

MARCELO NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA

**ARCHAEA COMO COMPONENTES DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE
FRUTOS DO CAFEIEIRO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

MARCELO NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA

**ARCHAEA COMO COMPONENTES DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE
FRUTOS DO CAFEIEIRO**

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

APROVADA: 13 de julho de 2009.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Co-orientador)

Prof. Marcos Rogério Tótola

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

*A Deus.
Aos meus amados pais, Paulo e Rita.
À minha avó Maria.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fez passar por tantas provações e ao mesmo tempo esteve ao meu lado, dando forças para seguir em frente.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo acolhimento e pelas oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao meu pai, Paulo, presente em cada momento da minha vida, e à minha mãe Rita, pelo carinho, apoio e incentivo.

À minha avó Maria, uma pessoa marcante em minha vida e que tanto me ajudou. Um grande exemplo de luta.

Aos meus irmãos, Denise, Paulo e Renato, por sempre acreditarem em mim.

À minha namorada Livia, pelo amor, pela cumplicidade e pelo companheirismo. A você devo grande parte das minhas conquistas.

Aos meus tios Carlos, Marilene, Antônio e Linda, pela união e pela ajuda em todos os momentos.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela confiança e por tantos ensinamentos durante os cinco anos de convivência.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela dedicação e pelos conselhos.

Aos professores Maurício Dutra Costa e Marcos Rogério Tótola, pelas contribuições para este trabalho

Ao Thiago Santos, pela amizade e por me iniciar nos estudos com café.

Ao Helson Mário, amigo e companheiro, com quem muito aprendi.

À Alessandra, pela amizade, pelas parcerias e pela ajuda nas análises.

À Alexandra, amiga, atenciosa e preocupada.

A todos os amigos que passaram ou estão na MIND, especialmente Ana Paula, José Carlos, Margareth, Eliana, Andressa e Gabriel. Vocês me ajudaram muito em todos os momentos no laboratório e tornaram a rotina mais agradável.

A todos os amigos que passaram pela minha república durante estes dois anos de mestrado.

A todos da BIO-2003, com os quais convivi durante importantes anos da minha vida e construí amizades verdadeiras.

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

Aos funcionários administrativos e técnicos do Departamento, pela amizade e pela responsabilidade na execução de suas atividades.

À Fundação Oswaldo Cruz, pelas linhagens de Archaea cedidas.

À Doutora Maysa Beatriz Mandetta Clementino, pela enorme atenção dedicada.

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

BIOGRAFIA

MARCELO NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA, filho de Paulo Valério de Oliveira e Rita de Cássia Nagem Oliveira, nasceu na cidade de Manhumirim – MG, no dia 06 de novembro de 1984.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa – MG, e, em agosto de 2007, graduou-se em Ciências Biológicas. Neste mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da referida Instituição.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Amostragem e extração de DNA.....	14
3.2. Análise da diversidade de Archaea	16
3.2.1. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	16
3.2.2. Construção de bibliotecas de rDNA 16S.....	17
3.3. Análises filogenéticas	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Extração de DNA metagenômico de frutos de café.....	19
4.2. Avaliação dos <i>primers</i> usados no estudo	20
4.2.1 Análise de especificidade	20
4.2.2 Avaliação de diferentes regiões hipervariáveis do rDNA 16S de Archaea utilizando <i>primers</i> específicos	22
4.3. Diversidade de Archaea endofíticas em frutos de café.....	24
4.3.1. Análise da diversidade por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	24
4.3.2. Análise da diversidade de Archaea endofíticas de frutos de café pela construção e sequenciamento de bibliotecas de rDNA 16S.....	28
4.3.3. Filogenia de Archaea presentes em frutos de café	35
4.4. Diversidade e sucessão de Archaea durante o processo de seca natural dos grãos	42
5. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNAs 26S de fungos, e dos rDNAs 16S de bactérias e arqueas. (A) Par de *primers* Arch344fGC/927r, (B) Par de *primers* Arch344fGC/517r. 1: *Penicillium griseoroseum* CCT6421, 2: *Candida albicans* ATCC 102031, 3: *Bacillus subtilis* ATCC 23858, 4: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605, M: Lambda DNA/*HindIII*, n: Branco da reação de PCR.21
- Figura 2: Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de Archaea presentes em frutos de *Coffea arabica* (L.) e no solo, obtido após amplificação utilizando o par de *primers* 344GC/927r (A) e o par de *primers* 344GC/517r (B). 1: Amostra de café 40B, 2: Solo, HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605.23
- Figura 3: Comparação da Riqueza da comunidade de Archaea associada a frutos de café cereja e comunidades presentes no solo, utilizando os pares de *primers* 344GCf/927r (R1) e 344GC/517r (R2).....23
- Figura 4: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de comunidades de Archaea endofíticas presentes em frutos cereja de quatro cultivares de *Coffea arabica* (L.) amostrados em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais. 1: Amostra 625, 2: Amostra 628, 3: Amostra 629, 4: Amostra 630, 5: Amostra 631, 6: Amostra 632, 7: Amostra 643, 8: Amostra 644, 9: Amostra 646, HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605. (CV), Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Vermelho (BV) e Bourbon Amarelo (BA).....25

- Figura 5: Comparação estatística dos perfis de DGGE baseados em fragmentos dos rDNAs 16S de comunidades de Archaea endofíticas presentes em frutos cereja de quatro cultivares de *Coffea arabica* (L.) amostrados em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais, utilizando o programa Bionumerics. Dados de amostragem são indicados. Escala de 40 a 100 indica o nível de similaridade. Os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação.....27
- Figura 6: Relação filogenética, inferida pelo método da Máxima Parcimônia, dos clones sequenciados da biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 40B, cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 936 m. Os valores nos pontos de ramificações representam o valor de *bootstrap* para 1000 replicações. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.....31
- Figura 7: Relação filogenética, inferida pelo método de *Neighbour-Joining*, dos clones sequenciados da biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 628, cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m. Os valores nos pontos de ramificações representam o valor de *bootstrap* para 1000 replicações. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.....32
- Figura 8: Relação filogenética, inferida pelo método da Máxima Parcimônia, dos clones sequenciados da biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 646, cultivar Catuaí Vermelho em altitude de 1189 m. Os valores nos pontos de ramificações representam o valor de *bootstrap* para 1000 replicações. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.....33
- Figura 9: Curvas de rarefação representando a diversidade de sequências esperada de clones de rDNA 16S para cada biblioteca construída. Biblioteca 40B: Catucaí Vermelho – 946 m; Biblioteca 628: Bourbon Amarelo – 687 m; Biblioteca 646: Catuaí Vermelho – 1189 m34
- Figura 10: Reconstrução filogenética, inferida pelo método da Máxima Parcimônia, das sequências identificadas na biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 40B, cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 936 m. As sequências

encontradas neste estudo estão em negrito. Os números de acesso de cada sequência extraída do NCBI são mostrados entre parênteses. Valores de *bootstrap* maiores que 50 são mostrados nos nódulos de ramificação. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.37

Figura 11: Reconstrução filogenética, inferida pelo método de *Neighbour-Joining*, das sequências identificadas nas bibliotecas de rDNAs 16S de Archaea presentes em frutos de café cerejeira (*Coffea arabica* L.), amostras 628, cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m, e 646, cultivar Catuaí Vermelho e altitude de 1189 m. As sequências encontradas neste estudo estão em negrito. Os números de acesso de cada sequência extraída do NCBI são mostrados entre parênteses. Valores de *bootstrap* maiores que 50 são mostrados nos nódulos de ramificação. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.39

Figura 12: Perfis eletroforéticos de DDGE baseado em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade de Archaea associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido com cimento. HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605.....44

Figura 13: Riqueza das comunidades de Archaea endofíticas associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca em terreiro revestido com cimento.....45

Figura 14: Comparação estatística dos perfis de DGGE baseados em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade de Archaea endofítica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido com cimento, utilizando o programa Bionumerics. Escala de 40 a 100 indica o nível de similaridade. Os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação.45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Relação e áreas de coleta das 10 amostras de frutos de café cereja em lavouras com cultivares de *Coffea arabica* (L.), localizadas em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais.15
- Tabela 2: Linhagens de micro-organismos de referência usadas neste trabalho21
- Tabela 3: Matriz de similaridade calculada pelo programa Bionumerics a partir da análise das imagens dos perfis de DGGE de fragmentos do rDNA 16S de comunidades de Archaea endofíticas presentes em frutos cereja de quatro cultivares de *Coffea arabica*, amostrados em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais.27
- Tabela 4: Similaridade entre as sequências de rDNA 16S de endofíticos de frutos de café e sequências disponíveis no NCBI¹30
- Tabela 5: Matriz de similaridade calculada pelo programa Bionumerics a partir da análise das imagens dos perfis de DDGE baseados em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade de Archaea associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despolpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido com cimento.....46

RESUMO

OLIVEIRA, Marcelo Nagem Valério de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Archaea como componentes da microbiota endofítica em frutos do cafeeiro.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Maurício Dutra Costa.

Este é o primeiro estudo de diversidade genética da comunidade de Archaea associada a frutos de café (*Coffea arabica* L.). Ele foi realizado em amostras de frutos no estádio cereja das cultivares Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho e Catuaí Vermelho, em diferentes altitudes. A diversidade de arqueas presentes durante a secagem natural de grãos despolpados em terreiro revestido com cimento também foi estudada. A adição de proteases durante a etapa de lise celular para extração de DNA metagenômico de frutos de café propiciou melhor recuperação de DNA de Archaea. A maior resolução da diversidade na comparação de diferentes regiões hipervariáveis do rDNA 16S por DGGE foi obtida quando se utilizou a região V3 para a amostra da cultivar Catuaí Vermelho em altitude de 936m. A análise da comunidade endofítica de Archaea em quatro cultivares de *C. arabica* revelou um variado perfil genotípico entre as amostras. Três amostras que apresentaram perfis de DGGE distintos entre si foram escolhidas para construção de bibliotecas de rDNAs 16S. O sequenciamento de 63 clones revelou a existência de 12 UTOs e a prevalência de sequências relacionadas ao filo Euryarchaeota, principalmente de arqueas halofílicas dos gêneros *Halobacterium*, *Halococcus* e *Haloferax*. Ainda no filo Euryarchaeota, foram identificadas sequências com alta identidade com *Methanobrevibacter*, com a hipertermófila *Thermoplasma* e com sequências relacionadas à arqueas não cultiváveis de ambiente marinho. Das quatro sequências pertencentes ao filo Crenarchaeota, três agruparam filogeneticamente com sequências de arqueas não cultiváveis do solo, e uma com sequências de

ambiente marinho. A análise das curvas de rarefação e o cálculo das coberturas mostraram que as bibliotecas construídas foram grandes o suficiente para cobrir a maior parte da diversidade de Archaea presentes em frutos de café cereja. No estudo da diversidade de Archaea durante a seca natural observou-se um aumento do número de UTOs a partir do sétimo dia, permanecendo até o último dia do processo. A análise de agrupamento dos perfis distinguiu as populações presentes nos dias finais de secagem. A ausência de estudos fisiológicos de arqueas não cultiváveis, especialmente de ambientes mesófilos, limita o conhecimento do metabolismo destes micro-organismos e a determinação do papel das endofíticas dos frutos de café. Contudo, estudos metagenômicos da comunidade microbiana associada a frutos de café ajudarão a identificar genes de Archaea e a estabelecer relações entre a presença de determinados micro-organismos e de compostos precursores daqueles que compõe o aroma e sabor na qualidade final da bebida.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Marcelo Nagem Valério de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Archaea as components of endophytic microbiote of coffee tree**. Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Maurício Dutra Costa.

