungos e leveduras estão associados ao processamento do café e participam tanto da deterioração dos frutos, como da produção de enzimas pectinolíticas e de micotoxinas (PRADO et al., 2004).

Estudos mostraram que a ocorrência de bactérias endofíticas, presentes em frutos de café, podem contribuir para a qualidade da bebida (VEGA et al., 2005). Em café arábica, o primeiro relato de isolamento de um endófito foi da bactéria *Acetobacter diazotrophicus* de raiz e caule (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997).

2.2 Mudanças climáticas, CO₂ e efeitos sobre as doenças de plantas

Desde o início da Revolução Industrial, as atividades antrópicas e a concentração de CO₂ atmosférico se intensificaram de modo acelerado, interferindo diretamente no ambiente. Um exemplo são as observações sobre o derretimento das geleiras da Antártica, onde as concentrações de carbono registradas atualmente são as maiores dos últimos anos (MARENGO, 2006). A queima de combustíveis fósseis é um dos motivos para o aumento da concentração de CO₂.

Além disso, a modificação no uso da terra também promove a mudança climática por meio da liberação de ozônio (O₃), óxido nitroso (N₂O), monóxido de carbono (CO) e metano (CH₄) (PAINEL INTERGOVERNAMENTAL DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS – IPCC, 2007). Com isso, tornam-se evidentes as mudanças climáticas, provocadas principalmente por fenômenos como secas extremas, furacões e enchentes (MARENGO, 2006).

Um dos setores que poderá ser atingido pelas mudanças climáticas é a agricultura (MACHADO e MARENGO, 2006). Em vários estudos realizados pelo IPCC em 2013, a América do Sul é apontada como uma das áreas do planeta que pode sofrer com os impactos, principalmente em sua parte tropical. A América do Sul, por ser uma região frágil aos extremos climáticos, poderá ser atingida frequentemente por eventos climáticos extremos (MARENGO et al., 2010). Assim, a agricultura pode ser afetada por diversas formas, como no comportamento das operações do campo, na produção e produtividade das culturas, bem como na ocorrência de doenças e pragas (MARENGO e MACHADO, 2006; GHINI et al., 2008).

As mudanças climáticas podem provocar danos por alterar o comportamento dos fitopatógenos, a distribuição das doenças no espaço geográfico e no tempo, bem como na eficácia do controle e nos microrganismos que interagem com seus hospedeiros (GHINI et al., 2008). Tanto o zoneamento agroclimático das culturas poderá sofrer alterações, como os agentes fitopatogênicos e outros organismos associados com o processo da doença.

Com isto, em específicas regiões, novas doenças poderão aparecer e outras, passarem a não ter importância, principalmente se a planta migrar para outras áreas

(GHINI et al., 2011). As doenças de plantas são caracterizadas por ser um sistema biológico complexo e os efeitos das mudanças climáticas são incertos.

Microrganismos endofíticos são organismos que vivem no interior dos tecidos dos hospedeiros, sem causar danos, e são de grande importância, pois desempenham funções ecológicas por terem evoluído com as plantas. Os benefícios que as plantas recebem pela presença dos endófitas são o aumento da sua capacidade competitiva; resistência a estresses hídricos, a doenças e pragas, entre outros (HALLMANN et al., 1997; SAIKKONEN et al., 1998).

Assim, uma elevação na concentração de CO₂ atmosférico, além de poder afetar a relação entre a comunidade endofítica e a planta, pode, sem dúvida, interferir na associação entre plantas com os microrganismos endofíticos (GHINI, 2005).

Nesse sentido, é importante que o patossistema seja analisado de modo a permitir uma avaliação mais precisa dos diversos efeitos que o aumento da concentração de CO₂ possa causar. As mudanças climáticas podem causar efeitos diretos e indiretos, tanto sobre as plantas quanto sobre a microbiota presente e também na interação de ambos. Uma das formas de se estudar o efeito do CO₂ em um determinado patossistema é por meio de experimentações em campo, onde há a liberação de uma quantidade de CO₂ em áreas extensas.

O aumento da concentração de CO₂ pode influenciar a relação entre hospedeiros-microrganismos, sejam eles patogênicos ou não. Desse modo, as pesquisas sobre essas alterações têm como objetivo prever os efeitos do aumento da concentração de CO₂ tanto nas doenças de plantas quanto nos microrganismos benéficos associados às plantas. Segundo Manning e Tiedemann (1995), o incremento das concentrações de gases como o CO₂ pode modificar as comunidades da microbiota da filosfera e da rizosfera. Assim, considerando a grande biodiversidade de plantas e da microbiota presente, as mudanças podem alterar a ocorrência de doenças por meio do biocontrole natural (COAKLEY et al., 1999; GRÜTER et al., 2006).

Em experimentos tipo FACE, a liberação do CO₂ no campo permite atingir diferentes concentrações do gás no ambiente. A vantagem principal desse tipo de experimentação em campo é poder estudar os efeitos do aumento da concentração de CO₂ nos ecossistemas, sem alterar as condições de microclima (GHINI, 2005). Sabe-se

que no mundo há mais de 30 instalações tipo FACE, sendo no Brasil o único com a cultura do café (Projeto Climapest) (GHINI et al., 2015).

Meijer e Leuchtmann (2000) verificaram em seus estudos, em um experimento realizado em instalações do FACE na Suíça, que tanto o fungo endofítico, denominado *Epichloë sylvatica*, como a gramínea *Brachypodium sylvaticum* foram afetados com o aumento da concentração de CO₂. Em um cenário de mudança ambiental, os autores concluíram que, quando ambos foram submetidos a condições de CO₂ elevado, foi possível verificar que o CO₂ favoreceu o crescimento do hospedeiro e do fungo.

O aumento da concentração de CO₂ atmosférico pode influenciar a fisiologia das plantas, uma vez que em todos os processos fisiológicos e metabólicos ocorre a diminuição ou aumento das rotas metabólicas, implicando em mudanças em toda a estrutura vegetal, sendo estas, em muitos casos, percebidas em fatores como diferenças na produção de tecidos vegetais ou incidência e severidade de doenças (GHINI, 2005). Outro importante fator reportado por Ghini (2005) é que a expressão das doenças em vegetais poderá ser atenuada de acordo com o ciclo da cultura e do patógeno em elevadas concentrações de CO₂. Entretanto, existem poucos dados que ponderem a interação patógeno-hospedeiro em altas concentrações de CO₂, sendo necessárias mais pesquisas na área para que cenários possam ser traçados e assim, em um futuro próximo, tecnologias sejam trabalhadas para melhorar os cultivos agrícolas nessas novas condições (GHINI et al., 2011).

Santos (2015), trabalhando com concentrações de CO₂ atmosférico superiores ao ambiente, verificou maior crescimento e desenvolvimento de plantas de alfafa (*Medicago sativa*), maior severidade de ferrugem (*Uromyces striatus*) e uma diminuição da severidade da *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicagnis*. Ghini et al. (2015) verificaram maior desenvolvimento de plantas de café das variedades Catuaí e Obatã desenvolvidas sob aumento da concentração do CO₂ atmosférico.

Desse modo, para o futuro, os cenários climáticos apontam para um aumento da temperatura, o que poderá alterar a resposta das plantas aos fitopatógenos, possivelmente devido à composição genética das plantas e às alterações provocadas nas comunidades de organismos que induzem resistência (GHINI et al., 2008).

Logicamente, além dos fatores anteriormente descritos, outros podem sofrer esta ação, sendo importante o estudo das relações entre as comunidades microbianas envolvidas nesta interfase, dentre elas a comunidade endofítica que vive nos vegetais e pode ser alterada por tais relações ambientais.

2.3 Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos colonizam os tecidos de plantas vivas sem causar doenças durante o seu ciclo de vida (WILSON, 1995). Os microrganismos endofíticos diferem dos fitopatógenos por não causarem doenças e dos epifíticos por não viverem na superfície dos órgãos e dos organismos, o que pode dificultar sua separação (AZEVEDO, 1998). Da mesma forma que os fitopatógenos, os endofíticos possuem a capacidade de penetração na planta e de disseminação ativando o apoplasto da planta hospedeira (SALERMO et al., 2000).

A penetração dos endofíticos pode ser feita através de ferimentos causados por tratos culturais e por aberturas naturais como estômatos nas folhas e pontos de emissão de raízes secundárias (SPRENT e JAMES, 1995). Com a colonização sistêmica do hospedeiro, os endofíticos alteram as suas condições fisiológicas e morfológicas, e atuam sobre outros microrganismos que se encontram dentro da planta (ANDREOTE et al., 2006). Esses organismos estão presentes em todos os vegetais e são encontrados em órgãos e tecidos como folhas, frutos, ramos e raízes.

Existem relatos da presença de endofíticos em batata (HOLLIS, 1951), feijão e soja (MUNDT e HINKLE, 1976), citros (GARDNER et al., 1982), algodão e milho doce (McINROY e KLOEPPER, 1995), cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988), uva (BELL et al., 1995), canola e trigo (SICILIANO et al., 1998) e em café (JIMENES-SALGADO et al., 1997). Estudos revelaram que endófitos vivem em tecidos saudáveis de frutos de cafeeiro, sendo na sua maioria bactérias (JIMENES-SALGADO et al., 1997).

Uma das maiores biomassas do planeta é formada por microrganismos, os quais são responsáveis por vários processos essenciais para a manutenção da vida. A monumental diversidade genética e metabólica torna os microrganismos endofíticos

uma fonte potencial de bioprodutos, sendo essa diversidade genética dos microrganismos endofíticos pouco estudada (STROBEL e DAISY, 2003; PROSSER et al., 2007).

Microrganismos endofíticos são de grande importância na natureza e também para uso humano, pois produzem metabólitos secundários, os quais encontram ampla aplicação na indústria de fármacos e agroquímicos. Assim, a atividade biológica dos seus metabólitos em associação com suas plantas hospedeiras vem sendo estudada. Diversos produtos naturais oriundos de endofíticos têm sido descritos, como antifúngicos, antibióticos, pigmentos, toxinas, imunossupressores, anticancerígenos, agentes antioxidantes, moléculas com ação herbicida e diversas outras moléculas bioativas (STROBEL e DAISY, 2003).

Os endofíticos em associação com as plantas podem promover o crescimento do vegetal, a fixação de nitrogênio, o controle biológico de doenças e de pragas, a produção de antibióticos e sideróforos (VERMA et al., 2001; MADHAIYAN et al., 2004; STROBEL e DAISY, 2003). Microrganismos endofíticos inibindo patógenos de plantas foram relatados por Shimizu et al. (2000), que descreveram que um actinomiceto endofítico produziu substâncias com capacidade de inibir o crescimento de *Sclerotinia homoeocarpa*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi* e *Pythium aphanidermatum*.

Devido a produção de metabólitos secundários por endofíticos, pesquisadores investigam se a prevalência de microrganismos típicos em frutos de café é responsável por determinar a qualidade do café, o que possivelmente pode contribuir para conferir características desejáveis à bebida. Os endofíticos fazem parte da microbiota que está naturalmente associada aos frutos de café, e desse modo podem produzir metabólitos secundários que interferem na composição final da bebida (SILVA et al., 2000; AVALLONE et al., 2001; VEGA et al., 2005). Estudos que associam qualidade da bebida de café e a presença de microrganismos mostram a ocorrência de microrganismos não desejáveis, principalmente fungos (KRUG, 1941), produtores de micotoxinas, como aflatoxina e ocratoxina (PRADO et al., 2004).

Os tecidos de plantas saudáveis do cafeeiro são naturalmente habitados por bactérias, inclusive seus frutos (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997). O mesocarpo

mucilaginoso dos frutos é composto por polissacarídeos complexos, açúcares simples, lipídeos, minerais e proteínas (PETRACO, 2005), os quais fornecem condições que favorece o desenvolvimento de fungos, bactérias e leveduras. Isto permite que os microrganismos endofíticos, que existem naturalmente nos frutos de café, produzam metabólitos secundários que podem interferir tanto positiva quanto negativamente na qualidade da bebida.

Silva et al. (2000) verificaram a abundância e a diversidade de endofíticos em frutos de café no estágio cereja e constataram que o principal grupo é constituído por bactérias, seguida por fungos e leveduras, presentes em todas as fases de secagem dos grãos. Vega et al. (2005), em seus estudos de isolamento de endofíticos em folhas, raízes e ramos de plantas de café, verificaram a presença de bactérias Gram-positivas e negativas, sendo que dentre elas 68% pertenciam ao grupo das Gram-negativas. Dos 87 isolados obtidos, houve predomínio de *Bacillus*, *Clavibacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, todas obtidas de frutos.

Outro estudo importante foi realizado na Zona da Mata em Minas Gerais, onde Santos (2006) verificou a diversidade de microrganismos endofíticos em frutos de café arábica submetido ao processo de seca natural avaliado por meio de técnicas moleculares como PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação). O resultado mostrou que não houve diferença quando foi analisada a diversidade no processo de secagem ao longo de 13 dias.

Cordero (2008), com o objetivo de conhecer a diversidade da comunidade endofítica em plantios de café de alta altitude, caracterizou a comunidade microbiana por sequenciamento de fragmentos do DNA da região 16S, onde a porção não cultivável foi analisada por PCR e DGGE. Para isto foram utilizados *primers* específicos para Actinobactéria, Proteobactéria e Firmicutes. O autor constatou uma relação positiva entre a densidade de bactérias endófitas nos frutos cultivados em plantios em alta altitude.