This is the first study of genetic diversity of the Archaea community associated to coffee fruits (*Coffea arabica* L.). It was performed in cherry coffee fruits of cultivars Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho and Catucaí Vermelho in different altitudes. The archaeal diversity during natural drying of depulped grains in cement covered yard was also studied. The addition of proteases during the coffee fruits metagenomic DNA extraction cell lysis step provided better recovery of DNA from Archaea. Comparing different hypervariable regions of 16S rDNA by DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), the highest diversity resolution was obtained with the V3 region, for the cultivar Catucaí Vermelho at an altitude of 936m. The Archaea endophytic community analysis in four *C. arabica* cultivars revealed varied genotypic profiles among the samples. Three samples that showed distinct DGGE profiles were chosen for 16S rDNAs libraries construction. Sequencing of 63 clones revealed 12 OTUs and the prevalence of sequences related to Euryarchaeota phylum, mainly the halophylic genera *Halobacterium*, *Halococcus*, and *Haloferax*. Sequences with high identity with *Methanobrevibacter*, with the thermophilic *Thermoplasma*, and sequences related to uncultivated Archaea from marine environment were also found in the Euryarchaeota phylum. Of the four sequences belonging to the Crenarchaeota phylum, three phylogenetically clustered with uncultivated archaea from soil, and one with sequences from a marine environment. Rarefaction curve analysis and the estimated Coberture pointed out that the libraries constructed were

large enough to cover the most of Archaea diversity in cherry coffee. The archaeal diversity study during natural drying revealed higher increase in OTUs number beginning at the seventh day up to the last day. Cluster analysis of DGGE fingerprints distinguished the population of the first days of drying from those in the last ones. The absence of physiological studies of uncultivable Archaea, especially in mesophilic environments, limits the knowledge of metabolism of these microorganisms and the determination of endophytes role in coffee fruits. Although, metagenomic studies of microbial community associated to coffee fruits will help to identify archaeal genes and establish relations among the presence of certain microorganisms and precursors of those compounds that make up the aroma and the flavor in the final quality of the beverage.

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do café no Brasil movimentava cerca de 4,8 bilhões de dólares apenas com as exportações e emprega, aproximadamente, oito milhões de famílias. Esses dados refletem a importância socioeconômica do café no país, que é o maior produtor mundial e o segundo maior mercado consumidor de café, com expectativas de alcançar a liderança. O aumento do consumo no mercado interno nos últimos anos resulta de fatores como a melhoria na condição econômica do brasileiro, o reconhecimento dos benefícios do café para saúde, a maior preocupação com a produção de café com qualidade de bebida, e, também, a divulgação da bebida por meio de campanhas publicitárias e abertura de cafeterias especializadas. A crescente exigência dos consumidores por cafés de qualidade superior tem incentivado a pesquisa nesse campo.

A expressão da qualidade final da bebida é dependente de uma conjugação de fatores, como espécie botânica, variedade da planta, ambiente, manejo, processamento dos grãos, entre outros. O café é a bebida com maior número de compostos voláteis, os principais responsáveis pelo aroma da bebida. Esses compostos derivam de precursores e não estão presentes no fruto maduro, mas são formados durante a etapa de torrefação por meio de diferentes reações entre seus constituintes. A presença de micro-organismos endofíticos no fruto de café durante os estádios de desenvolvimento já foi demonstrada, mas o papel desempenhado por estes ainda não foi esclarecido. A diversidade de interações que micro-organismos são capazes de estabelecer com plantas, além de sua plasticidade metabólica, é fator que contribui para uma possível influência dos endofíticos na composição final do fruto, com reflexos positivos ou negativos sobre a qualidade da bebida. Trabalhos anteriores visaram a identificar e comparar a

microbiota presente no fruto de café, endofítica e epifítica, sem contudo investigarem a presença de organismos do domínio Archaea nesta microbiota.

A importância ecológica de espécies de Archaea foi por muito tempo minimizada por serem primariamente conhecidas como de organismos extremófilos. Esta visão do domínio está sendo reavaliada desde a descrição de Archaea não cultiváveis no plâncton marinho, onde representam até 2% do total de rDNA extraído das amostras. Inúmeras sequências de Archaea têm sido detectadas em diferentes amostras ambientais, e, por essa ampla distribuição, infere-se que desempenham importante papel no ciclo global de energia. As encontradas em associação com plantas na região da rizosfera e, também, nos tecidos internos da raiz, respondem a variações ambientais e reforçam a hipótese de que são de populações ativas de importância ecológica.

O presente trabalho propõe avaliar a diversidade genética da comunidade de Archaea presente em frutos de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) amostrados em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte, Minas Gerais, além do estudo da diversidade e sucessão de Archaea durante o processo de seca natural dos grãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cafeicultura no Brasil é uma das principais atividades da moderna agricultura e se caracteriza por usar praticamente duas das aproximadamente 100 espécies que compõe o gênero *Coffea*, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (VIEIRA et al., 2006; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2008). A história registra que essa atividade teve início por volta de 1727, quando as primeiras mudas de café foram trazidas da Guiana Francesa. Desde então, tornou-se uma das mais importantes culturas agrícolas do país, com seu auge no final do século XIX, quando a cafeicultura era responsável pela geração da maior parte das divisas do país (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ – ABIC, 2009).

No Brasil, que possui uma área cultivada com café estimada em 2,35 milhões de hectares, *C. arabica* representa 76,19% da produção, tendo o estado de Minas Gerais como o principal produtor. A participação de *C. canephora* na produção nacional é de 23,81%, com a maior parte da produção no estado do Espírito Santo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2008). A primeira estimativa da produção total indica que o país irá colher entre 36,9 e 39,8 milhões de sacas de café em 2009, uma redução de aproximadamente 18% em relação à safra anterior, mas um pequeno aumento quando comparado com a safra de 2007 (ABIC, 2009). Essa redução é explicada principalmente pela bialidade da cultura, mas também pela escassez de crédito, alta dos insumos agrícolas e redução da área plantada (ABIC, 2009; CONAB, 2009).

A bebida produzida a partir do café é considerada uma das mais populares do planeta (MOREIRA & TRUGO, 2000) e o seu consumo aumenta a cada ano. No Brasil, o café movimenta cerca de 4,8 bilhões de dólares apenas com as exportações e emprega aproximadamente oito milhões de famílias brasileiras

(ABIC, 2009; INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2009). Esses dados refletem a importância socioeconômica desse produto no país que é o maior produtor mundial e que representa o segundo maior mercado consumidor de café, com expectativas de alcançar a liderança. Em 2008, o consumo interno foi de 17,66 milhões de sacas de café, e, para 2009, há um aumento previsto de 3,0% no consumo. Uma pesquisa realizada em 2008 mostrou que nove entre cada 10 brasileiros acima de 15 anos consomem café diariamente, preferência maior que a de refrigerantes e leite (ABIC, 2009).

A bebida café é uma mistura complexa que contém centenas de diferentes compostos químicos, incluindo carboidratos, lipídeos, compostos nitrogenados, vitaminas, minerais, alcalóides e compostos fenólicos (HIGDON & FREI, 2006). Dentre esses, os ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, aminoácidos e polifenóis são considerados os principais constituintes que influenciam a qualidade da bebida (KOSHIRO et al., 2006). Entretanto, como grande parte dos compostos que afetam a qualidade da bebida é formada durante a etapa de torrefação entre os constituintes primários do grão, muitos aspectos químicos da qualidade da bebida são desconhecidos (PIMENTA, 2003; KOSHIRO et al., 2006).

A expressão da qualidade final da bebida é dependente de uma mistura de fatores, como espécie botânica, cultivar, ambiente, o manejo da lavoura, os cuidados na colheita, secagem, beneficiamento, armazenamento e também a microbiota presente. A combinação de vários fatores resulta em uma bebida com diferentes atributos químicos, físicos e sensoriais (SOUZA & CARVALHO, 1997; PIMENTA, 2003). Alguns cafés, produzidos de maneira peculiar, como o Kopi Luwak na Indonésia, produzem uma bebida com sabor e aroma de alta qualidade, que faz desta uma bebida rara e valiosa (MARCONE, 2004), resultado da ação de micro-organismos durante a etapa de fermentação dos frutos no intestino do animal *Paradoxurus hermaphroditus*. Outros cafés de alta qualidade também passam por etapas semelhantes, mostrando o importante papel da microbiota durante a fermentação do café.

Além do prazer e satisfação que o aroma e o sabor são capazes de proporcionar, o conteúdo de cafeína, responsável pelos efeitos psicológicos e fisiológicos, possui papel importante na popularização da bebida (MOREIRA et al., 2000). O aumento no consumo de café também está associado à divulgação de vários estudos que associam a ingestão de café com a redução no risco de doenças crônicas, como mal de Parkinson (ASCHERIO et al., 2001), câncer de fígado (LA VECCHIA, 2005) e diabetes melito (SALAZAR-MARTINEZ et al., 2004). Além desses benefícios, a maior preocupação em produzir café de qualidade e

também a divulgação da bebida, por meio de campanhas publicitárias e abertura de cafeterias especializadas, contribuíram para o aumento do consumo, principalmente no mercado interno (ABIC, 2009; ICO, 2009). A crescente exigência dos consumidores por cafés de qualidade superior tem incentivado as pesquisas nesse campo.

Cerca de metade do peso seco do fruto do café no estágio cereja é composto por polissacarídeos (BRADBURY & HALLIDAY, 1990) e a sacarose é o principal carboidrato. O teor desse açúcar é variável entre as principais cultivares utilizadas comercialmente, sendo maior em *C. arabica* (6 a 8%), e menor em *C. canephora* (0,9 a 4,9%) (DE CASTRO & MARRACINI, 2006). O papel dos açúcares na qualidade da bebida é explicado pelas complexas mudanças que ocorrem durante o processo de torrefação do grão, por formação de compostos com coloração caramelizada escura resultante de reação com aminoácidos (Reação de Maillard) (PIMENTA, 2003), além da formação de ácidos alifáticos e outros compostos voláteis (DE CASTRO & MARRACINI, 2006).

Além do teor de açúcar, o fruto também é rico em lipídeos, proteínas e minerais (DE CASTRO & MARRACINI, 2006). Os teores de trigonelina, de ácido 3,4-dicafeoilquínicos, de cafeína e de proteína bruta também estão associados à qualidade da bebida, uma vez que são precursores de substâncias importantes para o sabor e aroma da bebida do café (DE MARIA et al., 1999; MOREIRA et al., 2000; FARAH et al., 2006).

Essa composição rica em nutrientes, principalmente do mesocarpo mucilaginoso, sustenta o crescimento de micro-organismos durante a maturação do fruto e na fermentação do café, quando a mucilagem aderida aos grãos é retirada (AVALLONE et al., 2001; MASOUD & JESPERSEN, 2006). Diversos trabalhos associam micro-organismos com eventos durante o processamento do café, como produção de enzimas pectinolíticas, deterioração dos frutos, dos grãos e produção de micotoxinas (BATISTA et al., 2003; PARDO et al., 2004; MASOUD & JESPERSEN, 2006), mas poucos são os que acessam a sua importância na produção de café com qualidade.

Micro-organismos endofíticos são conhecidos há mais de 120 anos, e seu conceito é variável (HARDOIM et al., 2008). De maneira geral, são definidos como aqueles que podem ser isolados de órgãos de plantas cujas superfícies foram esterilizadas (HENNING & VILLFORTH, 1940), conceito que abrange qualquer tipo de organismo, patógeno ou não, habitando tecidos internos da planta. Outro amplamente utilizado restringe os endofíticos àqueles micro-organismos que não

causam danos visíveis à planta e podem ser isolados ou extraídos de tecidos vegetais superficialmente esterilizados (HALLMANN et al., 1997).

Na verdade, a distinção entre endofíticos, epifíticos (aqueles que habitam as superfícies das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças às plantas) é relevante didaticamente, não representando o que ocorre na natureza (AZEVEDO et al., 2000). Existe um gradiente que separa os diversos tipos de interação entre planta e micro-organismo e o estabelecimento de uma relação benéfica ou patogênica depende das condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações microbianas (MISAGHI & DONDELINGER, 1990). Por exemplo, *Xylella fastidiosa* é patógeno capaz de infectar todas as cultivares da planta *Citrus sinenses*, mas algumas dessas plantas infectadas não apresentam os sintomas da doença. Essa resistência está associada à comunidade microbiana presente nas plantas assintomáticas, que provavelmente interagem com o patógeno inibindo seu desenvolvimento e o estabelecimento da doença (ARAÚJO et al., 2002).

As plantas constituem nicho ecológico vasto e diverso, onde populações endofíticas crescem e se desenvolvem geralmente em densidades populacionais menores que as formadas por patógenos ou por micro-organismos na rizosfera (HALLMANN et al., 1997; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Os endofíticos habitam os espaços intercelulares e estabelecem diversas interações com o hospedeiro (RYAN et al., 2008), atuando como bactérias promotoras de crescimento ou agentes de biocontrole (ZHANG et al., 2006; BACKMAN & SIKORA, 2008), pela produção de fitormônios, agentes antimicrobianos, sideróforos e também por indução de resistência sistêmica no hospedeiro e aumento na disponibilidade de minerais (HALLMANN et al., 1997; STURZ et al., 2000; WENBO et al., 2001; LODEWYCKX et al., 2002; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Muitos endofíticos pertencem a *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus*, gêneros conhecidos pela diversidade de metabólitos secundários que produzem, como exemplo, antimicrobianos e compostos voláteis (STROBEL, 2006; RYAN et al., 2008).

O isolamento da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* de tecidos da raiz e do caule de *C. arabica* foi o primeiro relato de endofíticos nessa planta (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997). Posteriormente, outros trabalhos caracterizaram a população de bactérias e fungos endofíticos e epifíticos em diferentes cultivares de vários países (SANTAMARÍA & BAYMAN, 2005; VEGA et al., 2005). Outros estudos de diversidade e abundância mostraram que a microbiota envolvida na fermentação do café é composta por micro-organismos oriundos da superfície e do interior do fruto e também do solo, com a maior parte de bactérias, seguidas por

fungos filamentosos e leveduras. (SILVA et al., 2000; AVALLONE et al., 2001). Composição similar de micro-organismos epifíticos e endofíticos foi encontrada durante todos os estádios de maturação do fruto do café (SAKIYAMA, 2001).

O Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa iniciou, há alguns anos, uma linha de pesquisa que visa a estudar a microbiota epifítica e endofítica do fruto do café associando-a à qualidade da bebida, utilizando métodos de cultivo e isolamento, além de técnicas microscópicas e imunológicas. Esses estudos levaram ao isolamento, caracterização e também à comprovação do potencial endofítico de alguns isolados (GENARI, 1999; YAMADA, 1999; DE PAULA, 2001, SAKIYAMA, 2001). Entretanto, estima-se que menos de 1% dos micro-organismos existentes seja acessado por esses métodos (TORSVIK et al., 1990; HANDELSMAN et al., 1998; HUGENHOLTZ, 2004; TYSON & BANFIELD, 2005).

A determinação da diversidade microbiana independente de métodos de cultivo é feita principalmente pela amplificação e sequenciamento de subunidades dos rDNAs (TYSON & BANFIELD, 2005). A análise da diversidade genética do bacterioplâncton do Mar de Sargasso foi o primeiro estudo utilizando a metodologia de amplificação do rDNA 16S direto do ambiente (GIOVANNONI et al., 1990). A adoção de ferramentas moleculares pelos ecologistas microbianos aumentou rapidamente o conhecimento da abundância e diversidade de procariotos nos ambientes (CASE et al., 2007). O reconhecimento de que as sequências dos rDNAs poderiam levar à identificação de um organismo por reconstruir sua filogenia e a possibilidade de armazenar as sequências em grandes bancos de dados levou à rápida adoção do rDNA 16S pelos microbiologistas e à sua ampla utilização em estudos de ecologia microbiana (WOESE & FOX, 1977; ALLEN & BANFIELD, 2005; CASE et al., 2007). Apesar da utilidade na identificação de micro-organismos, essa metodologia pouco contribui para avaliar o papel de cada um dentro de populações naturais (STEELE & STREIT, 2005).

O termo metagenoma surgiu como uma forma de acessar o potencial genômico de amostras ambientais independentemente de cultivo (HANDELSMAN, 2004). Técnicas metagenômicas envolvem a extração direta do DNA, clonagem, construção de uma biblioteca e análise de todos os genomas de uma amostra como uma única entidade, permitindo o acesso a comunidades microbianas inteiras, incluindo cultiváveis e não cultiváveis (HANDELSMAN, 2004; STREIT e SCHIMITZ, 2004). As informações contidas nessas bibliotecas podem ser usadas para comparar e determinar a diversidade de comunidades microbianas (RONDON et al., 2000; TRINGE et al., 2005), detectar a presença de micro-organismos ou vias

biossintéticas específicas (UCHIYAMA et al., 2005) e, também, como fonte para descoberta de novos genes e produtos de interesse industrial (COWAN et al., 2005; LI & QIN, 2005).

Recentemente, o Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa começou a estudar a diversidade de micro-organismos cultiváveis e não cultiváveis no fruto do café utilizando uma abordagem metagenômica. Os estudos forneceram uma visão detalhada da presença de bactérias endofíticas e epifíticas usando, além de técnicas tradicionais de cultivo e isolamento, técnicas moleculares como Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), construção de bibliotecas de rDNA 16S e sequenciamento. Estes estudos mostraram a diversidade de bactérias e leveduras totais em diferentes cultivares de *C. arabica* amostrados em várias altitudes na Zona da Mata Norte, em Minas Gerais, além da sucessão de leveduras durante a secagem natural do café em terreiro revestido com cimento (CORDERO, 2008; SANTOS, 2008; VALE, 2009).

A metagenômica tem revolucionado a pesquisa em microbiologia (WARD, 2006) e revelado a grande diversidade de procariotos não cultiváveis (HUGENHOLTZ, 2002), especialmente do domínio Archaea (SCHLEPER et al., 2005; ROBERTSON et al., 2005; SCHLEPER, 2007).

A história do domínio Archaea teve início na década de 60, quando Carl R. Woese, na tentativa de descobrir a natureza e a origem dos processos de decodificação da informação genética, passou a utilizar a recém-criada técnica de sequenciamento para catalogar sequências de rRNA e tRNA. Até aproximadamente 1976 todas as sequências catalogadas pertenciam a um dos dois grandes grupos, eucariotos ou procariotos. Com o desenvolvimento de uma metodologia para cultivo de metanogênicos, Woese começou a identificar as sequências dos rDNA e tDNA de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, encontrando padrão de nucleotídeos que não se enquadrava em nenhum grupo. A confirmação desse padrão distinto em linhagens de metanogênicos e também em outros micro-organismos, como *Thermoplasma* (até então identificado como micoplasma crescendo em ambiente ácido) e halofílicos extremos, além de características únicas destes organismos, suportou a hipótese intensamente combatida à época, de uma terceira forma de vida (WOESE & FOX, 1977). Nessa primeira publicação, Woese propôs um terceiro reino, denominado Archaeobacteria, para distinguir micro-organismos metanogênicos de eubactérias, não incluindo os halofílicos e o também o extremófilo *Thermoplasma* (WOESE, 2007). O prefixo archaea foi escolhido em razão da antiguidade do fenótipo metanogênico, capaz de sobreviver no tipo de

ambiente que provavelmente existia na Terra cerca de três a quatro bilhões de anos atrás (WOESE & FOX, 1977). Anos mais tarde, com a intensificação do uso de metodologias moleculares para identificação de micro-organismos e a constatação de que as arqueas não eram mais relacionadas às bactérias que aos eucariotos, foram propostos os três domínios da vida: Eucarya, Bacteria e Archaea (WOESE et al., 1990), classificação que também gerou grandes debates (ALLERS & MEVARECH, 2005; WOESE, 2007).

A divisão das formas de vida em três domínios é hoje aceita, mas a posição do domínio Archaea na árvore universal da vida ainda é discutida, existindo três principais hipóteses. A primeira, publicada entre a década de 80 e 90, é a mais aceita e sugere que o domínio Bacteria derivou diretamente do ancestral LUCA (*Last Universal Common Ancestral*), enquanto Archaea e Eucarya compartilham um ancestral comum mais recente que o LUCA (FORTERRE et al., 2007). Outro modelo propõe que Archaea e Bacteria derivaram do LUCA e a fusão de membros desses dois domínios originou a linhagem eucariótica (LOPEZ et al., 1999). No terceiro modelo, o LUCA foi uma bactéria, e ambos, Archaea e Eucarya derivaram de uma linhagem particular de bactéria Gram-positiva (CAVALIER-SMITH, 2002).