Shebata et al. (2016) descreveram que microrganismos endofíticos, provenientes de antigas e modernas variedades de milho, foram isolados e testados como agentes de biocontrole de *Sclerotinia homoeocarpa*. Dentre os diversos organismos, foi constatado que isolados distintos de *Burkholderia gladioli* apresentavam

esta capacidade natural, que poderia ser usado na colonização de plantas de milho para controlar a doença.

A ampla diversidade da microbiota endofítica em café arábica traz diversos questionamentos, onde, conseqüentemente, a necessidade por mais estudos a respeito desses microrganismos torna-se relevante, principalmente devido à capacidade de transformar compostos precursores de sabor como um interesse para a produção de cafés de qualidade. Dessa forma, as abordagens moleculares para acessar essa microbiota são fundamentais para identificar e entender a complexa cadeia que está associada à planta e aos endofíticos.

2.4. Principais filos de bactérias endofíticas de importância para as plantas

As bactérias representam o grupo de microrganismos mais diversos e abundantes na terra, que compreende mais de um milhão de espécies (HORN-DEVINE et al., 2004). Entretanto, estima-se que apenas uma porção dessa diversidade da comunidade bacteriana é conhecida (TORSVIK e OVREAS, 2002). A impressionante atividade metabólica, desses organismos, está fundamentada em sua diversidade e adaptabilidade genética, o que os tornam, ocupantes e colonizadores de todos os nichos ecológicos possíveis. As bactérias são importantes para o ambiente e auxiliam na estabilidade dos ecossistemas, e assim, estão presentes em todos os ambientes terrestres, podendo afetar as propriedades físicas e químicas do ambiente, por meio de suas atividades metabólicas (NEWMAN e BANFIELD, 2002). Em plantas, bactérias endofíticas foram isolados de diversas espécies vegetais. Portanto, a associação entre plantas e endófitos, fez com que esses microrganismos co-evoluíssem de acordo com seus hospedeiros (MISAGHI e DONNDELINGER, 1990).

O microbioma, também chamado fitomicrobioma, é definido como sendo todos os microrganismos que colonizam todo o vegetal, desde a rizosfera até a filosfera, incluindo neste nicho, todos os endofíticos e os epifíticos que estão diretamente associados aos seus hospedeiros (QUIZA et al., 2015). Os microrganismos endofíticos foram pesquisados em diversas espécies vegetais, sendo alguns filos de grande importância presentes nas plantas, como Proteobactéria, Actinobactéria e Firmicutes,

estes filos tem representantes identificados e amplamente distribuídos entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O fitomicrobioma endofítico foi estudado em uma ampla gama de espécies vegetais, onde os principais representantes identificados estão distribuídos entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sendo exemplo de alguns gêneros: *Agrobacterium*, *Actinomyces*, *Acinetobacter*, *Agromonas*, *Bacillus*, *Brachymonas*, *Burkholderia*, *Brenneria*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rizobacter*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* e *Xylella* entre outros (LODEWYCKX et al., 2002).

Os filos Proteobactéria, Actinobactérias e Firmicutes são responsáveis por promoverem vários benefícios às plantas, tais como: promoção do crescimento, desenvolvimento e estabelecimento das plantas em condições adversas, inclusive acelerando a emergência de sementes, produção de metabólitos secundários, e assim obtém das plantas hospedeiras nutrição e proteção (ARAÚJO et al., 2002; LODEWYCKX et al., 2002). Além disso, os microrganismos endofíticos pertencentes a estes três filos induzem a resistência contra fitopatógenos, metabolizam compostos de carbono e, como agentes simbiossiontes de plantas, também tem a função de fixar o nitrogênio atmosférico, o que é essencial para a sobrevivência de várias espécies vegetais (MANO e MORISAKI, 2008).

O filo Proteobactéria encontra-se dentro do domínio Bactéria, sendo o grupo mais numeroso e reconhecido neste domínio (ETTEMA e ANDERSSON, 2009). Este filo é dividido em três grupos: Alfaproteobactéria, Betaproteobactéria e Gammaproteobactéria, onde abrigam uma ampla gama de representantes, de habitats e um conjunto de metabólitos de interesse biotecnológico. Alguns representantes das Proteobactérias como *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* já foram estudados em diversas culturas colonizando os tecidos vegetais. Martinez-Hidalgo (2017), em seus estudos sobre o gênero *Rhizobium*, afirmou que analisar a interação de uma planta leguminosa com uma espécie que fixe nitrogênio, pode sem dúvida, contribuir para entender como cultivar, fertilizar e proteger os vegetais de formar mais sustentável,

além disso, diversas bactérias ao atuarem juntas podem induzir a saúde e a sobrevivência das plantas, principalmente quando em situações de estresse ambiental.

Sharma et al. (2015) isolaram *Bacillus* spp. endofítica da rizosfera de algumas culturas e verificaram que em condições controladas uma formulação líquida dos isolados foi promissora ao biocontrole de *Phytophthora capsici*, que causa podridão radicular em tomateiro, e reduziu a severidade da doença em 83,3% e 66,7%, quando considerada a presença de um isolado ou uma mistura de quatro na formulação, respectivamente.

As actinobactérias também foram estudada em diversas culturas agrícolas, devido à grande importância na produção de antibióticos e metabólitos secundários. Marcon (2002), ao estudar a caracterização e o isolamento de actinobactérias endofíticas isoladas de citros, observou que o agente causal da CVC, a *Xylella fastidiosa*, foi inibida em 88,2%.

2.5 Técnicas moleculares para estudos da diversidade genética de microrganismos endofíticos

As técnicas baseadas na diversidade molecular usam as moléculas de DNA ou RNA para inferir a capacidade funcional ou metabólica da comunidade microbiana. A principal vantagem da utilização de estudos baseados na diversidade de moléculas de DNA está na possibilidade de análise das comunidades microbianas independentemente do modo de cultivo (LACAVA et al., 2008). Diversos métodos de estudo de microrganismos endofíticos são utilizados, variando desde o isolamento das espécies em meio de cultivo até a análise de grupos de sequências clonadas a partir do DNA extraído de amostras de plantas desinfestadas superficialmente.

Cada metodologia acessa diferentes porções da comunidade endofítica total e fornece informações que, quando reunidas em uma análise, acabam se complementando. Alguns métodos como: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Length Fragments Polymorphism (AFLP), Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFL-P), Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

(ARDRA), Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE), construção e análise de bibliotecas de clones e sequenciamento são empregadas.

Na tese apenas serão abordadas as técnicas de TRFL-P e sequenciamento pelo método Ion Torrent, pois essas técnicas foram utilizadas neste estudo para analisar a diversidade de grupos de endofíticos, com a finalidade de complementar a avaliação da diversidade da comunidade microbiana endofítica em tecidos de café desenvolvidos em concentração de CO₂ elevada.

Com a descoberta da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), métodos moleculares ganharam força nos estudos com microrganismos. A análise de TRFL-P permite comparar diferentes comunidades de microrganismos provenientes de diversos ambientes (MARSH, 1999). Essa técnica possibilitou a detecção de organismos endofíticos não cultivados quebrando barreiras inerentes às técnicas de isolamento e cultivo (GIRAFFA; CARMINATI, 2008). A técnica de TRFL-P tem sido empregada na caracterização das comunidades microbianas de folhas, caules e frutos (THIES, 2007).

A técnica ganhou conhecimento por causa da alta reprodutibilidade e do acesso a um grande número de unidades taxonômicas operacionais (UTO's). A TRFL-P tem como função determinar o comprimento dos fragmentos terminais de uma reação de restrição, os quais provêm dos produtos da amplificação, onde um dos *primers* é marcado com fluorescência. Este método é sensível às mudanças nas estruturas das comunidades de microrganismos. Além disso, possui alta capacidade de processamento, o que permite analisar grande quantidade de amostras (TIEDJE et al., 1999).

Para a análise de TRFL-P é necessário realizar a extração de DNA das comunidades microbianas de amostras ambientais, a PCR do gene 16S do DNA, a reação com enzima de restrição e a análise dos fragmentos terminais de restrição, os chamados (T-RFs) por meio de sequenciador automatizado. Nesta técnica, pode ser usado o screening de algum gene a fim de diferenciar comunidades de amostras ambientais, com isto os fragmentos de restrição terminal obtidos são medidos e comparados entre as amostras, os quais são usados para estudo da análise de componentes principais e matrizes de similaridade.

Os *primers* específicos utilizados para domínio ou grupo são marcados com fluoróforo que são detectados pelo sequenciador ABI (TIEDJE et al., 1999). Os fluoróforos mais usados são FAM, HEX e ROX (THIES, 2007). Após a obtenção dos produtos da PCR, os mesmos são purificados em reações individuais e digeridos com enzimas de restrição, sendo que *HhaI*, *MSPi* e *RsaI* as principais enzimas que determinam máxima resolução em comunidades naturais, embora outras sejam usadas em ocasiões especiais (MARSH et al., 2000).

A marcação com fluoróforo determina os tamanhos dos T-RFs que foram marcados, e assim eles são convertidos em um eletroferograma, onde cada pico é representado por um T-RF. Para processar os dados, a conversão dos eletroferogramas é realizada em uma matriz, onde cada coluna representa uma amostra e cada linha corresponde a uma T-RF que é encontrada em uma amostra. Alguns softwares foram desenvolvidos para analisar os dados gerados pelo sequenciador, sendo eles: gene ScanTM, Gene MapperTM (ABI), GelCompar II (Applied-Maths) e Peak Scanner v 1.0 (Applied Biosystems). Estes programas de bioinformática permitem calcular o tamanho do fragmento de restrição terminal e também a intensidade de fluorescência. Assim, o comprimento do fragmento de restrição é medido por meio da base de dados ribossomais completa, o que pode proporcionar um ponto de partida filogenético lógico, e com isto também pode medir o fragmento de restrição para cada gene 16S rDNA. O padrão do RFLP é reduzido e cada banda de DNA visível, ou seja, o fragmento representa uma única UTO. Isto pode proporcionar uma base quantitativa para se estimar a diversidade, o que torna mais sensível para medições com outros métodos (LIU et al., 1997).

Nenhum relato foi encontrado do uso da técnica para estudos em comunidades endofíticas em tecidos de café desenvolvidos em condições de elevação da concentração de CO₂ atmosférico, mas alguns trabalhos têm sido publicados com outras amostras ambientais. Vasconcelos et al. (2013) utilizaram o método TRFL-P para identificar indicadores de qualidade do solo em amostras de solo coletadas em quatro áreas de florestas durante o verão e inverno. Para tanto utilizaram a enzima de restrição *HhaI*. Os autores verificaram que houve grande similaridade da comunidade bacteriana

nas amostras coletadas no verão e no inverno e também constataram que o perfil de TRFL-P não encontrou diferença entre locais de coleta das amostras.

Outro exemplo da aplicação do T-RFLP pode ser verificado no trabalho de Blackwood e Paul (2003). Os autores verificaram comunidades bacterianas distintas na rizosfera em frações leves e pesadas do solo, sendo estas associadas a diferentes fontes de matéria orgânica e também em sistemas agrícolas distintos. Assim, verificaram maior variabilidade na rizosfera, bem como no perfil do solo para milho e alfaça em plantio orgânico, a qual foi maior do que em plantio convencional.

Em relação ao sequenciamento, os métodos utilizados em larga escala para o estudo da diversidade microbiana de diferentes amostras ambientais são fundamentais. A diversidade das técnicas moleculares para pesquisas em bactérias tem sido elucidada e métodos modernos de sequenciamento com um alto rendimento são usados. São várias as plataformas de sequenciamento utilizadas, como, por exemplo, Applied Biosystems SOLiD™ System, Illumina HiSeq 2000, Ion Torrent e Roche 454/FLX. Essas são semelhantes por apresentarem a capacidade de produzir milhões de sequências revelando uma grande diversidade de microrganismos presentes nas comunidades, o que não é detectado no sequenciamento clássico pelo método Sanger (MARDIS, 2008).

A plataforma Ion Torrent é uma técnica de sequenciamento singular, pois usa um íon semiconductor e não faz uso de fluorescência. Seu funcionamento é baseado na detecção da alteração de pH, o qual é gerado pela adição de um nucleotídeo à cadeia de DNA, em uma reação na qual há a liberação de hidrogênio (WHITELEY et al., 2012). A preparação para o sequenciamento é realizada com a construção de bibliotecas e a ligação de adaptadores próprios nos finais das sequências. Com isso, os fragmentos ligados aos adaptadores são unidos a micropartículas esféricas e amplificados por PCR em emulsão. As micropartículas com os fragmentos aderidos já amplificados são aplicados nos micros poços de um chip, que são depositados por meio da centrifugação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2011). A solução contendo um tipo de nucleotídeo é transferida para cada poço do chip. Se esse nucleotídeo for complementar ao fragmento de DNA, que está sendo sequenciado, haverá a formação das pontes de hidrogênio entre eles, promovendo a liberação de prótons no meio,

ocorrendo a alteração de pH. Essa mudança, ao ser detectada, é convertida em sinal digital identificando a incorporação dos nucleotídeos presentes no micro poço naquele exato momento. Os dados digitais gerados são enviados ao servidor Ion Torrent, onde serão processados e as sequências montadas por meio de base “calling algorithms”, tendo como resultado a produção de milhões de sequências.