As arqueas não são facilmente distinguidas das bactérias pelo tamanho ou forma, e, apesar de serem consideradas uma quimera de Bacteria e Eucarya, formam um grupo monofilético (ALLERS & MEVARECH, 2005). Uma diferença clássica está na composição dos lipídeos de membrana, que são ácidos graxos ligados ao glicerol por ligação éter e cujo esqueleto de glicerol é uma imagem especular do esqueleto presente nos outros domínios (FORTERRE et al., 2002a), mas alguns outros aspectos são menos conhecidos. Por exemplo, diferentes tipos de estruturas de superfície são encontrados em Archaea (NG et al., 2008), como o *cannulae*, uma estrutura tubular encontrada no gênero *Pyrodictium*, que conecta as células (RIEGER et al., 1995); o *hamus*, envolvido na adesão celular às superfícies de diferentes composições químicas (MOISSL et al., 2005); e o *bindosome*, uma estrutura similar ao flagelo bacteriano, mas que provavelmente participa na captação e transporte de nutrientes para dentro da célula (ALBERS et al., 2003).

Uma característica marcante do domínio Archaea é a existência de uma grande diversidade metabólica que os distingue dos outros domínios (DELONG, 1992; FORTERRE et al., 2002a; SCHLEPER, 2007). Representantes desse domínio habitam locais com condições extremas, como altas temperaturas. Em muitos casos a temperatura ótima de crescimento dos hipertermófilos é superior a 100 °C, como é o caso da arquea quimiolitotrófica *Pyrolobus fumarii*, cuja temperatura ótima de crescimento é de 103 °C, sendo apta para crescer a 113 °C

(BLÖCHL et al., 1997). As arqueas também combinam capacidade de crescer em altas temperaturas com alta acidez, como em lagoas vulcânicas (LÖHR et al., 2006) e *chaminés hidrotermais* (REYSENBACH et al., 2006). A abundância de hipertermofílicos no domínio Archaea, associada aos pequenos ramos nas árvores filogenéticas de rDNA 16S, sugere que o LACA (*Last Archaeal Common Ancestral*) tenha sido termofílico (WOESE et al., 1987, FORTERRE et al., 2007). Essa hipótese é suportada também por análises filogenéticas utilizando o gene da girase reversa, uma enzima específica de hipertermofílicos e que segundo as análises, estava presente no LACA (FORTERRE, 2002b).

Outro importante grupo de Archaea, estudado antes mesmo da descoberta desse domínio, compreende os organismos halofílicos, capazes de crescer em ambientes com altas concentrações de sal, como lagos salinos (CASTILLO et al., 2006), salinas e rochas de sal (RADAX et al., 2001), dentre outros (CHABAN et al., 2006). Espécies de haloarqueas bem estudadas são *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui* e *Haloarcula mediterranei* (SOPPA, 2006). No início da década de 70 a descoberta da bacteriorrodopsina, uma bomba de prótons energizada pela luz, tornou as haloarqueas foco de atenção dos microbiologistas, e hoje é uma das proteínas de membrana mais bem entendidas e caracterizadas (SHARMA et al., 2006; SOPPA et al., 2008).

O interesse na compreensão dos mecanismos de osmoadação das haloarqueas também tem incentivado as pesquisas com esses organismos. A disponibilidade de sistemas genéticos que permitem a modificação de genes, bem como análises de transcriptoma e proteoma, tornou as halofílicas micro-organismos modelo especialmente nos estudos de transcrição e tradução, similares aos encontrados em eucariotos (ALLERS & MEVARECH, 2005). Além disso, vários genomas completos e parciais de haloarqueas estão disponíveis nos bancos de dados (SOPPA, 2006), os quais são usados para estudos *in silico* de reconstrução das vias metabólicas (FALB et al., 2008).

Os estudos iniciais de filogenia de Archaea foram feitos usando os genes codificadores de rRNA 16S e sugerem a divisão do domínio em dois filos, o Euryarchaeota, ao qual pertencem vários metanogênicos, halofílicos extremos, termoacidofílicos e poucos hipertermofílicos e o Crenarchaeota, que engloba os hipertermofílicos e a maioria das arqueas não-extremófilas. A existência desses dois filos também é suportada por análises filogenéticas de outros genes (BROCHIER et al., 2005) e também por genômica comparativa (MAKAROVA & KOONIN, 2003). Em 1994, sequências do rDNA 16S amplificadas a partir de amostras ambientais de fontes hidrotermais revelaram a existência de um terceiro

filo, denominado Korarchaeota (BARNS et al., 1994), o qual posiciona-se na base da árvore evolutiva de Archaea e divergiu antes da separação entre Euryarchaeota e Crenarchaeota (AUCHTUNG et al., 2006). O quarto filo do domínio Archaea, Nanoarchaeota, foi descoberto em estudos de diversidade de hipertermofílicos em chaminés submarinas quentes, quando identificaram minúsculos cocos cobrindo a superfície celular de *Ignococcus*. Esses cocos, cujo diâmetro celular é 1/100 vezes o de *Escherichia coli*, e o tamanho do genoma é de 0,5 megabases, só eram cultivados na presença de *Ignococcus* e foram identificados como *Nanoarchaeum equitans* (HUBER et al., 2002). A relação filogenética e até mesmo a definição desse grupo como filo ainda não é um consenso. Estudos que consideram a existência do filo mostram que *N. equitans* aparece em um ramo distinto de Crenarchaeota e Euryarchaeota, enquanto outros autores posicionam esse organismo no filo Euryarchaeota (FORTERRE et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que nanoarqueotas não são restritos a ambientes hipertermofílicos, sendo encontrados também em ambientes mesofílicos hipersalinos (CASANUEVA et al., 2008).

Grande parte das sequências de Archaea descritas em ambientes mesofílicos é classificada dentro do filo Crenarchaeota, formando grupo irmão das hipertermofílicas (SCHELEPER et al., 2005). Entretanto, análises filogenéticas recentes, baseadas no genoma completo de *Cenarchaeum symbiosum*, mostraram que a divergência entre arqueas mesofílicas e hipertermófilas é mais ancestral do que se imaginava, e a criação de um novo filo, o Thaumarchaeota, foi proposta (BROCHIER-ARMANET et al., 2008).

A ocupação de nichos ecológicos considerados extremos, como sítios geotermiais, regiões polares, fontes ácidas e alcalinas, lagos salinos e também profundas regiões do oceano, faz do domínio Archaea uma importante fonte de enzimas e organismos de interesse biotecnológico (FERRER et al., 2007). Por exemplo, muitas celulasas têm sido identificadas em Archaea e a utilização de enzimas estáveis a altas temperaturas e baixos valores de pH pode reduzir os custos de produção de biocombustíveis a partir de material lignocelulósico (EGOROVA & ANTRANIKIAN, 2007; HESS, 2008). Além da diversidade de enzimas, os organismos do domínio Archaea também são usados para processos de biocatálise, como biomineração, degradação de compostos tóxicos e descontaminação de metais pesados e solventes halogenados, (EGOROVA & ANTRANIKIAN, 2007; BORGNE et al., 2008).

Como a maioria das arqueas cultiváveis é composta por extremófilas, a importância desses organismos no ambiente por muito tempo foi minimizada

(BINTRIM et al., 1997; DELONG, 1998). Entretanto, essa visão começou a mudar com a descrição de Archaea não cultiváveis no plâncton marinho, representando até 2% do total de rRNA extraído das amostras (DELONG, 1992). A partir desses estudos, inúmeras sequências de Archaea têm sido detectadas em diferentes amostras ambientais, como solo, material vegetal em decomposição, sedimentos marinhos, campos de arroz, em associação com eucariotos e muitas outras (BINTRIM et al., 1997, LEININGER et al., 2006; SCHLEPER, 2007; MANERKAR et al., 2008).

A ampla distribuição do domínio Archaea sugere importante papel no ciclo global de energia (SCHLEPER et al., 2007). Sedimentos marinhos armazenam grande quantidade de metano na forma de hidretos de metano. Continuamente, o gás metano é liberado desses depósitos, mas a maior parte é convertida a CO₂ antes de alcançar a superfície, em processo chamado oxidação anaeróbia do metano, impedindo a intensificação do efeito estufa (KLAUDA & SANDLER, 2005). Essa conversão é feita por membros da família Methanosarcinales em relação de simbiose com bactérias redutoras de sulfato (BOETIUS et al., 2000; NAUHAUS et al., 2007).

Micro-organismos do filo Crenarchaeota compõem a maior parte da comunidade microbiana nos oceanos (LIPP et al., 2008). O isolamento de um representante deste filo capaz de oxidar amônia a nitrito, a ampla distribuição de genes envolvidos no processo e a correlação positiva de crenarqueota com nitrito, sugere papel dos organismos desse filo no ciclo de nitrogênio nesse ambiente (FRANCIS et al., 2007). Estudos utilizando métodos independentes de cultivo também têm demonstrado a maior abundância de cópias e transcritos do gene *amoA* de Archaea quando comparada com os do mesmo gene de Bactéria (LEININGER et al., 2006; ADAIR & SCHWARTZ et al., 2008), criando debate sobre os principais grupos responsáveis pela nitrificação no solo. Entretanto, apesar dos estudos de abundância de representantes de cada domínio, e da detecção de que os genes *amoA* de Archaea são ativamente transcritos, a contribuição quantitativa de Archaea no processo de nitrificação no oceano e nos solos ainda não é conhecida (FRANCIS et al., 2007; PROSSER & NICOL, 2008).

Diversas linhagens de Archaea são encontradas em associação com plantas. A comparação da microbiota presente em solo não rizosférico e na rizosfera de 76 amostras de plantas de diferentes grupos revelou uma maior Riqueza de filotipos do filo Crenarchaeota no solo rizosférico (SLIWINSKI & GOODMAN, 2004). Também foi observada maior abundância de genes *amoA* na rizosfera da macrófita *Littorella uniflora* do que na região não rizosférica

(HERRMANN et al., 2008). Diferentemente, para plantas da família Proteaceae só foram encontradas sequências de Archaea na região não rizosférica (STAFFORD et al., 2005). A interação entre membros do domínio Archaea e plantas também foi demonstrada pelo enriquecimento de um filotipo Crenarchaeota presente na rizosfera da planta de tomate (SIMON et al., 2005).

A descoberta de dois diferentes filotipos, pertencentes aos filos Crenarchaeota e Euryarchaeota, identificados a partir da amplificação do DNA extraído de raízes de milho levantou a hipótese de Archaea colonizando tecidos internos de plantas (CHELIUS & TRIPLET, 2001). A primeira descrição de Archaea endofíticas foi feita pelo sequenciamento de uma biblioteca de rDNA 16S construída a partir do produto de amplificação do DNA de raízes de arroz superficialmente desinfestadas. Nesse estudo foram identificados seis clones representando duas Unidades Taxonômicas Operacionais, que foram similares a *Methanospirillum* sp. e *Candidatus Methanoregula boonei* (SUN et al., 2008).