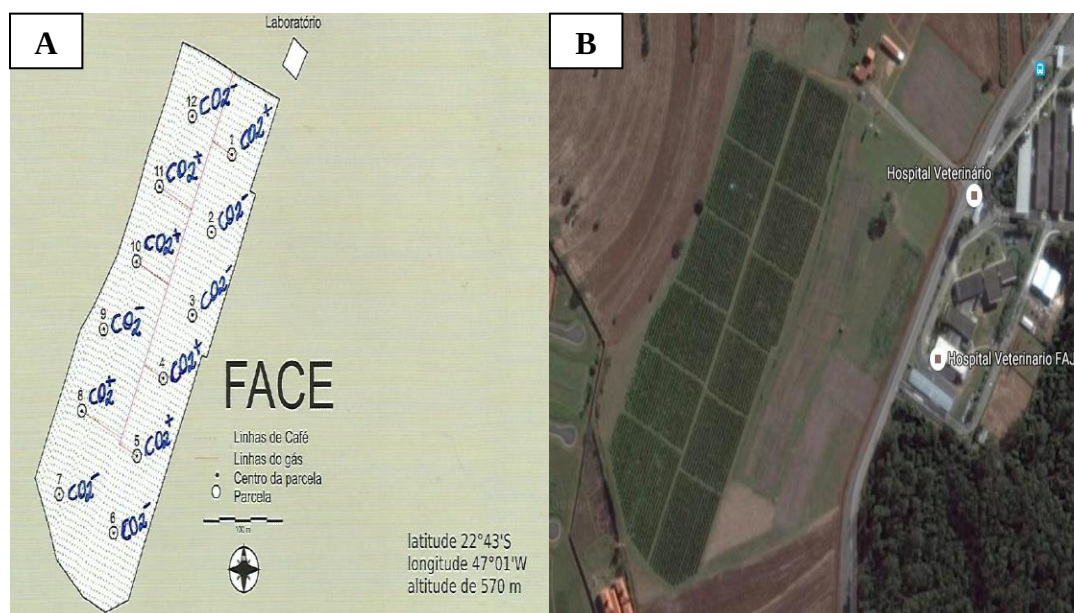
A biodiversidade microbiana associada às plantas constitui um sistema ecológico complexo, sendo considerada um superorganismo que se encontra agregado ao genoma vegetal. Esse microbioma contém muito mais genes que o próprio vegetal. Neste sentido, conhecer os microrganismos associados às plantas de café é de grande relevância, pois, com o auxílio de programas de sequenciamento, pode-se inferir na caracterização do microbioma, bem como na possível interferência desses microrganismos na ocorrência de doenças e pragas e na qualidade da bebida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área experimental, amostragem e desinfestação superficial do vegetal

A área experimental onde foram realizadas as amostragens está localizada na Embrapa Meio Ambiente, situada no município de Jaguariúna, estado de São Paulo. As coletas de ramos, folhas e frutas de cafeeiro foram realizadas no experimento ClimapestFACE (GHINI et al., 2015) (Figura 1) e as atividades laboratoriais desenvolvidas no laboratório de microbiologia ambiental.

Figura 1: Área experimental do projeto ClimapestFACE instalada na Embrapa Meio Ambiente. (A) Localização dos anéis, onde CO_2^+ e CO_2^- correspondem aos tratamentos com enriquecimento de CO_2 e com CO_2 ambiente, respectivamente. (B) Vista aérea no mapa dos anéis em campo.



Amostras de folhas, frutos e ramos sadios de plantas de café *Coffea arabica* cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 foram coletadas na área experimental do ClimapestFACE que contém 12 anéis, sendo cada um com 10 metros de diâmetro. Destes anéis, seis são enriquecidos com CO_2 . O CO_2 provém de um tanque com

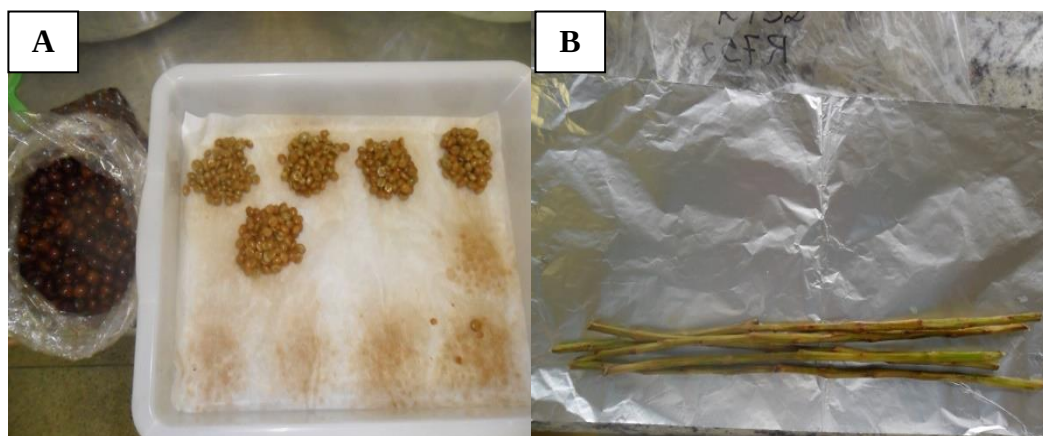
capacidade para 20 toneladas. As concentrações de CO₂ do experimento são apresentadas na Figura 2.

A Figura 2 refere-se à frequência relativa de concentrações de CO₂ nas faixas 300-450 e 450-650 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ [correspondentes à variação máxima de 20% em relação às concentrações alvo de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (CO₂ ambiente) e 550 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (CO₂+)] observada mensalmente nos anos 2013, 2014 e 2015. Observa-se nos gráficos, onde os períodos de coletas das amostras estão destacados em vermelho, que a frequência relativa, expressa em porcentagem, para a primeira coleta de folhas no período de florada em 2013, foi de 60% na menor concentração e 43% na maior concentração, já na segunda coleta em 2014, no mesmo período, a frequência relativa foi de 50% para a menor concentração e 55% na maior concentração. Já para a primeira coleta dos ramos, em 2014, também realizada no período de florada, a menor e a maior concentração foram as mesmas das folhas, mas a segunda coleta dos ramos, realizada na florada de 2015, teve uma frequência relativa de 25% e de 75% para a menor e maior concentrações, respectivamente. Quanto aos frutos, a frequência relativa da menor e maior concentração na primeira coleta dos grãos em 2014, foi de 22% e 71%, respectivamente. A segunda coleta realizada na época de colheita dos grãos, em 2015, obteve uma frequência relativa de 30% para a menor concentração e 65% maior concentração de CO₂.

A coleta das folhas foi realizada em cinco plantas por anel, selecionadas aleatoriamente dentro de cada anel, foram coletadas seis folhas por planta. As folhas foram escolhidas por toda a planta, tanto na parte superior quanto na inferior, coletadas no período da florada de 2013 e 2014. O mesmo procedimento foi adotado para a coleta dos ramos, onde retirou-se seis fragmentos de ramos das mesmas plantas, sendo as coletas realizadas na florada de 2014 e 2015. Os frutos foram coletados no período de colheita dos grãos, nos mesmos anos da coleta dos ramos, os quais foram colhidos no estágio cereja. A colheita foi realizada nas mesmas cinco plantas, onde foram coletados as folhas e os ramos, num total de 15 frutos por planta e selecionados em toda a planta.

As folhas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% no momento da coleta, ainda no campo, para evitar a oxidação das mesmas. Imediatamente as folhas foram embaladas em papel alumínio e armazenadas em uma caixa térmica contendo nitrogênio líquido. Ao término da desinfestação, as amostras foram transportadas para o laboratório e armazenadas em ultra freezer a -80°C . As amostras de frutos e ramos passaram por uma pré-lavagem com detergente neutro e enxaguados em água corrente. Em seguida, foram lavados em água destilada e depois submetidos à desinfestação com álcool 70%, por um minuto, seguido de lavagem em hipoclorito de sódio a 5%, por dois minutos, e dois enxagues em água destilada esterilizada. Ao término do processo de desinfestação, os frutos e ramos foram descascados, embalados em papel alumínio e armazenados em -80°C (Figura 3).

Figura 3: Frutos de café arábica descascados após a desinfestação (A) e ramos de café arábica sendo embalados em papel alumínio depois de desinfestados e descascados (B).



3.2 Extração de DNA genômico total de folhas de cafeeiro

A extração de DNA genômico total de folhas de cafeeiro foi realizada de acordo com o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). Em nitrogênio líquido, foram maceradas três folhas até a obtenção de um pó fino. O mesmo foi rapidamente transferido para microtubos de 2,0 mL, ao qual foi adicionado 750 μL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 Mm, EDTA 20 Mm, PVP 1% e β -

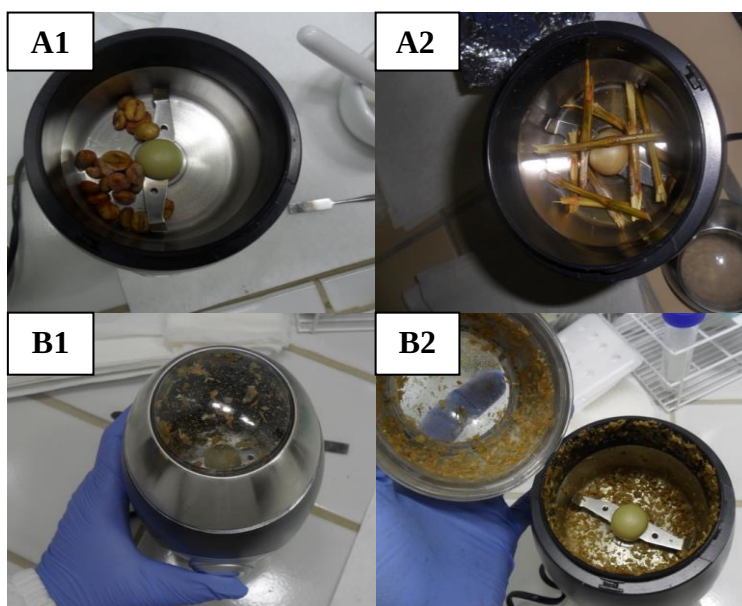
Mercaptoetanol 0,2%). Em seguida, o tubo contendo a suspensão foi incubado em banho Maria a 65 °C por 30 minutos. Logo após, foram adicionados 650 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v). Depois, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm, por 10 min. Em seguida, a suspensão foi transferida para novos tubos contendo 650 µL de clorofórmio-álcool isoamílico, sendo este procedimento repetido por três vezes. Em seguida, foi realizada a precipitação do DNA com 700 µL de isopropanol gelado e centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. Após descartar o sobrenadante, o DNA foi lavado com 250 µL de etanol a 70%, por duas vezes, e centrifugado por três minutos a 12.000 rpm. Por último, o DNA foi ressuscitado em 40 µL de água milli-Q esterilizada mais 2 µL de RNAase A (10 mg/mL). A suspensão foi incubada por 30 minutos em banho Maria a 37 °C e armazenada em freezer a -20°C.

3.3 Extração de DNA genômico total de frutos e ramos de café, purificação e quantificação de DNA

Para a extração de DNA de frutos e ramos de cafeeiro foi utilizado o protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1987). Com o auxílio de um moedor de café, amostras de frutos (oito frutos) e ramos (três fragmentos de ramos), previamente desinfestados e descascados, foram trituradas, para facilitar o processo de maceração (Figura 4). Em nitrogênio líquido, os grãos e os ramos triturados, foram macerados até obtenção de um pó fino. O pó foi transferido para microtubos de 2,0 mL, onde foram adicionados 830 µL de tampão de extração (CTAB 4%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, PVP 1% e β-Mercaptoetanol 0,2%). Nas amostras resultantes, foram adicionados 125 µL de lisozima mais 30 µL de proteinase k (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri). O tubo contendo a suspensão foi incubado a 37 °C por uma hora e transferido para nova incubação em banho maria por 20 min a 65 °C. Em seguida, a suspensão foi mantida a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foram adicionados 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v). Os tubos foram invertidos gentilmente 50 vezes para homogeneização, logo após, a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 min, este procedimento foi repetido três vezes. Foram adicionados 420 µL de isopropanol, em seguida, o tubo foi mantido à temperatura

ambiente por 30 min e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado em 250 μ L de etanol 70% e centrifugado por 3 min a 12.000 rpm, este procedimento foi repeti duas vezes. Após o descarte do etanol, o DNA secou à temperatura ambiente e foi ressuspendido em 40 μ L de água milli-Q autoclavada mais 2 μ L de RNAase A (10mg/mL). Por último, as amostras foram colocadas em banho maria a 37 °C por 45 min.

Figura 4: Frutos e ramos de café para triturar em moedor (A1 e A2). Amostras trituradas (B1 e B2).



Para as amostras de DNA de folhas, frutos e ramos de café foi realizada a purificação dos mesmos, adicionando 40 μ L de fenol e centrifugando por 2 min a 10.000 rpm, em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e acrescenta 10 vezes a solução de acetato de sódio mais 2,5 vezes de álcool absoluto. A solução foi homogeneizada e armazenada a -80 °C por uma hora. Após o descongelamento das amostras, as mesmas foram centrifugadas por 30 min. a 10.000 rpm em seguida descartado o sobrenadante e acrescentados 200 μ L de álcool a 70% e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. Após o descarte do etanol as amostras secaram a temperatura ambiente. O DNA purificado foi ressuspenso em 40 μ L de água milli-Q e armazenado em geladeira. O DNA das amostras de folhas, frutos e ramos foi analisado em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1

Mm pH 8,0) e visualizado em transluminador (^{BB}UVP Dual Intensity Transilluminator). O DNA das amostras foi quantificado com auxílio do equipamento NanoDrop, o qual permite estimar a concentração de DNA da amostra, a mesma é determinada ao se medir a absorbância de 260 nanômetros. A absorbância de uma densidade óptica (DO) em A_{260} corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de fita dupla, onde o grau de pureza do DNA é indicado pela fração A_{260}/A_{280} (ácidos nucleicos/proteínas), que corresponde a 1,8 para DNA puro.