Mesmo sendo identificadas por métodos moleculares, como sequenciamento do rDNA 16S, trabalhos indicam que essas populações são ativas e respondem a variações ambientais (SCHLEPER, 2007), reforçando a importância ecológica desse domínio. Apesar dos avanços nos estudos com Archaea, a dificuldade de isolamento desses micro-organismos, associada ao desconhecimento do seu genoma, limita a predição de sua fisiologia (SCHLEPER et al., 2005).

Os estudos de diversidade de Archaea são relativamente recentes, mas já demonstraram sua vasta distribuição na natureza, embora pouco se conheça sobre as interações que esses organismos podem estabelecer intra e interespecies (SCHLEPER, 2007). A complexidade de micro-organismos epifíticos e endofíticos associados ao fruto de café é notória, mas até o momento a presença de Archaea não foi investigada.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência e diversidade de Archaea endofíticas em frutos de café, bem como a sucessão de Archaea durante a seca natural dos grãos de café (*C. arabica* L.) em terreiro revestido com cimento, provenientes de lavouras cultivadas em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte em Minas Gerais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e extração de DNA

Amostras de frutos de café no estágio cereja foram coletadas em fazendas localizadas no município de Araponga, região da Zona da Mata Norte, no estado de Minas Gerais, Brasil. O estudo foi realizado com 10 amostras de cinco cultivares de café e as características de cada amostra e sua origem estão discriminadas na Tabela 1. As amostras foram transportadas no gelo para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), embaladas a vácuo e mantidas a -20°.

Para a extração de DNA metagenômico dos frutos maduros foram utilizados oito frutos por amostra, sendo todos previamente submetidos a processo de desinfestação superficial (SAKIYAMA, 2001). A extração de DNA da amostra 40B foi feita como descrito por SANTOS (2008) com a adição, ao tampão de extração, de 40 µg mL⁻¹ de proteinase K (Sigma) e 40 µg mL⁻¹ de Pronase E (Sigma). Uma etapa adicional de purificação utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA) foi incorporada. As amostras de DNA das demais amostras foram as obtidas por CORDERO (2008).

O estudo da sucessão de Archaea durante a seca natural do café foi realizado com amostras de café cultivar Bourbon Vermelho da safra 2007 cultivadas a 1074 m de altitude na Fazenda Serra das Cabeças, região da Zona da Mata Norte, Minas Gerais, Brasil. Foram coletadas amostras de grãos de café despolidos, processados sob seca natural em terreiro revestido com cimento, de dois em dois dias, do primeiro dia até o processo completo de secagem. A extração de DNA foi feita como descrita por CORDERO (2008), com modificações propostas e usadas na extração de DNA da amostra 40B.

Tabela 1: Relação e áreas de coleta das 10 amostras de frutos de café cereja em lavouras com cultivares de *Coffea arabica* (L.), localizadas em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais.

Amostra	Cultivar	Localidade	Coordenada Geográfica	Altitude (m)
40B	Catuaí Vermelho	Araponga, Fazenda Braúna	20°84'78,7" S 42°65'65,3" W	936
625	Catuaí Vermelho	Campo experimental UFV	20°44'3,48" S 42°50'57,2" W	676
628	Bourbon Amarelo	Campo experimental UFV	20°44'29,5" S 42°50'47,4" W	687
629	Catuaí Vermelho	Araponga, fazenda Itatiaia.	20°40'32,4" S 42°34'13,6" W	956
630	Catuaí Amarelo	Araponga, fazenda Itatiaia.	20°39'55,2" S 42°34'13,6" W	956
631	Bourbon Vermelho	Araponga, fazenda Santo Antonio.	20°39'55,2" S 42°30'44,2" W	1067
632	Bourbon Amarelo	Araponga, fazenda Santo Antonio.	20°39'55,2" S 42°30'44,2" W	1067
643	Catuaí Amarelo	Araponga, Serra do Boné.	20°39'16,3" S 42°27'32,0" W	1013
644	Catuaí Vermelho	Araponga, Serra do Boné.	20°39'16,3" S 42°27'32,0" W	1013
646	Catuaí Vermelho	Araponga, Serra do Boné.	20°39'57,9" S 42°30'45,4" W	1189

3.2. Análise da diversidade de Archaea

A diversidade de Archaea nas diferentes amostras foi estudada pelo método de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), construção de bibliotecas de rDNA 16S, sequenciamento dessas bibliotecas e análises filogenéticas das sequências.

3.2.1. Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

As regiões dos rDNAs correspondentes a V3-V5 foram amplificadas utilizando-se *primers* específicos de Archaea, Arch344fGC (ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA) (RASKIN et al., 1994) e 927r (CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC) (JURGES et al., 1997), com um grampo GC (CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCC) (MYERS et al., 1985) adicionado à extremidade 5' do *forward*. As regiões V3 dos rDNAs 16S de Archaea foram amplificadas utilizando-se o *primer* Arch344fGC e o *primer* universal 517r (ATTACCGCGGCTGCTGG) (LANE et al., 1985). A comparação da resolução da diversidade de Archaea usando cada um dos pares de *primers* foi feita utilizando o DNA da amostra de café 40B e o DNA de uma amostra de latossolo, extraído pelo kit PowerSoil™ DNA Isolation (MO BIO, Carlsbad, USA), utilizando *Nested-PCR* e DGGE. Os estudos de diversidade nos frutos de café e durante a secagem dos grãos foram feitos usando o produto de amplificação da segunda reação de PCR.

A primeira reação de PCR foi realizada com os *primers* Arch344fGC e 927r. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 200 µM de dNTPs, 0,75 U de GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 1,75 mM de cloreto de magnésio (Promega, Madison, USA), 670 ng de BSA (Promega, Madison, USA), 0,16 µM de cada *primer* e aproximadamente 60 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada para completar o volume final.

A amplificação foi feita por meio de *touchdown PCR*, que foi realizada sob as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por cinco minutos, 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de 61 °C por 30 segundos, com decréscimo de 0,5 °C a cada ciclo até atingir a temperatura de 56°C, e temperatura de 72°C para a extensão dos *primers*. Após os 10 ciclos iniciais, foram realizados 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72 °C por um minuto. Por último, uma etapa de 72 °C por sete minutos.

A segunda reação de PCR foi realizada usando 1 µL da primeira como molde. As condições da reação e da amplificação foram as mesmas usadas na primeira reação, exceto pelo *primer* reverso, que foi substituído pelo 517r.

Para a separação dos diferentes *amplicons* em DGGE foram aplicados 18 µL dos produtos da PCR, em gel de poliacrilamida vertical em tampão TAE, sendo o gradiente de uréia/formamida de 40 a 60%. Para a separação dos *amplicons* obtidos na primeira reação da PCR foi utilizado gel de poliacrilamida a 6% (p/v), e para os *amplicons* da segunda reação foi utilizado gel de poliacrilamida a 8% (p/v). A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C e voltagem constante de 60 V durante 16 horas, e o gel corado com SYBR[®] Gold (Invitrogen). As eletroforeses foram feitas em um equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad – Califórnia USA), seguindo as recomendações do fabricante.

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis obtidos após a DGGE foi realizada utilizando o programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de Archaea foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1) e ausência como zero (0). A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos.

3.2.2. Construção de bibliotecas de rDNA 16S

Foram construídas bibliotecas de rDNA 16S de Archaea para três amostras de frutos de café. Para a amostra 40B, foi usado o produto de amplificação da primeira reação de PCR descrita anteriormente. Para as amostras 628 e 646 foram usados os produtos da segunda reação, dada a ausência de amplificação visível na primeira reação. Os *amplicons* foram clonados em pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) conforme recomendações do fabricante. Toda a reação de ligação foi usada para transformar células de *Escherichia coli* DH5α ultracompetentes. Clones de cada biblioteca foram aleatoriamente selecionados e sequenciados no Laboratório de Genômica do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa usando os *primers* M13F ou M13R, específicos para o plasmídeo.

A diversidade de clones na biblioteca foi investigada por análise de rarefação (HECK et al., 1975), usando o programa Analytic Rarefaction 1.3

(aRarefactWin) (www.uga.edu/~strata/software/anRareReadme.html). Para estimar a representatividade dos ribotipos, a cobertura (C) dos clones analisados foi calculada de acordo com a seguinte equação: $C = 1 - (n_1/N)$, em que: n_1 é o número de clones únicos, considerados aqueles cuja sequência só foi encontrada uma vez entre todos os clones e N é o número total de clones examinados (CHELIUS & TRIPLLET, 2001).

3.3. Análises filogenéticas

Todas as sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI) e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL et al., 1990). Múltiplas sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW para a análise filogenética por meio da reconstrução de árvores filogenéticas pelo método da Máxima Parcimônia ou de *Neighbour-Joining*, utilizando o método de distância p, com auxílio do programa MEGA 4.0[®] (TAMURA et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de DNA metagenômico de frutos de café

O protocolo de desinfestação de frutos de café adotado no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e utilizado neste estudo para a amostra de café 40B mostrou-se eficaz. O referido protocolo tem sido utilizado com sucesso para a extração de DNA de micro-organismos endofíticos em frutos de café (CORDERO, 2008; SANTOS, 2008; VALE, 2009). O meio R2A foi o de escolha em razão da maior densidade e ocorrência de bactérias epifíticas, quando comparada à de leveduras, e também a inexistência de um meio recomendado para cultivo de Archaea em frutos de café.

As alterações nos protocolos de extração de DNA de frutos de café propostas neste trabalho, como a adição de proteases, foram feitas para otimizar a recuperação de DNA de Archaea endofíticas em nicho ecológico muito específico. Estudos de diversidade de Archaea em amostras ambientais utilizam protocolos sem essas adaptações (BANO et al., 2004; CLEMENTINO et al., 2007; BOMBERG & TIMONEM, 2009), embora estudo em regiões profundas do oceano utilizando proteinase K na extração de DNA encontrou uma abundância de Archaea duas vezes maior que a descrita em outros trabalhos (HERNDL et al., 2005). A inclusão de proteases no protocolo resultou ainda da consideração de que as densidades de populações de Archaea são menores que as de bactérias e fungos e que a parede celular de várias arqueas conhecidas é composta por material protéico (ALBERS et al., 2006; BURGHARDT et al., 2006).

A etapa de purificação do DNA metagenômico utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification foi outra alteração no protocolo para extração de DNA dos frutos de café no estágio cereja e dos grãos de café coletados durante a secagem natural. Essa purificação fez-se necessária porque o DNA obtido com o

protocolo original aparentava contaminação com polissacarídeos e polifenóis, fato comum durante o processo de extração de DNA de amostras vegetais, especialmente quando estocadas a 0°C (POREBSKI et al., 1997). Em alguns testes realizados, utilizando *primers* universais para eubactérias, só foi observado produto de amplificação após a purificação (Dados não mostrados). As amostras de DNA extraídas por CORDERO (2008) não foram purificadas porque não havia evidências de contaminação por esses metabólitos.