3.4 Amplificação de 16S rDNA de bactéria endofítica e purificação dos produtos da PCR

A amplificação de 16S rDNA foi realizada utilizando *primers* universais para bactérias, sendo estes: 27F (5'GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') (HEUER e SMALA, 1997) marcado com FAM e o 1378R (5'CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997). O preparo do mix da PCR foi realizado com Buffer 5X, MgCl_2 25 mM, DNTPs a 10 mM (Promega), BSA 10 x 10 ng/ μL , Taq DNA polimerase (Promega) e água milli-Q esterilizada para um volume final de 25 μL . As condições para a reação de amplificação foram as seguintes: temperatura inicial de desnaturação a 95 °C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de 95 °C em 30 segundos, 55 °C durante um min para anelamento dos *primers*, 72 °C durante 2 min e por último uma extensão final de 72 °C por 10 min, realizada em termociclador modelo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Em seguida, foi realizada a eletroforese para os produtos da PCR, onde foi usado 5,0 μL do marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) mais 5,0 μL de gel red e 3,0 μL do produto da PCR mais 3,0 μL de gel red. Após aplicação das amostras no gel de agarose a 1%, o mesmo foi submetido a um campo elétrico de 80 V por 40 min em uma cuba de eletroforese, visualizado e foto documentado em um transluminador.

Após a amplificação, os produtos da PCR passaram pelo processo de purificação, onde nesta etapa foi realizada a mistura dos produtos da PCR das amostras de DNA (volume de 25 μL), sendo que nesta etapa, as cinco amostras que foram coletadas em cada um dos 12 anéis do experimento FACE foram misturadas

formando uma amostra composta de cada concentração de CO₂. Estes produtos foram transferidos para tubos de 1,5 mL e neles foi adicionado 1 mL de isopropanol gelado e centrifugado a 15.000 rpm por 15 min. Logo após, foi descartado o sobrenadante e acrescentados 125 µL de etanol 80% gelado, centrifugado a 13.000 rpm, incubado por um minuto em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em secagem até não ter resíduo de etanol. Após isso, adicionou-se 50 µL de água milli-Q e armazenou-se em geladeira por 24 horas.

3.5 Digestão com enzima de restrição dos produtos de PCR para análise de TRFL-P e precipitação dos produtos da digestão

Os produtos de PCR purificados foram digeridos com a enzima de restrição, *HhaI* (GCGC), que confere bons resultados de T-RFLP em bactérias (MARSH et al., 2000). A reação de T-RFLP foi preparada com Buffer Tango 10x, a endonuclease *HhaI*, o produto da PCR e água milli-Q, para completar um volume final de 25 µL. O processo de digestão com enzima de restrição foi realizado em um termociclador através da seguinte condição: 37 °C durante 90 min em um estágio de dois ciclos e 68 °C por 10 min em dois estágios de um ciclo, para inativar a enzima. Os produtos da digestão passaram pelo processo de precipitação com etanol, EDTA e acetato de sódio, onde foram adicionados às amostras de DNA 2 µL de EDTA (125 mM), 2 µL de acetato de sódio (3M) mais 50 µL de etanol 100% e misturado tudo por inversão. Em seguida, foi incubado à temperatura ambiente por 15 min. e depois centrifugado a 3.000 g por 30 min. Logo após, foi descartado o conteúdo por inversão e acrescentados 70 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação por 15 min a 2.300 g. Por último, o etanol foi descartado e as amostras secaram em temperatura ambiente e foram armazenadas à temperatura de 4 °C envolvidas em papel alumínio.

3.6 Análise do polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (TRFL-P) do gene 16S de rDNA de bactérias endofíticas

Logo após a precipitação, os produtos da digestão com enzima de restrição foram encaminhados para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, onde foi analisado o polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) do gene 16S rDNA dos microrganismos endofíticos. Os produtos da digestão foram ressuspensos em água milli-Q e misturados a 8,925 µL de formamida Hidi e a 0,75 µL do padrão GeneScan 500 ROX Size Standard Applied Biosystems mais 2,0 µL do produto da digestão, em seguida, aplicados no sequenciador automático Applied Biosystems (ABI 3730). Os dados do T-RFLP, após terem sido analisados no sequenciador automático ABI, foram obtidos e processados utilizando-se o Peak Scanner Software 2 (Applied Biosystems). Foi verificada a qualidade da corrida visualmente, após a confirmação da qualidade, foram exportados os dados em uma matriz para o Excel e organizados para proceder a análise multivariada. Para discriminar os picos verdadeiros dos ruídos do “background”, foi utilizada uma linha limite de 50 unidades de fluorescência para as amostras de DNA de bactéria de folhas, frutos e ramos de cafeeiro. De todos os dados eliminou-se os T-RFs menores que 50 pares de bases e maiores que 800 (CULMAN et al., 2008).

O programa estatístico PAST foi utilizado para analisar os dados. A análise foi realizada pelo teste SIMPER, o qual pesa a contribuição dos T-RFs baseado na similaridade e dissimilaridade entre amostras (MESEL et al., 2004). Outro teste de similaridade utilizado foi o ANOSIM, sendo este calculado pela matriz de “Bray-Curtis” que calcula um valor de R, o qual pode variar de -1 a 1, e assim, os valores que estiverem próximos de 0 indicam uma hipótese nula de diferença entre os agrupamentos, já os valores maiores que 1 indicam que há diferença entre os grupos (BENNETT; KASEL; TIBBITS, 2008).

3.7 Reação de amplificação de 16S rDNA e purificação dos produtos da PCR de frutos e ramos de cafeeiro para sequenciamento pela técnica Ion Torrent

A amplificação foi realizada para 16 amostras de DNA para os frutos na colheita das safras de 2014 e 2015 e para os ramos coletados no período de florada dos anos descritos na Tabela 1. Das 16 amostras, oito foram obtidas de frutos e oito de

ramos de cafeeiro, sendo quatro amostras de anéis com CO₂ ambiente e quatro de anéis enriquecidos com CO₂+, onde, dessas quatro amostras duas são da mesma planta, mas coletadas em períodos diferentes (Tabela 1). A seleção das referidas amostras foi feita de acordo com a qualidade da pureza do DNA. A amplificação foi realizada no laboratório de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” com o objetivo de amplificar 16S de bactéria e eliminar na amplificação DNA cloroplastidial. Para isto, utilizaram-se *primers* específicos para esta finalidade. A reação foi preparada fazendo-se um mix de PCR com os *primers* 799F (AAC MGG ATT AGA TAC CCK G) e 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT) (CHELIUS, TRIPLETT, 2001), a 10 mM, PCR Buffer 10X, MgCl₂ a 50 mM, BSA a 0,02 mg/mL, DNTP's a 2,5 mM, Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) 5,0 U/μL, água milli-Q e 1 μL do DNA para um volume final de 50 μL, como controle positivo foi usado DNA de *Clostridium* sp. e como controle negativo com água milli-Q.

Tabela 1: Amostras de frutos (Fr) e ramos (R) de cafeeiro coletadas em 2014 e 2015 e selecionadas para sequenciar

Amostras*	Anéis com CO ₂ ambiente	Anéis enriquecidos com CO ₂
Frutos	Fr341, Fr342; FR641, Fr642	Fr841, Fr842; Fr1031, FR1032
Ramos	R241, R242; R921, R922	R121, R122; R1151, R1152

*As amostras são de uma mesma planta e coletadas em dois anéis com CO₂ ambiente e de uma planta em dois anéis com enriquecimento de CO₂. O primeiro número é referente ao número do anel (de 1 a 12), o segundo da planta e o terceiro referente ao primeiro e ao segundo ano.

No termociclador as condições para a reação foram: temperatura de desnaturação de 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 53°C a 40 segundos, 72°C a 40 segundos para anelamento dos *primers* e uma extensão final a 72°C por 7 min, realizada em termociclador da Applied Biosystems By Life Technologies. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar se os produtos de PCR foram amplificados. Para isto, foram aplicados no gel 3 μL de KB mais 3 μL de Syber Green e 5 μL do produto da PCR. A reação foi submetida

a um campo elétrico de 80 V por 1:50 min, depois o gel foi visualizado e foto documentado em transluminador. Após a eletroforese, para confirmação da amplificação, outro gel foi preparado a 1,5%, para sacar as bandas de 16S rDNA bacteriano de interesse, sendo que este gel foi submetido a um campo elétrico de 70 V, por 3:00 horas. Após a visualização do gel em transluminador, as bandas de DNA contidas no gel foram cortadas com auxílio de bisturi e colocadas em tubos eppendorf de 2,0 mL, os quais foram pesados antes e depois da deposição do gel em seu interior. Para finalizar, o DNA foi purificado utilizando-se o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification, de acordo com as recomendações do fabricante.

Vale ressaltar que oito amostras de folhas, também foram amplificadas com este par de *primers*, mas não amplificou bandas de DNA no mesmo nível de altura da banda do controle positivo, ou seja do DNA de *Clostridium* sp. Assim, é necessária uma otimização da PCR para que seja possível amplificar DNA bacteriano para os referidos *primers*.

3.8 Análise da comunidade bacteriana em frutos e ramos de café do gene 16S rDNA para sequenciamento pela técnica Ion Torrent

Para a construção da biblioteca de amplificons do gene 16S rDNA de bactérias, foram selecionadas oito amostras de frutos e oito de ramos de cafeeiro cultivados em CO₂ ambiente e com enriquecimento de CO₂+, onde quatro amostras foram oriundas de dois anéis sem injeção de CO₂ e mais quatro de dois anéis com injeção de CO₂, tanto para frutos quanto para os ramos.

Essas amostras foram coletadas nas safras de 2014 e 2015, no período de colheita dos grãos, para os frutos, e na época de florada, para os ramos, assim, foram utilizadas duas amostras da mesma planta, das duas épocas de coleta, de ambas as partes, frutos e ramos (Tabela 2).

O DNA das 16 amostras foi amplificado com os iniciadores, 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC) e 1193R (CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG ATC GTC RTC CCC RCC TTC C). Portanto, para o primer 967F foi sintetizado um oligonucleotídeo iniciador 967F diferente para cada uma das amostras, unindo a um *tag* de identificação

conforme a Tabela 2. Cada *barcode* composto pelos cinco pares de base, teve a função de identificar a origem de cada uma das sequências. Cada uma das bibliotecas de amplicon foi gerada por meio do preparo da reação de amplificação, a qual continha 5,0 µL de tampão 10x; 4,5 µL de MgCl₂; 0,4 µL de dNTP (2,5 mM); 0,5 µL de cada um dos *primers*; 0,7 µL de Taq DNA Polimerase; 1,0 µL de DNA das amostras e água milli-Q autoclavada para completar um volume final de 50 µL. A amplificação das reações foi realizada em um termociclador (Applied Biosystems –PCR System) de acordo com as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 57°C por 45 seg, 72°C por um minuto para anelamento dos *primers*; e uma extensão final de 72°C a 10 min (SOGIN et al., 2006).

Para conferir a qualidade das amostras amplificadas com *barcodes*, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde o gel foi corado com LB mais gel Red, e o marcador utilizado foi o Low Mass para identificar os tamanhos das bandas de DNA. Após finalizada a corrida do gel, o mesmo foi foto documentado em transluminador.

A purificação das bibliotecas foi realizada com a utilização do kit de purificação Agencourt®AMpure® XP Reagent e barra magnética, conforme o protocolo recomendado pela Life Technologies – Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries). Uma vez purificadas, as bibliotecas passaram pelo processo de quantificação, que utilizou o kit Qubit Molecular Probes (Invitrogen). A concentração de todas as amostras foi ajustada e um pool dessas amostras foi preparado com 10 µL de cada amostra em um só tubo, totalizando assim 160 µL, o qual foi usado para aplicação no E-Gel® EX With Sybr® Gold II 2% Size Select da Invitrogen by Life Technologies, como recomendado pelo fabricante, e por último, foi feito o ajuste da concentração de DNA da biblioteca, a qual foi quantificada no Qubit. A biblioteca foi ajustada para um fator de diluição em pM, de onde 25 µL desse pool foram usados para a reação de amplificação de emulsão, a PCR de emulsão foi realizada pelo protocolo do kit Ion PGM™ Hi-Q™ View One Touch 2, de acordo com as recomendações fornecidas pela Life Technologies (www.iontorrent.com), onde os fragmentos dos amplicons das bibliotecas foram ligados às esferas.

Tabela 2: Barcodes das amostras de frutos e ramos de café selecionados para sequenciamento pela técnica Ion Torrent.

Código das amostras (Identificação das amostras)	Tag	Barcode (5 pb)
Fr341 (Fruto, anel 3, planta 4, coleta 1)	1	GATCT
Fr342 (Fruto, anel 3, planta 4, coleta 2)	2	ATCAG
Fr641 (Fruto, anel 6, planta 4, coleta 1)	3	ACACT
Fr642 (Fruto, anel 6, planta 4, coleta 2)	4	AGCTA
Fr841 (Fruto, anel 8, planta 4, coleta 1)	5	CACAC
Fr842 (Fruto, anel 8, planta 4, coleta 2)	6	ACAGA
Fr1031 (Fruto, anel 10, planta 3, coleta 1)	7	AGATG
Fr1032 (Fruto, anel 10, planta 3, coleta 2)	8	CACTG
R241 (Ramo, anel 2, planta 4, coleta 1)	9	CAGAG
R242 (Ramo, anel 2, planta 4, coleta 2)	10	CGCAG
R921 (Ramo, anel 9, planta 2, coleta 1)	11	CTGTG
R922 (Ramo, anel 9, planta 2, coleta 2)	12	GTGAG
R121 (Ramo, anel 1, planta 2, coleta 1)	13	TCATG
R122 (Ramo, anel 1, planta 2, coleta 2)	14	AGCAT
R1151 (Ramo, anel 11, planta 5, coleta 1)	15	CAGCT
R1152 (Ramo, anel 11, planta 5, coleta 2)	16	CATGT

Depois que as esferas foram recuperadas, foi realizado o enriquecimento no equipamento Ion One Touch ES (Life Technologies) e, logo após, preparo e carregamento das esferas no chip 316 V2, de acordo com o seguinte protocolo de sequenciamento: Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit, no sequenciador Personal Genome Machine™ (PGM™) Ion Torrent da Life Technologies.