A comparação do protocolo atual com o utilizado por SANTOS (2008) mostrou a maior recuperação de DNA de Archaea quando proteases eram adicionadas ao tampão de extração. Essa eficácia foi comprovada pela obtenção de produtos de amplificação na reação de PCR utilizando os *primers* Arch344fGC/927r apenas no protocolo ao qual foram incorporadas as alterações propostas neste trabalho (dados não mostrados).

4.2. Avaliação dos *primers* usados no estudo

4.2.1 Análise de especificidade

A análise da especificidade dos *primers* usados neste trabalho foi feita utilizando micro-organismos de referência (Tabela 2). Outros autores obtiveram amplificação inespecífica usando *primers* específicos para grupos bacterianos (SANTOS, 2008) e para leveduras (VALE, 2009) em DNAs extraídos de frutos de café. Nesses trabalhos, parte das sequências mostrou-se similar às sequências de cloroplastos e fungos filamentosos.

As reações de PCR utilizando os pares de *primers* Arch344fGC/927r e Arch344fGC/517r resultaram, respectivamente, em produtos de amplificação de aproximadamente 623 pb e 210 pb (Figura 1), obtidos apenas quando utilizado o DNA da arquea *Haloferax volcanii* ATCC 29605. Este resultado confirmou a especificidade dos *primers*, mesmo quando se utilizou o *primer* universal 517r, que é usado em conjunto com outros *primers* em estudos de diversidade de bactérias em diferentes amostras ambientais, como solo (XU et al., 2009) ou biofilmes (MAGALHÃES et al., 2007). Esse resultado assegura a avaliação mais precisa dos experimentos subsequentes, evitando superestimar a diversidade de Archaea. Das quatro sequências pertencentes ao filo Crenarchaeota, três agruparam filogeneticamente com sequências de arqueas não cultiváveis do solo, e uma com sequências de ambiente marinho, resultante de ampliações inespecíficas.

Tabela 2: Linhagens de micro-organismos de referência usadas neste trabalho

Nome	Referência ¹
<i>Haloferax volcanii</i>	ATCC 29605
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 23858
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Penicillium griseoroseum</i>	CCT 6421
<i>Candida albicans</i>	ATCC 102031

¹ATCC – American Type Culture Collection, Washington, DC, USA.

CCT - Coleção de Cultura Tropical, Campinas, SP, Brazil.

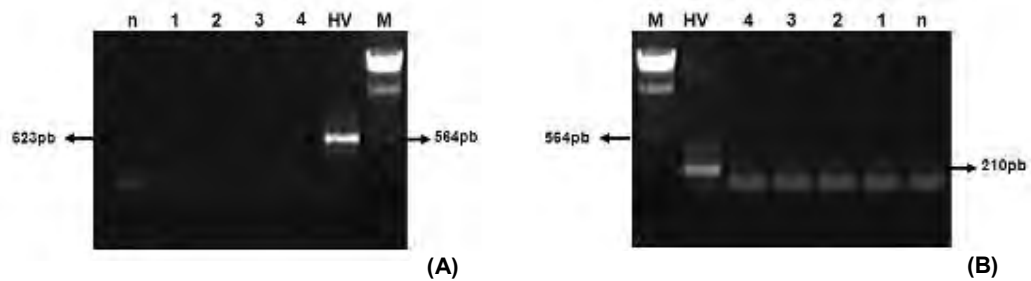


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos dos rDNAs 26S de fungos, e dos rDNAs 16S de bactérias e arqueas. (A) Par de *primers* Arch344fGC/927r, (B) Par de *primers* Arch344fGC/517r. 1: *Penicillium griseoroseum* CCT6421, 2: *Candida albicans* ATCC 102031, 3: *Bacillus subtilis* ATCC 23858, 4: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605, M: Lambda DNA/*HindIII*, n: Branco da reação de PCR.

4.2.2 Avaliação de diferentes regiões hipervariáveis do rDNA 16S de Archaea utilizando *primers* específicos

Os primeiros estudos de diversidade foram realizados com DNA da amostra de café 40B. Na reação de PCR utilizando o par de *primers* Arch344fGC/927r foi observado um *amplicon* do tamanho esperado, aproximadamente 623 pb, comprovando a eficácia do método de extração de DNA utilizado. Parte desta reação foi usada para uma reação de *Nested-PCR* com os *primers* Arch344fGC/517r, gerando um fragmento de 210 pb. Este procedimento tornou-se necessário, já que nenhuma amplificação foi observada com esses *primers* quando o DNA extraído era diretamente usado como molde.

Os pares de *primers* usados resultam na amplificação de diferentes regiões hipervariáveis do DNA 16S de Archaea (YU et al., 2008). Como ambos os *amplicons* possuem o grampo GC, foram separados em gel de poliacrilamida, o que permitiu a avaliação e comparação dos dois perfis eletroforéticos em DGGE. Entretanto, o desconhecimento prévio da diversidade de Archaea presente no fruto de café poderia restringir a comparação. Se a diversidade fosse muito baixa poderia não resultar em diferença observável no número de bandas, prejudicando a escolha dos *primers* para a continuação dos estudos. Diante do exposto, foi adotada a opção de extrair o DNA de uma amostra de solo retirada de uma reserva legal no município de Ipaba, Minas Gerais, para servir como referência, considerando a grande diversidade de Archaea encontrada em diversos tipos de solo e em diferentes condições (BINTRIN et al., 1997; LEINIGER et al., 2006).

A região V3 do rDNA 16S, amplificada pelos *primers* Arch344fGC/517r, gerou um maior número de bandas, ou Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), visíveis em DGGE quando comparada com o produto de amplificação da região V3 a V5, gerado pelos *primers* Arch344fGC/927r (Figura 2). Os géis foram analisados no programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), evidenciando a diferença no número de UTOs obtidas em cada situação, pelo cálculo da variável Riqueza. A análise revelou, para a amostra de café, a presença de sete UTOs no perfil gerado pelos produtos amplificação com os *primers* Arch344fGC/927r e 20 UTOs com os *primers* Arch344Fgc/517r (Figura 3). Resultado similar foi observado para a amostra de solo, mas a diversidade de Archaea presente no fruto de café foi suficiente para a decisão da escolha dos *primers* nos estudos posteriores. Esse resultado não diferiu daqueles obtidos por YU et al. (2008) ao estudar a comunidade de metanogênicos no rúmen.

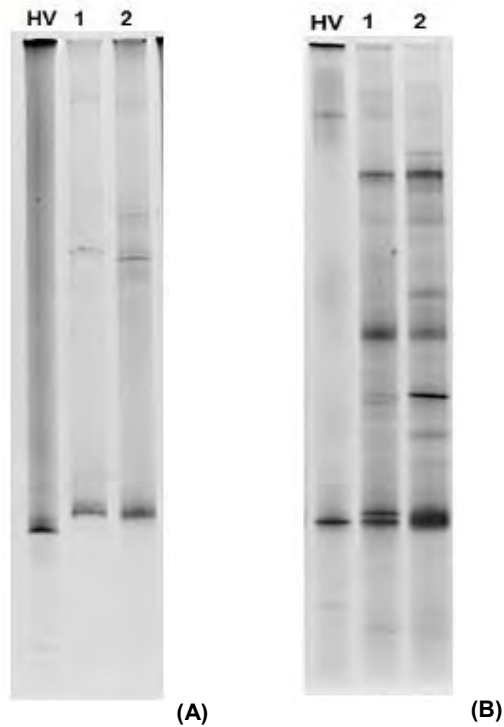


Figura 2: Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de Archaea presentes em frutos de *Coffea arabica* (L.) e no solo, obtido após amplificação utilizando o par de *primers* 344GC/927r (A) e o par de *primers* 344GC/517r (B). 1: Amostra de café 40B, 2: Solo, HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605.

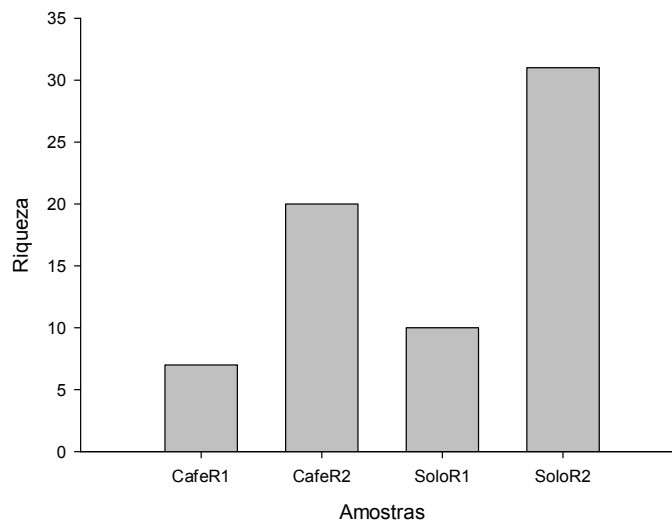


Figura 3: Comparação da Riqueza da comunidade de Archaea associada a frutos de café cereja e comunidades presentes no solo, utilizando os pares de *primers* 344GCf/927r (R1) e 344GC/517r (R2).

4.3. Diversidade de Archaea endofíticas em frutos de café

4.3.1. Análise da diversidade por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A análise da diversidade genética das comunidades de Archaea endofíticas foi feita utilizando-se os *primers* para a região V3 do rDNA 16S. Ao contrário dos estudos iniciais com a amostra 40B, as amostras de DNA extraídas por CORDERO (2008) só geraram produtos de amplificação visíveis na reação de *Nested-PCR* com os *primers* Arch344fCG/517r. Essa diferença entre as amostras foi atribuída às alterações realizadas no método de extração de DNA. Elas contribuíram para aumentar a recuperação de DNA de Archaea dos frutos de café na amostra 40B. A ausência de amplificação visível na primeira reação sugere uma baixa densidade populacional de Archaea nos frutos de café que, associada ao método de extração de DNA, pode dificultar sua detecção baseada em amplificação de DNA.

Em estudo da diversidade microbiana associada a raiz de milho, organismos do domínio Archaea só foram identificados após uma reação de *Nested-PCR* (CHELIUS & TRIPLETT, 2001). A utilização de PCR quantitativo para diversos grupos microbianos durante a decomposição de folhas também mostrou menor incidência de Archaea, comparada à dos outros domínios (MANERKAR et al., 2008). Em alguns ambientes, como no solo (LEINIGER et al., 2006) e nos oceanos (HERNDL et al., 2005), a diversidade e abundância de alguns grupos de Archaea podem superar a de outros micro-organismos, mas na maioria dos ambientes não existe informações acerca dessa abundância (ALLER & KEMP, 2008).