3.9 Análise das sequências geradas no sequenciamento

Para a manipulação inicial das sequências que foram geradas no sequenciamento, foi utilizada a plataforma Qiime online (https://qiime.or/documentation/file_formats.html), para transformar os dados brutos gerados no sequenciador Ion Personal Genome Machine™ (PGM™), sendo os dados convertidos em sequências no formato fasta, para que assim pudessem ser manipulados, de acordo com as análises de interesse. Todas as análises foram realizadas no programa QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPOROSO et al., 2010). Para a análise das unidades taxonômicas operacionais (UTOS), foi utilizado o *ocomandopicy_otus.py*, a fim de classificar as sequências em UTOS, pelo método *uclust*. A separação das sequências foi feita pelo comando, *pick_rep_set.py*, com o objetivo de separar uma só sequência como sendo a representante de cada umas das UTOS. O objetivo foi reduzir os números de sequências e facilitar o processo de alinhamento realizado pelo comando *align_seqs.py*. A classificação taxonômica foi realizada por meio do comando *assing_taxonomy.py* usando o método Blast. As Tabelas das OTUS foram obtidas usando o comando *make_otu_table.py*. Já para a obtenção das Figuras e Tabelas dessas mesmas classificações taxonômicas foi usado o comando *sumarize_taxa_through_plots.py*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do TRFL-P pelo teste ANOSIM e SIMPER e análise de Unidades Taxonômicas Operacionais

Os dados dos testes estatísticos ANOSIM e SIMPER utilizados nos resultados da análise da técnica de TRFL-P com a enzima de restrição *HhaI* são apresentados na Tabela 3. Ambos os testes foram realizados calculando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis. O teste ANOSIM é utilizado para avaliar se há diferença na composição das comunidades e entre os tratamentos e avalia a diferença entre grupamentos de amostras de diferentes locais e tratamentos experimentais distintos (DANOVARO et al., 2006).

A análise de ANOSIM mostrou que houve diferença quando se comparou as comunidades bacterianas entre os tecidos do cafeeiro (Tabela 3). Nos tecidos Folha X Fruto, Folha X Ramo e Fruto X Ramo a diferença foi de 0,159, ou seja, igual para estes ambientes, para as comunidades presentes, uma vez que o valor de r não foi igual a zero. Mas, quando se analisou os tratamentos com CO₂ ambiente e enriquecidos com CO₂ (CO₂ +) pelo teste ANOSIM, observa-se que não houve diferença das comunidades de bactérias em ambos os tratamentos, pois valores observados foram $r = 0,0$ e $r = -0,003$ ($p < 0,05$) para a enzima *HhaI* (quando o valor de r é igual a zero, entende-se que a hipótese é nula, isto é, não existe diferença entre as comunidades bacterianas presentes).

O teste de similaridade SIMPER avalia a diferença entre os grupos, sendo os valores dos resultados expressos em porcentagens de dissimilaridade. Assim, quanto maior estes valores, mais diferentes serão as comunidades nos ambientes estudados, uma vez que o valor indica dissimilaridade. O teste SIMPER identifica T-RFs que são responsáveis por aspectos particulares da estrutura microbiana encontrada na matriz de similaridade de Bray-Curtis (WOLSING; PRIEMÉ, 2004). Ao se comparar os resultados dos dois índices, foi observado que um valor confirma o outro. Neste sentido, foi observado que entre os tecidos Folha X Fruto a dissimilaridade foi de 90,28%, o que indica uma diferença entre esses dois órgãos vegetais. Para Folha X Ramo e Fruto X

Ramo houve uma dissimilaridade de 92,49% e 92,42%, respectivamente, entre estes tecidos, o que mostra que ambos são mais distintos que o primeiro grupo de tecidos. Esses dados indicam que há uma dissimilaridade maior entre eles. Entretanto, nos tecidos onde as plantas de cafeeiro são submetidas às duas concentrações de CO₂ a dissimilaridade foi 89,87%, apresentando um valor mais baixo de dissimilaridade quando comparado aos ambientes de folha, fruto e ramo entre eles, o que confirma o valor obtido pela análise de ANOSIM.

Tabela 3: Índice de similaridade pelos testes ANOSIM e SIMPER de comunidades bacterianas obtidos por meio da técnica de T-RFLP.

TECIDOS	ANOSIM ^a	Valor de p	SIMPER ^b
	<i>HhaI</i>		
Folha X Fruto	0,159	0,0028	90,28%
Folha X Ramo	0,159	0,0028	92,49%
Fruto X Ramo	0,159	0,0028	92,42%
CO ₂ + e CO ₂ ambiente	- 0,003	0,4961	89,87%

^aANOSIM testa as diferenças entre amostras. Onde valores de r são expressos todos com p < 0,001. Valores >0,75 são estatisticamente diferentes; >0,5 apresentam sobreposição e <0,5 diferem estatisticamente. ^bSIMPER - quanto maior for a porcentagem, maior é a dissimilaridade entre as amostras.

Cada membro da comunidade bacteriana tem como característica atribuída o comprimento do T-RF do amplicon da PCR digerida com a endonuclease de restrição. Onde cada T-RF que é encontrado na análise de fragmentos corresponde a uma Unidade Taxonômica Operacional (UTO), mas isto não quer dizer que cada T-RFs seja uma única espécie ou uma única UTO, uma vez que múltiplos microrganismos compartilham T-RFs similares ou até mesmo idênticas.

Desse modo, de acordo com o índice de similaridade de Bray-Curtis, foi verificado que, no agrupamento por tratamentos, com CO₂ ambiente e com enriquecimento de CO₂, o número de UTO's encontradas foi 72. Quando se

compararam os agrupamentos por partes da planta, 16 UTO's foram encontradas no agrupamento Folha X Fruto, 65 UTO's para Folha X Ramo e 71 UTO's no agrupamento Fruto X Ramo. Isso mostra que várias sequências podem estar compartilhando o mesmo comprimento de T-RF, o que pode ser observado nos gráficos de PCA quando ocorre sobreposição de UTO's das amostras analisadas pela enzima de restrição.

De modo geral, a própria estrutura das comunidades pode limitar quanto às informações de dados, como por exemplo, se existe uma diversidade maior na comunidade de bactéria presente nos ambientes com CO₂+ e nos tecidos Folha X Fruto, Folha X Ramo e Fruto X Ramo.

Diversas comunidades endofíticas têm sido estudadas por meio de métodos independentes de cultivos e uma grande diversidade de novos táxons em diferentes ambientes tem sido observada, seja eles em solos, em ambientes aquáticos, na rizosfera, folhas e outros. Santana (2013) verificou a composição de comunidades bacterianas endofíticas presentes em *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) por meio da extração de DNA do material vegetal e amplificação da região 16S para estudo do perfil de restrição. O autor verificou que os principais filos foram Proteobactéria, Actinobactéria, Acidobactéria, Firmicutes e Bacteriodetes, os quais foram responsáveis por 28,7%, 11,5%, 2,6%, 2,6% e 2,5%, respectivamente, das UTO's que estão presentes em bactérias endofíticas da raiz de *B. dracunculifolia*. Em frutos de café arábica, Santos (2008) estudou as UTO's presentes em comunidades bacterianas endofíticas, constatando 38 UTO's de bactérias endofíticas presentes em frutos de café, sendo Proteobactéria, Firmicutes e Actinobactéria os principais filos encontrados.

4.2 Análise dos Componentes Principais dos perfis de T-RFLP

A estrutura de comunidades bacterianas foi analisada utilizando-se os Componentes Principais dos perfis de TRFL-P (Figura 5). No gráfico de ordenação, as amostras foram separadas de modo distintos, onde a variabilidade das amostras é explícita no primeiro eixo plotado. No gráfico de ordenação, o agrupamento foi definido para demarcar posições correspondentes às partes da planta amostradas, folhas, frutos e ramos de cafeeiro, considerando cinco tratamentos com e sem o incremento de CO₂.

A construção do topo global do gráfico foi realizada por meio da enzima de restrição *HhaI*, a qual conferiu confiabilidade dos dados e apresentou uma definição melhor dos agrupamentos.

Para o agrupamento de folhas e frutos, em ambos os ambientes, houve uma maior similaridade entre estas partes das plantas desenvolvidas em ambiente enriquecido ou não com CO₂, uma vez que esse agrupamento mostra uma maior proximidade. Enquanto que para as amostras de ramos em comparação com folhas e frutos o agrupamento apresentou-se de forma mais dispersa, mostrando que o agrupamento dos ramos tem pouca similaridade com folhas e frutos, independente do tratamento com CO₂. Em alguns casos, ocorreu uma sobreposição do mesmo tecido da planta em ambas as condições de CO₂, evidenciando uma similaridade maior nos dois ambientes (Figura 5).

As comunidades bacterianas estudadas pela PCA em relação aos tratamentos nos anéis com adição de CO₂ (CO₂+) e CO₂ ambiente (CO₂-) revelaram que nestes dois ambientes há uma grande similaridade (Figura 6), mantendo assim uma ordenação semelhante à plotada para as comunidades de bactérias quando analisadas no gráfico anterior para folhas, frutos e ramos. Porém, ao avaliar os tratamentos, se observa que há uma maior sobreposição das amostras em ambos os tratamentos, o que permite inferir que não há muita distinção nos anéis com CO₂ ambiente e com enriquecimento de CO₂+, embora ainda seja possível observar que algumas amostras do tratamento CO₂ ambiente apresentaram uma dispersão evidenciando uma transição das comunidades de bactérias neste ambiente.

O método molecular T-RFLP vem sendo amplamente utilizado para estudar as comunidades microbianas em vários ambientes (HARTMANN; WIDMER, 2008). No entanto, esse é o primeiro relato de comunidades endofíticas em plantas de café cultivadas em ambiente com enriquecimento de CO₂ simulando as mudanças climáticas. Neste sentido, esta técnica mostrou ser adequada para avaliar como a estrutura da comunidade bacteriana, proveniente de tecidos de café submetidos ao aumento da concentração de CO₂, encontrava-se estruturada. Por esta ser uma técnica reproduzível é eficiente para verificar alterações nas comunidades bacterianas (DUNBAR; TICKNOR; KUSKE, 2000).

Figura 5: Análise de Componente Principal (PCA) realizada por partes da planta coletados em períodos diferentes, onde frutos e ramos foram coletados no período de florada de 2015 e os frutos na época de colheita dos grãos da safra do mesmo ano, no experimento FACE.