O padrão de migração dos fragmentos de DNA no gel (Figura 4) mostrou a existência de diferentes UTOs de arqueas associadas aos frutos de café, sendo diverso o padrão de distribuição das UTOs nas cultivares e altitudes estudadas. A estimativa da Riqueza mostrou que a amostra com maior número de UTOs foi a 628, da cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m, com 21 UTOs, enquanto a amostra 646, da cultivar Catuaí Vermelho cultivada em altitude de 1189 m apresentou menor número, 14 UTOs, e estas foram as amostras com perfis mais distintos.

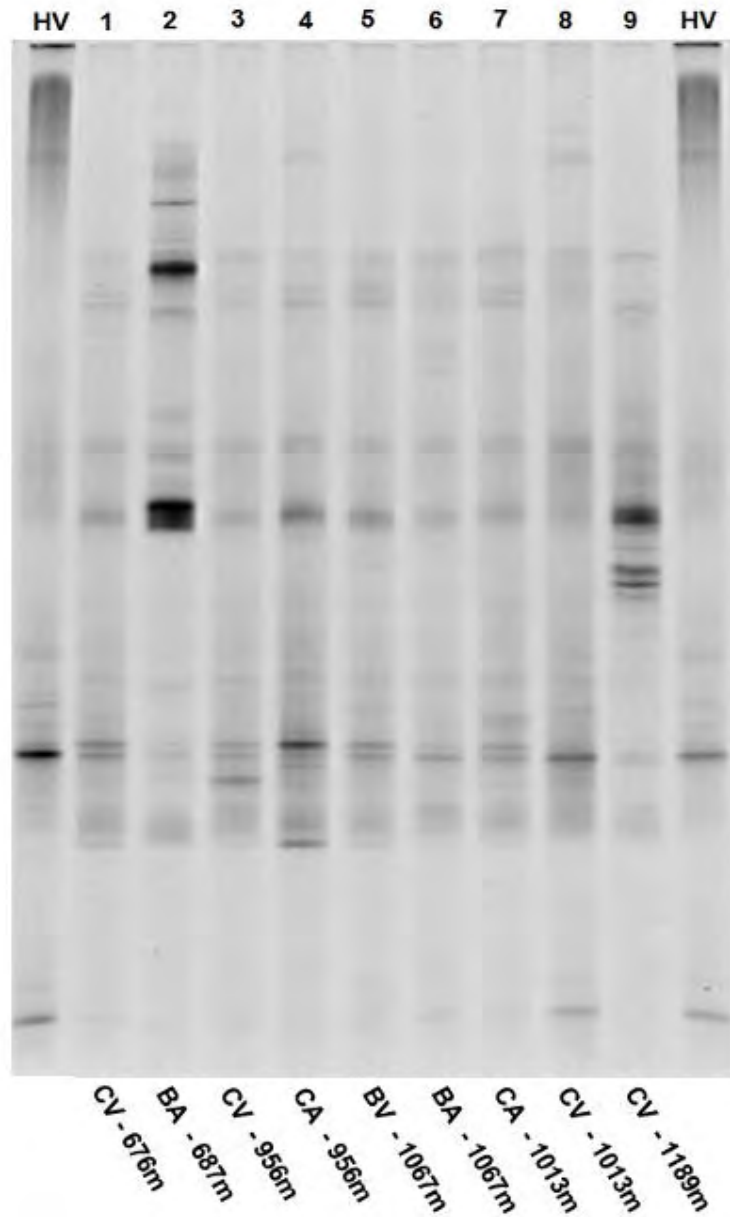


Figura 4: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de comunidades de Archaea endofíticas presentes em frutos cereja de quatro cultivares de *Coffea arabica* (L.) amostrados em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais. 1: Amostra 625, 2: Amostra 628, 3: Amostra 629, 4: Amostra 630, 5: Amostra 631, 6: Amostra 632, 7: Amostra 643, 8: Amostra 644, 9: Amostra 646, HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605. (CV) Catuaí Vermelho, (CA) Catuaí Amarelo, (BV) Bourbon Vermelho e (BA) Bourbon Amarelo.

Efeito similar da altitude sobre diversidade de bactérias endofíticas de filamentos do domínio Bacteria, nas mesmas amostras utilizadas no presente trabalho, já foi demonstrado (CORDERO, 2008; VALE, 2009).

Embora seja possível comparar diversidade pela variável Riqueza e pela análise dos perfis eletroforéticos em DGGE, há limitações da técnica que devem ser consideradas. Dependendo da diversidade microbiana de uma amostra, ela pode não ser completamente observada em um único gel, uma vez que diferentes sequências podem migrar para a mesma posição do gel, sendo necessário o ajuste das condições dos experimentos (SEKIGUCHI et al., 2001). Além disso, um único micro-organismo possui vários *operons rrrn*, e cada um desses pode estar sujeito a diferentes pressões evolutivas e apresentar taxas de mutações distintas. Por consequência, a PCR-DGGE de um isolado não corresponderá necessariamente a uma única banda no gel.

A análise de agrupamento dos perfis eletroforéticos (Figura 5) mostrou que as amostras com perfis visuais mais distintos, 628 e 646, apresentaram 40% de similaridade (Tabela 3) entre si e formaram um grupo separado das demais, com as quais compartilham menos de 40% de similaridade (Tabela 3). Essas duas amostras são originárias de locais e altitudes diferentes, não havendo uma relação perceptível que explique tal agrupamento.

Para as demais amostras, a análise mostrou o agrupamento das amostras coletadas em altitudes superiores a 1000 m, independentemente da cultivar e do local de coleta, compartilhando valores de similaridade, na maioria dos casos, superiores a 70% (Tabela 3). Amostras coletadas em altitudes inferiores a 1000 m também formaram agrupamento com valores de similaridade superiores a 68% (Tabela 3). Dentre essas, as amostras coletadas no município de Araponga formaram um subgrupo com 77,42% (Tabela 3) de similaridade, separado da amostra coletada em Viçosa. A observada relação positiva entre Riqueza e altitude também ocorreu em estudo de diversidade de leveduras endofíticas nas mesmas amostras de café usadas nesse trabalho, utilizando análise de agrupamento (VALE, 2009) o autor também mostrou um agrupamento de UTOs das amostras de café dependente da altitude.

No geral, os valores de similaridades entre os perfis de arqueas endofíticas de amostras de café de diferentes variedades e localização foram superiores a 50% (Tabela 3), indicando certa homogeneidade entre as comunidades. Este resultado é similar ao encontrado por VALE (2009), no estudo de leveduras epifíticas e endofíticas nas mesmas amostras.

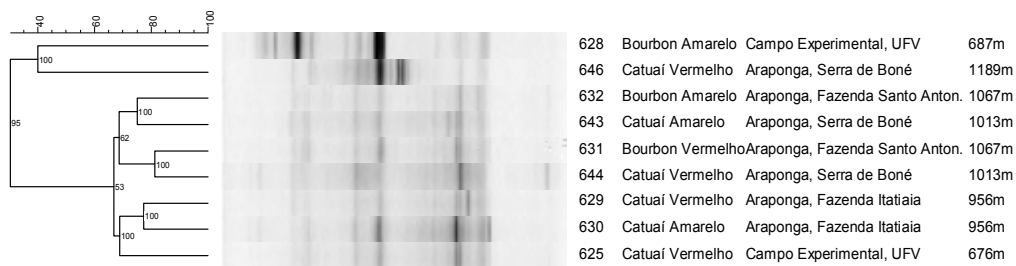


Figura 5: Comparação estatística dos perfis de DGGE baseados em fragmentos dos rDNAs 16S de comunidades de Archaea endofíticas presentes em frutos cereja de quatro cultivares de *Coffea arabica* (L.) amostrados em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais, utilizando o programa Bionumerics. Dados de amostragem são indicados. Escala de 40 a 100 indica o nível de similaridade. Os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação.

Tabela 3: Matriz de similaridade calculada pelo programa Bionumerics a partir da análise das imagens dos perfis de DGGE de fragmentos do rDNA 16S de comunidades de Archaea endofíticas presentes em frutos cereja de quatro cultivares de *Coffea arabica*, amostrados em diferentes altitudes na Zona da Mata Norte, Minas Gerais.

Altitude (m)	Amostras	628	646	632	643	631	644	629	630	625
687	628	100								
1189	646	40	100							
1067	632	21,63	26,67	100						
1013	643	27,03	26,67	75	100					
1067	631	26,32	38,71	66,67	78,79	100				
1013	644	33,33	34,49	58,07	70,97	81,25	100			
956	629	40	35,72	60	73,33	70,97	62,07	100		
956	630	36,85	25,81	60,61	72,73	76,47	62,5	77,42	100	
676	625	22,23	27,59	64,52	70,97	75	53,33	68,97	68,75	100

O perfil eletroforético da amostra de café 40B não foi incluído na análise de agrupamento em razão da diferença no protocolo de extração de DNA desta amostra, a partir do qual foi obtido um produto de amplificação na primeira reação de PCR.

Este trabalho demonstrou a existência de diversidade de Archaea endofíticas associadas a frutos de café em diferentes cultivares e altitudes. Os resultados indicam a possível relação entre comunidade endofítica e cultivar, e complementa os estudos de diversidade microbiana desenvolvidos no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Federal de Viçosa.

4.3.2. Análise da diversidade de Archaea endofíticas de frutos de café pela construção e sequenciamento de bibliotecas de rDNA 16S

Bibliotecas de rDNA 16S de três amostras de café foram construídas e 63 clones foram sequenciados. As bibliotecas 628 e 646, foram construídas com o *amplicon* obtido na segunda reação de *Nested-PCR*, e a biblioteca 40B com o produto da primeira reação. Os resultados das análises das sequências (Tabela 4) demonstram que todas foram relacionadas com sequências de Archaea depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As árvores filogenéticas construídas foram usadas para agrupar sequências com valores de *bootstrap* maiores que 97%, as quais foram consideradas como sequências de mesma identidade (Figuras 6, 7 e 8).

O percentual de cobertura de cada biblioteca (Tabela 4) e as curvas de rarefação (Figura 9) permitem fazer inferências sobre a diversidade de Archaea nos frutos de café.

A curva da biblioteca 40B, cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 936 m, mostra uma tendência ao *plateau*, enquanto a curva da biblioteca 646, cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 1189 m, claramente entrou neste estágio (Figura 9). A curva da biblioteca 628, cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m, embora não tenha alcançado o *plateau*, apresenta uma pequena inclinação (Figura 9). O declínio na taxa de detecção de sequências, mostrado pelas curvas, indica que grande parte da diversidade presente nas bibliotecas foi detectada.

O cálculo da cobertura de uma biblioteca mostra a quantidade estimada de quão bem o tamanho da amostra reflete a aparente diversidade dentro da biblioteca de clones (CHELIUS & TRIPLETT, 2001). A biblioteca 40B foi a que apresentou a menor cobertura (84,21%), seguida pela biblioteca 628 (96%) e pela biblioteca 646,

com 100% de cobertura, uma vez que no sequenciamento dos 19 clones não foram encontradas sequências únicas. Embora seja o menor valor encontrado, a cobertura da biblioteca 40B é alta, e complementa a análise da curva de rarefação, sugerindo que a análise de um maior número de clones poderá resultar em um pequeno número de novas UTOs encontradas.