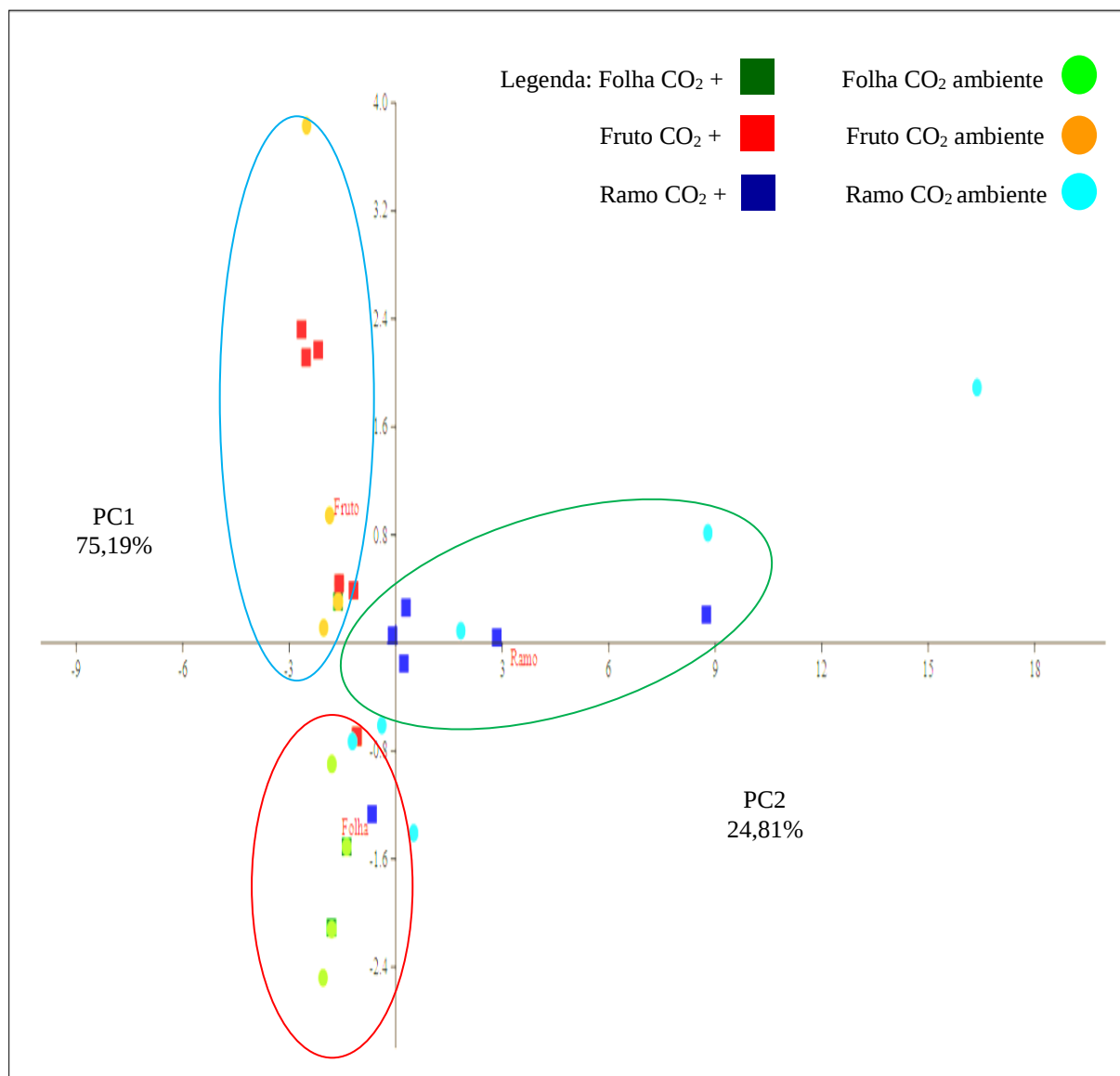
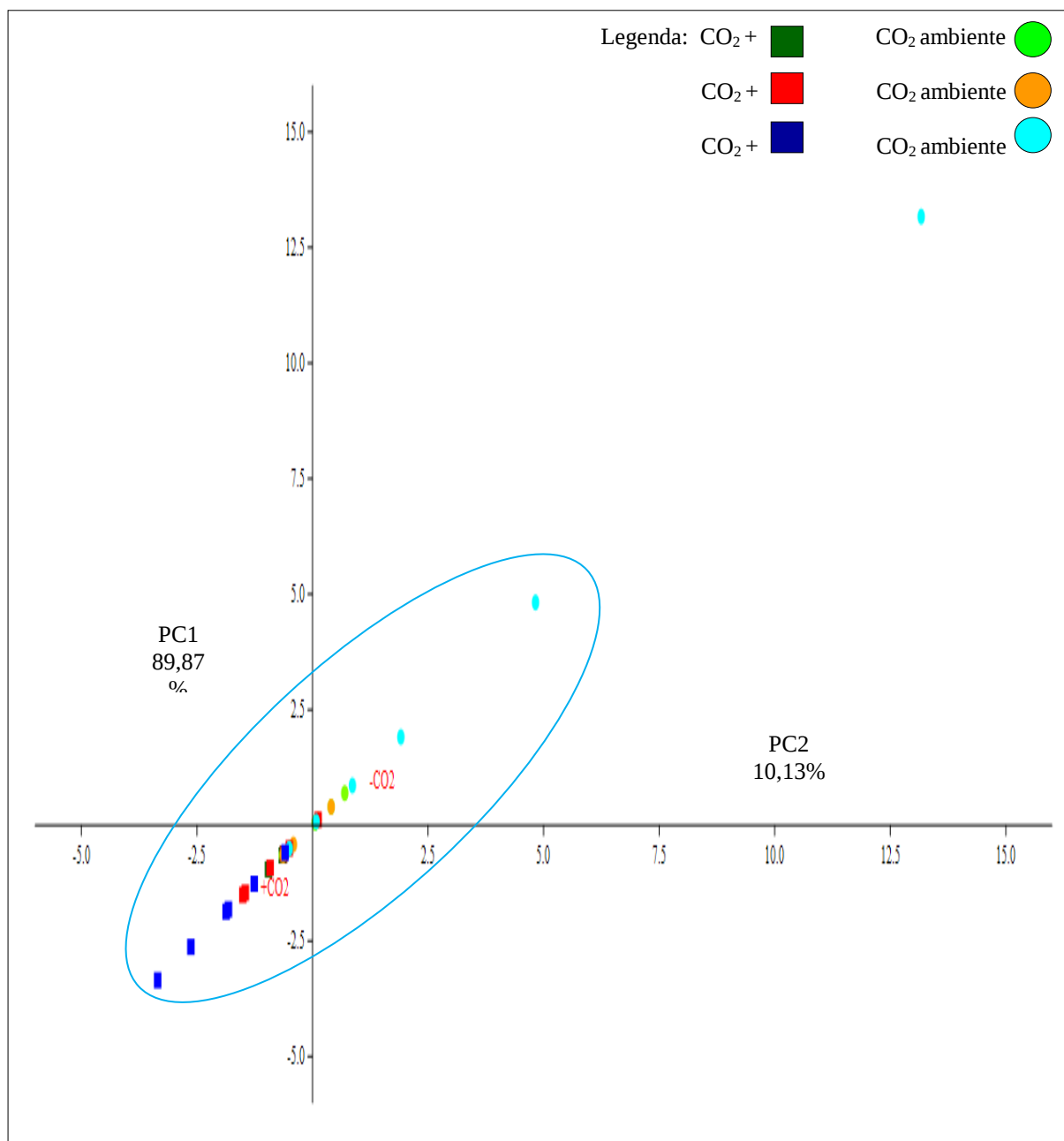


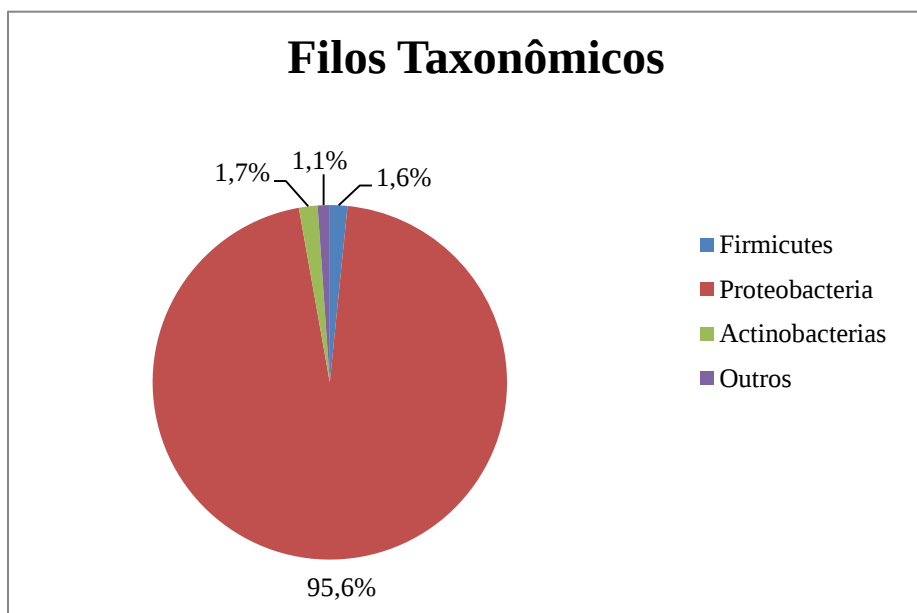
Figura 6: Análise de Componente Principal em ambientes diferentes ($\text{CO}_2 +$ e CO_2 ambiente) realizada em plantas de cafeeiro do experimento tipo FACE.



4.3 Identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO's) associadas a amostras de frutos e ramos de cafeeiro

As análises das unidades taxonômicas operacionais que apresentaram significativa relação com as amostras de frutos e ramos mostraram os principais grupos que estão associados nas amostras de frutos (FR341, FR342, Fr641, Fr642, Fr841, Fr842, Fr1031, Fr1032) e nas amostras de ramos (R121, R122, R241, R242, R921, R922, R1151 e R1152). Como observado na Figura 7, são três, os principais filos taxonômicos identificados em amostras de frutos e ramos de cafeeiro, sendo eles: Actinobactéria, Proteobactéria e Firmicutes. O filo Proteobactéria apresentou uma porcentagem de 99,6% no total das amostras. Essa descrição inclui também os filos Firmicutes com 1,6% e Actinobactérias com 1,7%.

Figura 7: Distribuição total das unidades taxonômicas operacionais obtidas de 16S rDNA de bactérias endofíticas em amostras de frutos e ramos de cafeeiro. Os números em porcentagens correspondem aos filos taxonômicos encontrados.



Na Tabela 4, observa-se que todas as amostras analisadas tiveram uma porcentagem dos mesmos filos de bactérias por amostras. Onde, a maior

predominância está associada às bactérias endofíticas do filo Proteobactérias, tanto em amostras de frutos, quanto de ramos. Esta abundância, pode estar relacionada à espécie da planta colonizada e também às diversas espécies colonizadoras, ou seja, uma grande variedade de bactérias endofíticas pode colonizar simultaneamente as plantas (LODEWYCKX et al., 2002.). O mesocarpo mucilaginoso do fruto do cafeeiro é composto por polissacarídeos, proteínas, minerais e lipídeos, possivelmente, configura um ótimo meio para o crescimento de bactérias. Isso faz com que, os endofíticos que ocorrem naturalmente nos frutos do café exerçam um papel fundamental na produção de metabólitos secundários que vai interferir na qualidade da bebida (DE CASTRO E MARRACCINI, 2006; PETRACO, 2005).

Tabela 4: Distribuição das UTOS em filos, das sequências de bactérias do gene 16S rDNA obtidas da comunidade endofítica de tecidos de café em amostras de frutos e ramos.

Tecidos da Planta	Ano	Amostra	FILOS (%)			
			Firmicutes	Proteobactéria	Actinobactérias	Outros
Frutos	1	Fr 3.4.1	0,00	99,99	0,00	0,01
	2	Fr 3.4.2	1,30	98,60	0,00	0,10
	1	Fr 6.4.1	0,00	99,90	0,00	0,10
	2	Fr 6.4.2	0,00	99,80	0,00	0,20
	1	Fr 8.4.1	0,00	99,90	0,00	0,10
	2	Fr 8.4.2	0,00	99,80	0,00	0,20
	1	Fr 10.3.1	0,00	99,90	0,00	0,10
	2	Fr 10.3.2	0,00	99,70	0,01	0,29
Ramos	1	R 1.2.1	0,00	99,70	0,00	0,30
	2	R 1.2.2	0,00	99,30	0,00	0,30
	1	R 2.4.1	0,00	99,70	0,00	0,70
	2	R 2.4.2	18,50	55,80	16,40	9,30
	1	R 9.2.1	0,00	99,60	0,00	0,40
	2	R 9.2.2	5,80	79,00	9,90	5,30
	1	R 11.5.1	0,00	99,30	0,00	0,70
	2	R 11.5.2	0,00	99,20	0,00	0,80

O filo Proteobactéria é formado por bactérias Gram-negativas, sendo este dividido em três classes Alfabroteobactéria (Rhizobiales), Betaproteobactéria (Burkholderiales) e Gamaproteobactérias (Pseudomonas e Agrobacterias). As alfabroteobactérias têm como representantes bactérias da ordem Rhizobiales, as quais são frequentemente encontradas como endofíticas, sendo oxidadores, capazes de formar biofilmes, tem resistência a metais pesados e outros estresses, e promovem o crescimento vegetal por meio da síntese de hormônios (IVANOVA et al., 2001). As Burkholderias são representantes das betaproteobactérias e tipicamente endofíticas que promovem diversos benefícios às plantas, tais como a degradação de poluentes orgânicos, resistência ao estresse hídrico e promoção de crescimento e proteção contra doenças fúngicas (ANDREOLLI et al., 2013; NAVEED et al., 2014; COMPANT et al., 2005; FISHAL et al 2010). As gammaproteobactérias têm como representantes as *Pseudomonas*, sendo estas encontradas em ambientes como o solo, as plantas e a água. Bactérias desse gênero foram identificadas como endófitos em diversos estudos (ANDREOTE et al., 2009; ASSUMPÇÃO et al., 2009).

O filo Firmicutes é formado por bactérias Gram positivas, e tem como principais representantes *Bacillus*, *Clostridium* e *Mollicutes*. Os membros desse filo destacam-se por serem considerados um agente favorável e seguro ao controle biológico de pragas, além de serem altamente específicos e não apresentarem atividade toxica ao homem (PANG et al., 1992). Um de seus principais representantes são os *Bacillus*. Essas bactérias tem a capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção hormonal, defesa contra fitopatógenos e estresses abióticos (TIMMUSK et al., 1999).

Já as Actinobactérias, que também são Gram positivas, são representadas por *Streptomyces* e *Mycobacterias*, são tidas como endofíticas por ser uma das importantes fontes de metabólitos secundários bioativos, como os antibióticos. Geralmente, as actinobactérias são encontradas em solos e tem se revelado nestes ambientes como microrganismos endofíticos. Os *Streptomyces* são representantes desse filo, eles desempenham funções importantes em diferentes ecossistemas, principalmente no solo, na rizosfera e nos tecidos vegetais (KIESER et al., 2000). Assim, estes endófitos, estimulam o crescimento do vegetal, promovem a fixação de

nitrogênio, induzem resistência sistêmica e agem no biocontrole de fitopatógenos entre outros (COMPANT et al., 2005; BAILEY et al., 2006).

Vega et al. (2005) isolaram bactérias endofíticas de raízes, ramos e folhas de plantas de café com uma porcentagem de 68% dos representantes. Nos frutos, a porcentagem foi de aproximadamente 44%, sendo os principais gêneros de bactérias identificadas *Bacillus*, *Burkholderia*, *Escherichia*, *Clavibacter*, *Pantoea*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e outros. Já, Cordero (2008) relatou a diversidade de bactérias endofíticas em frutos de cafeeiro desenvolvidos em altas altitudes e identificou Actinobactéria, Proteobactéria e Firmicutes as quais apresentaram uma relação positiva com a altitude. Os resultados observados nesse estudo são, portanto, semelhantes aos observados por Vega et al. (2005) e Cordero (2008).

4.4 Identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) associadas aos tecidos da planta de café

A análise realizada por parte da planta mostra um predomínio maior de bactérias endofíticas encontradas nos ramos, como pode ser observado na Tabela 5. O tecido da planta apresentou uma porcentagem de UTO's de 95,60% do filo Proteobactéria. Outros filios em menor abundância também foram identificados, como os Firmicutes com 1,5% e Actinobactérias com 1,6% das UTO's encontradas.

Nos tecidos dos frutos, foram identificadas bactérias do filo Proteobacteria representando 99,70% das OTUS, sendo que para os filios Firmicutes e Actinobactérias, não foram encontradas UTO's neste tecido da planta.

As plantas possuem amplo nicho para bactérias endofíticas. Com isto, estes microrganismos têm sido encontrados em tecidos de diversas espécies de plantas. Elas colonizam os tecidos de modo ativo, local e sistêmico, ou ainda em estado latente. De acordo com Lodewyckx et al. (2002), a interação bactéria-planta ocorre em todas as espécies de vegetais superiores. De modo geral, as bactérias endofíticas são oriundas da comunidade rizosférica e filosférica e também de infestações originárias dos tecidos de propagação vegetal e também das sementes (HALLMANN et al., 1997).

Tabela 5: Proporção de grupos taxonômicos representados em filos de bactérias endofíticas identificadas em frutos e ramos de plantas de café desenvolvidas em concentrações de CO₂ ambiente e aumentado.

FILO (%)				
Tecidos	Firmicute	Proteobactéria	Actinobactéria	Outros
Frutos	0,20	99,70	0,00	0,10
Ramos	1,50	95,60	1,60	1,30

As bactérias que não são transmitidas via sementes penetram na planta pelas raízes. Entretanto, também as partes aéreas das plantas são porta de entrada destes microrganismos (KOBAYASHI e PALUMBO, 2000). Possivelmente, a maior predominância de bactérias endofíticas encontradas nos ramos do que nos frutos se deve a estes fatos, pois, no interior dos vegetais, as bactérias podem ou não permanecer localizadas no ponto de entrada, ou então, serem dispersadas de modo sistêmico na planta, podendo habitar ativamente os vasos condutores e o espaço apoplástico (ZINNIEL et al., 2002; HALLMANN et al., 1997).

Alguns fatores importantes podem estar relacionados a menor abundância de bactérias endofíticas nos tecidos dos frutos de cafeeiro, tais como: a distribuição do endófito nas sementes, pois, a sua distribuição é aleatória, isso faz com que a quantidade por grama de sementes varie de acordo com a espécie vegetal, a anatomia e a fisiologia da semente (CANKAR et al., 2005). Outro fator relevante é quanto a maturação da semente, uma vez que, a diversidade de bactérias endofíticas antes da maturação da semente é bem maior do que depois da maturação da semente. No entanto, os microrganismos endofíticos que apresentam habilidade de entrar em estado latente permanecem na semente durante a maturação, já os demais, têm a tendência de migrar para outros locais na planta (CANKAR et al., 2005). O tempo de dormência e/ou armazenagem das sementes, também é mais um fator que pode ocasionar uma diminuição na quantidade de bactérias endofíticas, sendo assim proporcional ao tempo de armazenamento das mesmas. Dessa forma, estes fatores podem ter contribuído para a diminuição da diversidade de bactérias endofíticas nos frutos de café (CANKAR et al., 2005).

4.5 Identificação de Unidades Taxonômicas Operacionais associadas ao cafeeiro submetido a concentrações de CO₂ e análise de rarefação

As amostras de DNA do material vegetal foram oriundas dos seguintes anéis: para frutos, anéis 3 e 6 (CO₂ ambiente) e 8 e 10 (CO₂+); para os ramos, as amostras foram provenientes dos anéis 2 e 9 (CO₂ ambiente) e 1 e 11 (CO₂+). Com isto, a análise das UTO's revelou que houve maior abundância de UTO's nos anéis com CO₂ ambiente, onde na Tabela 6, pode ser observado que os anéis com CO₂ ambiente (tratamento negativo) apresentaram grande porcentagem de UTO's, onde os microrganismos identificados do domínio bactéria pertencem ao filo Proteobactéria (96,00%). Além destes, os filos bacterianos Firmicute (1,60%) e Actinobactéria (1,50%), foram identificados colonizando plantas de cafeeiro desenvolvidas em CO₂ ambiente.

Nos anéis (1, 8, 10 e 11), com incremento de CO₂ (tratamento positivo), não houve uma grande abundância de UTO's. Pois, essa variedade está em menor número quando comparada ao tratamento negativo (CO₂ ambiente). Assim, nas amostras dos anéis com CO₂+, foi possível identificar que o filo Proteobactéria representa 99,60%, das UTO's. Já os filos Firmicute e Actinobactéria não apresentaram nenhuma UTO nos anéis que receberam tratamento com CO₂.

A abundância observada nos tecidos de café cultivados com incremento de CO₂ foi menor que a comparada ao CO₂ ambiente. Isso provavelmente se deve ao fato de que a elevação do nível de CO₂ atmosférico possa ter interferido na relação planta x microrganismo endofítico, ao mesmo tempo que a elevação do nível CO₂+ possa ter afetado negativamente essa relação da planta hospedeira com seus endofíticos. Com isto, tais alterações no meio ambiente, possivelmente tenham provocado mudanças na composição nutricional e em fatores aleloquímico das plantas.

As concentrações de CO₂+ e CO₂ ambiente nos anos de 2014 e 2015 (anos das coletas de frutos e ramos), obtiveram uma frequência relativa de 22% e 71% para a menor e maior concentrações de CO₂, e 30% e 65%, sendo a menor e maior concentrações de CO₂ no período da coleta de frutos. Enquanto que as menores e maiores concentrações de CO₂ na época das coletas dos ramos foram de 50%, 55% e

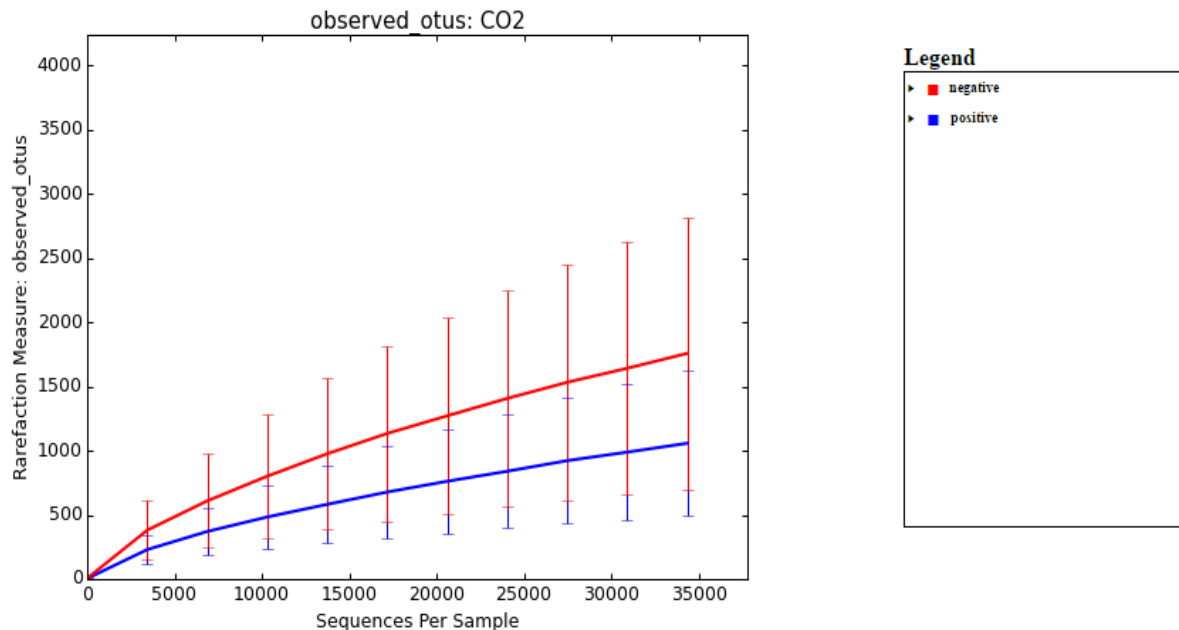
25% e 75%, respectivamente, nos anos de 2014 e 2015, como mostra os gráficos da frequência relativa das concentrações de CO₂ na metodologia. Isto pode ter causado maiores alterações nas comunidades bacterianas submetidas as altas concentrações de CO₂. Precisa ser considerado que estes resultados são referentes a um curto período de tempo, e se diversos ciclos da cultura tivessem sido avaliados certamente os resultados poderiam ser diferentes.

Tabela 6: Proporção taxonômica dos filos de bactérias endofíticas, representando a abundância das comunidades bacterianas presentes em parcelas com CO₂ ambiente, quando comparado as parcelas com enriquecimento de CO₂ (CO₂+).

Tratamentos	FILO (%)			
	Firmicute	Proteobactéria	Actinobactéria	Outros
CO ₂ Ambiente	1,60	96,00	1,50	0,90
CO ₂ +	0,00	99,60	0,00	0,40

Na Figura 8, a representação gráfica que confirma os resultados descritos acima, se observa que a curva de rarefação, ao se analisar a abundância de UTO's nas parcelas com CO₂ ambiente (negativo), foi maior que nas parcelas com enriquecimento de CO₂ (positivo), refletindo assim, a diversidade taxonômica, ou um maior número de sequências de fragmentos de DNA na região 16S existente nas amostras que foram analisadas. A curva de rarefação foi plotada com o número de UTO's observadas na biblioteca em relação ao número de sequências nas amostras.

Figura 8: Curva de rarefação da biblioteca de DNA 16S de bactérias endofíticas em frutos e ramos de cafeeiro cultivado em CO₂ ambiente (400 ppm) e com enriquecimento de em CO₂+ (550 ppm).



Por este ser o primeiro relato que identifica microrganismos endofíticos colonizando tecidos de cafeeiro desenvolvidos em ambientes com incremento de CO₂, não há referências especificamente para a cultura do café. Entretanto, outros relatos têm sido documentados em outros tipos de ambientes, como o solo, por exemplo, e até mesmo para outras culturas. Em seus estudos, Zak et al. (2000) verificaram que a abundância da população microbiana do solo não era alterada significativamente com a elevação de CO₂. Vega et al (2005) coletaram amostras de plantas de café na Colômbia, Havaí e México e, por meio de técnica dependente de cultivo, isolaram bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo que a maioria foi isolada dos frutos, com predominância de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Serratia* e outras. Este foi o primeiro relato de bactérias endofíticas em tecidos do cafeeiro nesses países.

Miguel et al. (2013) isolaram e identificaram de frutos de *C. canephora* bactérias dos filos Proteobactéria, Actinobactéria, Firmicute e Bacteroides. Desta comunidade, identificaram algumas bactérias pertencentes às espécies *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* e *Enterobacter hormaechei*. Também relataram que a diversidade das bactérias foi observada em três estádios de desenvolvimento da planta, mas o maior número foi em frutos verdes, com predomínio de *Bacillus subtilis*. Os grupos de organismos foram semelhantes aos observados no presente estudo.

No sudoeste do estado de Minas Gerais, Oliveira et al. (2013) verificaram a diversidade da microbiota endofítica associada aos frutos de café a fim de compreender a relação com a qualidade da bebida. Para isto, utilizaram técnicas independentes de cultivo, o que possibilitou a identificação da comunidade endofítica constituída por componentes dos domínios Proteobactéria, ea (*Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*) e Firmicutes (*Bacillus*, *Staphylococcus* e *Paenibacillus*). Também neste estudo confirmou grupos semelhantes aos observados para o café Catuaí, desenvolvidos nas duas condições de CO₂.

Mais pesquisas são necessárias para comparar a biodiversidade microbiana presente em frutos e ramos de cafeeiro desenvolvidos em ambientes com aumento das concentrações de CO₂ uma vez que são essenciais nos estudos de ecologia desses microrganismos, para se ter uma descrição mais detalhada da diversidade das comunidades bacterianas que habitam esses ambientes pouco explorados. Com essas informações poderá ser compreendida a transformação e a produção de metabólitos precursores responsáveis pela qualidade da bebida, bem como se poderá interferir na reação das plantas a doenças e pragas em ambiente dos cenários previstos pelo IPCC (2007).

5 CONCLUSÕES

A microbiota endofítica pode ser alterada pela elevação da concentração de CO₂ atmosférico, sendo este o primeiro relato da possível influência do CO₂ em comunidades endofíticas em tecidos de cafeeiro em experimento de campo tipo FACE.

Há uma dissimilaridade na composição das comunidades de bactérias endofíticas presentes em folhas, frutos e ramos de cafeeiros desenvolvidos em altas concentrações de CO₂.

A comunidade de bactérias endofíticas das plantas de cafeeiros desenvolvidos em condições de altas concentrações de CO₂ apresentou uma similaridade com a presente nos cafeeiros desenvolvidos em CO₂ ambiente, quando analisados pela T-RFLP.

Três filos de bactérias de importância para as plantas foram identificados, nas amostras de frutos e ramos de cafeeiro, sendo o de maior destaque Proteobactérias, seguido de Actinobactéria e Firmicutes.

A maior abundância de bactérias endofíticas foi encontrada colonizando os ramos.

A biblioteca de bactérias endofíticas identificadas em frutos e ramos de cafeeiro desenvolvidos no experimento ClimapestFACE mostrou que a abundância dentro das parcelas com CO₂ ambiente é maior que nas parcelas enriquecidas com CO₂.

A análise da curva de rarefação indica que a biblioteca de bactérias endofíticas de frutos e ramos de café foi bem representativa ao refletir uma maior diversidade presente nos anéis com CO₂ ambiente.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLLI, M. et al. Endophytic *Burkholderia* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Chemosphere**, v. 92, p. 688-694, 2013.
- ANDREOTE, F. D. et al. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and the effect on associated bacterial communities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 3396-3406, 2009.
- ANDREOTE, F. D. et al. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 419-426, 2006.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Nota de aplicação: sequenciamento de amplicon, 2011. Disponível em: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf. Acesso em: 15 set. 2016.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- ASSAD, E. D. et al. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p.1057-1064, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em: <http://www.abic.com.br> Acesso em: junho de 2016.
- ASSUMPÇÃO, L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 503-510, 2009.
- AVALLONE, S. et al. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, p. 252-256, 2001.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology** [online]. V. 3, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. DE. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 486, 1998.
- BAILEY, B. A. et al. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Thichoderma* species. **Planta**, v. 244, p. 1449-1464, 2006.

BELL, C. A.; DICKIE, G. A.; HARVEY, W. L. G.; CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 46-53, 1995.

BENNETT, L. T.; KASEL, S.; TIBBITIS, J. Non-parametric multivariate comparisons of soil fungal composition: sensitivity to thresholds and indications of structural redundancy in TRFLP data. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, p. 1601-1611, 2008.

BLACKWOOD, C. B.; PAUL, E. A. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1245-1255, 2003.

CANKAR, K.; KRAIGER, H.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. Bacterial endophytes from seed of norway spruce (*Picea abies* L. Karts). **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 341-345, 2005.

CAPOROSO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat. Meth**, v. 7, p. 335-336, 2010.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil*, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 252-263. 2001.

COAKLEY, S. M.; SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 399-426, 1999.

COMPANT, S. et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 1685-1693, 2005.

COMPANT, S. et al. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanism of action, and future prospect. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4951-4959, 2005.

CONAB. Levantamento de café 2016. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf.2016>. Acesso em 5 set.2016.

CORDERO, F. P. C. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café**. 2008. 89 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CULMAN, S. W.; GAUCH, H. G.; BLACKWOOD, C. B.; THIES, J. E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 55-63, 2008.

DaMATTA, F.M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Physiology**, v. 19, p. 485-510, 2007.

DANOVARO, R.; LUNA, G. M.; DELL'ANNO, A.; PIETRANGELI, B. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5922-5989, 2006.

DAVIS, A. P.; CHESTER, M.; MAURIN, O.; FAY, M. F. Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Ixoroideae): the circumscription and phylogeny of Coffeae based on plastid sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 313-329, 2007.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 465-512, 2006.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 175-199, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2943-2950, 2000.

ETTEMA, T. J.; ANDERSSON, S. G. The alphaproteobacteria: The Darwin finches of the bacterial world. **Biol Lett**, v. 5, p. 429-432, 2009.

FISHAL, E., MEON, S., YUN, W. Induction of tolerance to *Fusarium* Wilt and defense related mechanisms in the plantlets of susceptible berangan banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). **Agricultural Sciences in China**, v. 9, p. 1140-1149, 2010.

GARDNER, J. M.; FELDMAN, A. W.; ZABLOTOWICZ, R. M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus tree. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1335-1342, 1982.

GHINI, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 104, 2005.

GHINI, R., TORRE-NETO, A., DENTZIEN, A.F.M., GUERREIRO-FILHO, O., IOST, R., PATRÍCIO, F.R.A., PRADO, J.S.M., THOMAZIELLO, R.A., BETTIOL, W. DAMATTA, F.M. 2015. Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. **Climatic Change** **132**: 307-320. DOI 10.1007/s105884-015-1422-2.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 98-107, 2008.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de Importantes Culturas no Brasil**. 1ª Ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 356, 2011.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. (Eds.). **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. New York: Springer, cap. 1, p. 1-30, 2008.

GRÜTER, D.; SCHMID, B.; BRANDL, H. Influence of plant diversity and elevated atmospheric carbon dioxide levels on belowground bacterial diversity. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 68-75, 2006.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARTMANN, M.; WIDMER, F. Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 63, p.249-260, 2008.

HEUER, .; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: J. D. van Elsas, E. M. H. Wellington, and J. T. Trevors (ed.), **Modern Soil Microbiology**. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 353-373, 1997.

HEUER, H. et al. Analysis of Actinomycetes communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and ge-electrophoretic separation in Denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 08, p. 3233-3241, 1997.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 101-123, 2006.

HOLLIS, J. P. Bacterial in healthy potato tissue. **Phytopathology**, v. 41, p. 350-366, 1951.

HORNER-DEVINE, M. C.; CARNEY, K. M.; BOHANNAN, B. J.M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. **Proceedings of the Royal Society**, v. 271, p. 113-112, 2004.

IPCC. **Climate Change 2007: the physical science basis**. Cambridge, Cambridge University Press, 2007, 966 p. (IPCC Assessment Report, 4).

IPCC. **Climate Change 2013: the physical science basis** (eds Stocker, T. F. et al.) (Cambridge University. Press, 2013).

IVANOVA, E. G.; DORONINA, N. V.; TROTSSENKO, Y. A. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. **Microbiology**, v. 70, p. 392-397, 2001.

JIMÉNEZ-SALGADO, T. et al. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

KIESER, T. Practical Streptomyces genetics. **John Innes Centre**, Norwich. 218 p. 2000.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C.W.; White, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. Washington: Marcel Dekker, p. 199-233, 2000.

KRUG, H. P. Café duros III, Relação entre porcentagem de microrganismos e qualidade de café. **Revista do Instituto do café**, v. 27, p. 1827-1831, 1941.

LACAVA, P T.; ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J .L. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: **Agrolivros**, v. 1, p. 211-232, 2008.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Physiology**, v. 18, p. 229-242, 2006.

LIU, W.; MARSH, T. L.; CHENG, H. FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516-4522, 1997.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606. 2002.

MACHADO, M. A. de M.; MARENGO, J. A. Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a agricultura brasileira. **News Letter GOF-UK-CPTEC**, São José dos Campos, v. 1, n. 2, p. 4-6, 2006.

MADHAIYAN, M. et al. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar CO-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin Acad. Sin**, v. 45, p. 315-324, 2004.

MANNING, W. J.; TIEDEMANN, A. V. Climate change potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-b (UV-B) radiation on plant diseases. **Environmental Pollution**, v. 88, p. 219-245, 1995.

MANO, H.; MORISAKI, H. Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes Environment**, v. 23, p. 109-117, 2008.

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de citrus spp e interação com *Xylella fastidiosa***. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo-Instituto Butantan-Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, SP, p.91, 2002.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. Genomic and. **Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARENGO, J. A. **Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade**: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília: MMA, 212p. 2006.

MARENGO, J. A.; AMBRIZZI, T.; ROCHA, R. P.; ALVES, L. M. et al. Future change of climate in South America in the late XXI century: Intercomparison of scenarios from three regional climate models. **Climate Dynamics**, v. 35, p. 1073-1097, 2010.

MARSH, T. L.; SAXMAN, P.; COLE, J. TIEDJE, J. M. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3616-3620, 2000.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): and emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 323-327, 1999.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P. The nodule microbiome: N₂-fixing Rhizobia do not live alone. **Annual Review Phytobiomes Journal**, p. 1-13, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 291-296, 2006.

MATIELLO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo. Globo, (Coleção do agricultor: Grãos), p. 320, 1991.

McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 895-901, 1995.

MEIJER, G.; LEUCHTMANN, A. The effects of genetic and environmental factors on disease expression (stroma formation) and plant growth in *Brachypodium sylvaticum* infected by *Epichloë sylvatica*. **Oikos**, v. 91, n. 3, p. 446-458, 2000.

MESEL, I. et al. Top-down impact of bacteriovorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 733-744, 2004.

MIGUEL, P. S. B. et al. Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 59, p. 221-230, 2013.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, p. 808-811, 1990.

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 694-698, 1976.

NAVEED, M. et al. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 30-39, 2014.

NEWMAN, D. K.; BANFIELD, J. F. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, v. 296, p. 1071-1077, 2002.

OLIVEIRA, M.N.V. et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. **Can. J. Microbiol**, v. 59, p. 221-230, 2013.

PANG, Y., FRUTOS, R., FEDERICI, B. A. Synthesis and toxicity of full length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells a baculovirus vector. **Journal general Virology**, v. 73, p. 89-101, 1992.

PETRACO, M. Our everyday cup of coffee: The chemistry behind its magic. **Journal of Chemical Education**, v. 82, p. 1161-1167, 2005.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Editora UFLA – Lavras, p. 304, 2003.

POZZA, E. A.; ALVES, M. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. In GHINI, R.; HAMADA, E. (Ed) **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa/SCT, p. 215-233, 2008.

PRADO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochatoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, p. 45-49, 2004.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, n, 5, p. 384-392, 2007.

QUIZA, L.; St-ARNAUD, M.; YERGEAU, E. Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. **Front. Plant Science**, v. 6, p. 507, 2015.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. **Fisiologia do cafeeiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.11, n. 126, p.26-40, 1985.

SAIKKONEN, K; FAET, S. H.; HELANDER, M; SULLIVAN, T. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAKIYAMA, N. S.; MARTINEZ, H. E. P.; TOMAZ, M. A.; BORÉM, A. **Café arábica: do plantio à colheita**. Ed. UFV, Viçosa, MG, 316 p, 2015.

SALERMO, M. I.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Effects on growth and comparison of root tissue colonization patterns of *Eucalyptus viminalis* by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **New Phytopathology**, v. 146, p. 317-324, 2000.

SANTANA, R. S. M. **Caracterização da comunidade bacteriana de *Baccharis dracunculifolia*, com e sem galha causada por *Baccharopelma dracunculifoliae***. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais, 77 f, 2013.

SANTOS, M. S. **Doenças da Alfafa (*Medicago sativa*) e Composição Bromatológica em Elevada Concentração de CO₂ do Ar**. Tese (Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Proteção de Plantas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP, p. 65, 2015.

SANTOS, T. M. A. **Diversidade e sucessão de microrganismos durante a seca natural do café**. Monografia (Curso de Ciências Biológicas-Microbiologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 58 f, 2006.

SANTOS, T. M. A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica*)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 127 f, 2008.

SCHMIDT, C. A. P.; MIGLIORANZA, E.; PRUDENCIO, S. H. Interação da torra e moagem do café na preferência do consumidor do oeste paranaense. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1111-1117, 2008.

- SHARMA, R.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Characterization of plant growth promoting *Bacillus* strains and their potential as crop protectants against *Phytophthora capsici* in tomato. **Biological Agriculture e Horticulture**, v. 31, n. 4, p. 230-244, 2015.
- SHEBATA, H. R.; LYONS, E. M.; JORDAN, K. S.; RAIZADA, M. N. Bacterial endophytes from wild and ancient maize are able to suppress the fungal pathogen *Sclerotinia homoeocarpa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 756-759, 2016.
- SHIMIZU, M. et al. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolated from rhododendron and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 66, p. 360-366, 2000.
- SICILIANO, S. D. et al. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 844-851, 1998.
- SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 251-260, 2000.
- SILVA, E. A. et al. The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 229-238, 2005.
- SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the under explored "rare biosphere". **PNAS**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12225-12120, 2006.
- SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 2-26, 1997.
- SPRENT, J. J.; JAMES, E. K. N-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FERDRIK, M DEL GALLO.; J. VANDERLEYDEN.; M, DE ZAMAROCZY. Azospirillum VII and related microorganisms. Berlin: **Springer-Verlag**, n, 37, p. 15-29, 1995.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infects**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbial Mol. Rev.**, v. 67, p. 491-502, 2003.
- THIES, J. E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorfisms. **Soil Science Society of America Journal**, madson, v. 71, p. 579-591, 2007.

TIEDJE, J. et al. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, v. 13, p. 109-122, 1999.

TIMMUSK, S., NICANDERA, B., GRANHALLB, U., TILLBERGA, E. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. ***Soil Biology and Biochemistry***, v. 31, p. 1847-1852, 1999.

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

VAAST, P. et al. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v. 86, p. 197-204, 2005.

VASCONCELOS, R. L. F. et al. Microbiological indicators of soil quality in a riparian forest recovery gradient. *Ecological Engineering*, v. 53, p. 313-320, 2013.

VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. ***Journal of Basic Microbiology***, v. 45, p. 317-380, 2005.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of palnt growth promoting and colonication ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. ***Journal Biotechnology***, v. 91, p. 127-141, 2001.

WHITELEY, A. S. et al. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. ***Journal of Microbiological Methods***, v. 91, p. 80-88, 2012.

WILSON, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. ***Oikos***, v. 2, n. 73, p. 274-276, 1995.

WOLSING, M.; PRIEMÉ, A. Observation of high seeasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. ***FEMS Mcrobiology Ecology***. Amsterdam, v. 48, p. 261-271, 2004.

ZAK, D. R. et al. Atmospheric CO₂, soil-N availability, and allocation of biomass and nitrogen by *Populus tremuloides*. ***Ecol Appl***, v. 10, p. 34-36. 2000.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 68, p. 2198-2208. 2002.