O sequenciamento de 19 clones da biblioteca 40B mostrou a presença de sete sequências diferentes (Tabela 4), a maioria (73,68%) relativa a indivíduos pertencentes ao filo Euryarchaeota e similares a sequências de arqueas halofílicas (Tabela 4, Figura 10). Além dessas, outras duas sequências pertencentes ao mesmo filo foram identificadas, apresentando identidade com sequências da arquea metanogênica *Methanobrevibacter woesei* e com a termófila *Thermoplasma* sp. (Tabela 4). Somente duas sequências, representando 15,8% do total de clones sequenciados desta biblioteca, corresponderam às sequências pertencentes ao filo Crenarchaeota, originárias do solo, clone 40B.16, e de sedimentos marinhos, clone 40B.14 (Tabela 4, Figura 10).

O sequenciamento de 25 clones da biblioteca 628 mostrou a presença de apenas duas sequências, ambas pertencentes ao filo Euryarchaeota (Tabela 4, Figura 11). A maioria dos clones, 96%, correspondeu a uma sequência (Clone 628.4) com 93% de identidade com um clone isolado de sedimento permanentemente congelado (Tabela 4). A segunda sequência, representada pelo clone 628.15, compartilha 99% de identidade com a sequência de uma haloarquea não cultivável de um lago salino na Argélia (Tabela 4).

Os 19 clones da biblioteca 646 distribuem-se entre três diferentes sequências. Duas destas, representadas pelos clones 646.7 e 646.9, tiveram 98% de identidade com sequências de arqueas halofílicas (Tabela 4). A terceira apresentou 90% de identidade com arquea identificada em chaminés hidrotérmicas no Japão (Tabela 4).

Tabela 4: Similaridade entre as sequências de rDNA 16S de endofíticos de frutos de café e sequências disponíveis no NCBI¹

Amostra ²	Cobertura da biblioteca	Clone	Número de clones (% do total de clones)	Sequência mais similar no banco de dados	% Identidade	Número de acesso ¹
40B	84,21%	40B.2	8 (42,10%)	<i>Halococcus</i> sp. BIGigoW09	99	AM902587.1
		40B.8	3 (15,79%)	<i>Haloferax</i> sp. FIB210_9	96	EU308271.1
		40B.10	3 (15,79%)	<i>Halobacterium volcanii</i>	99	K00421.1
		40B.14	2 (10,54%)	Uncultured crenarchaeote clone D_C01	99	AY454553.1
		40B.13	1 (5,26%)	<i>Methanobrevibacter woesei</i> strain CH1117	97	DQ445717.1
		40B.16	1 (5,26%)	Uncultured archaeon clone Arc-DB81	98	FJ584387.1
		40B.24	1 (5,26%)	Uncultured <i>Thermoplasma</i> sp	97	AM292020.1
628	96%	628.4	24 (96%)	Uncultured archaeon TS-AR3	93	EF090653.1
		628.15	1 (4%)	Uncultured haloarchaeon clone ARDARCWH21	99	EU869374.1
646	100%	646.7	8 (42,11%)	<i>Halococcus</i> sp. CH8K	98	FJ686132.1
		646.11	6 (31,58%)	Uncultured archaeon	90	AB329758.1
		646.9	5 (26,32%)	Uncultured haloarchaeon clone ARDARCWH21	98	EU869374.1

¹National Center for Biotechnology Information

² Amostra 40B – Cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 936 m
 Amostra 628 – Cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m
 Amostra 646 – Cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 1189 m

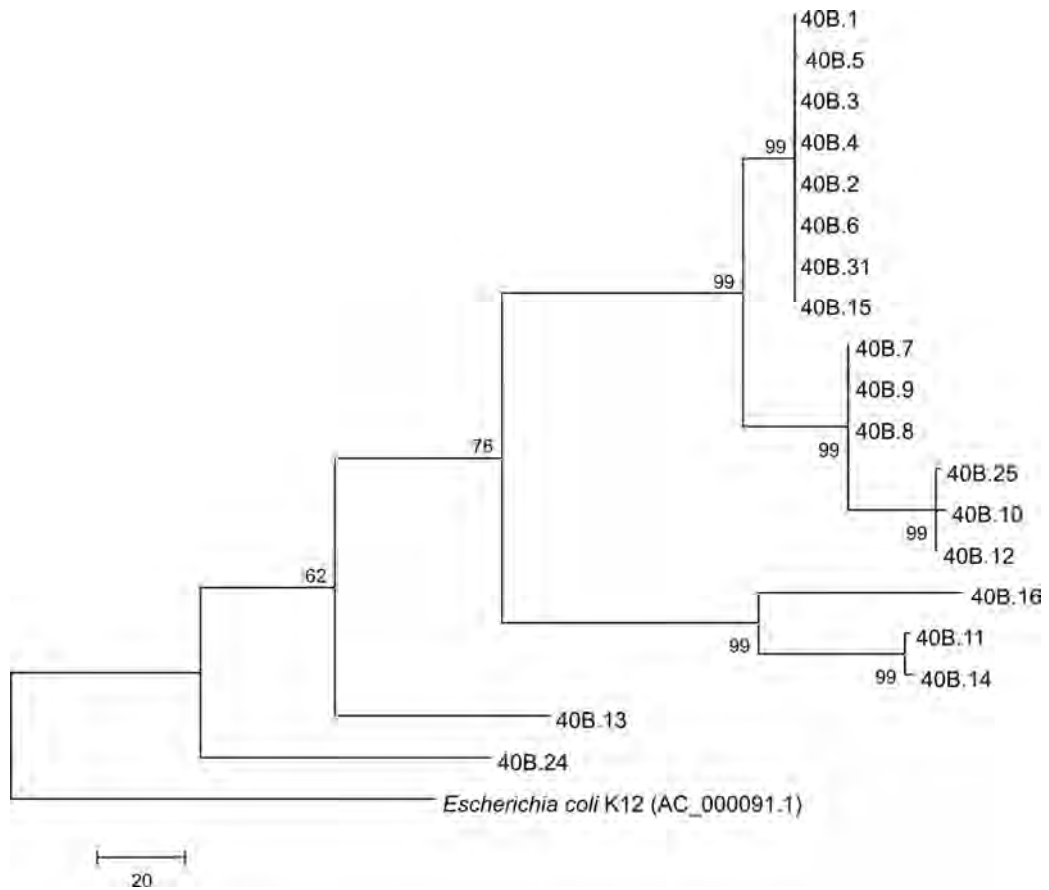


Figura 6: Relação filogenética, inferida pelo método da Máxima Parcimônia, dos clones sequenciados da biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 40B, cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 936 m. Os valores nos pontos de ramificações representam o valor de *bootstrap* para 1000 replicações. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.

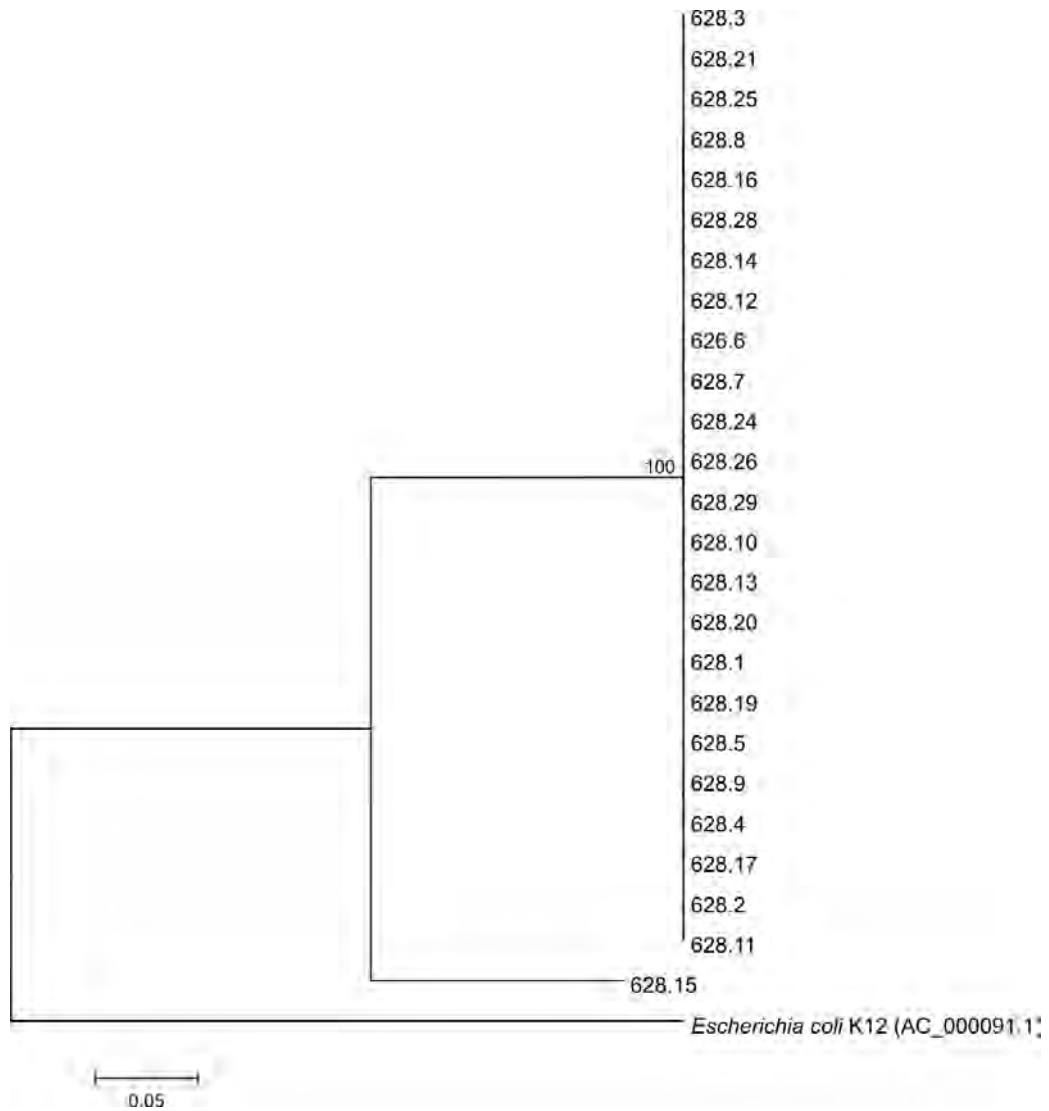


Figura 7: Relação filogenética, inferida pelo método de *Neighbour-Joining*, dos clones sequenciados da biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arábica* L.), amostra 628, cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m. Os valores nos pontos de ramificações representam o valor de *bootstrap* para 1000 replicações. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.

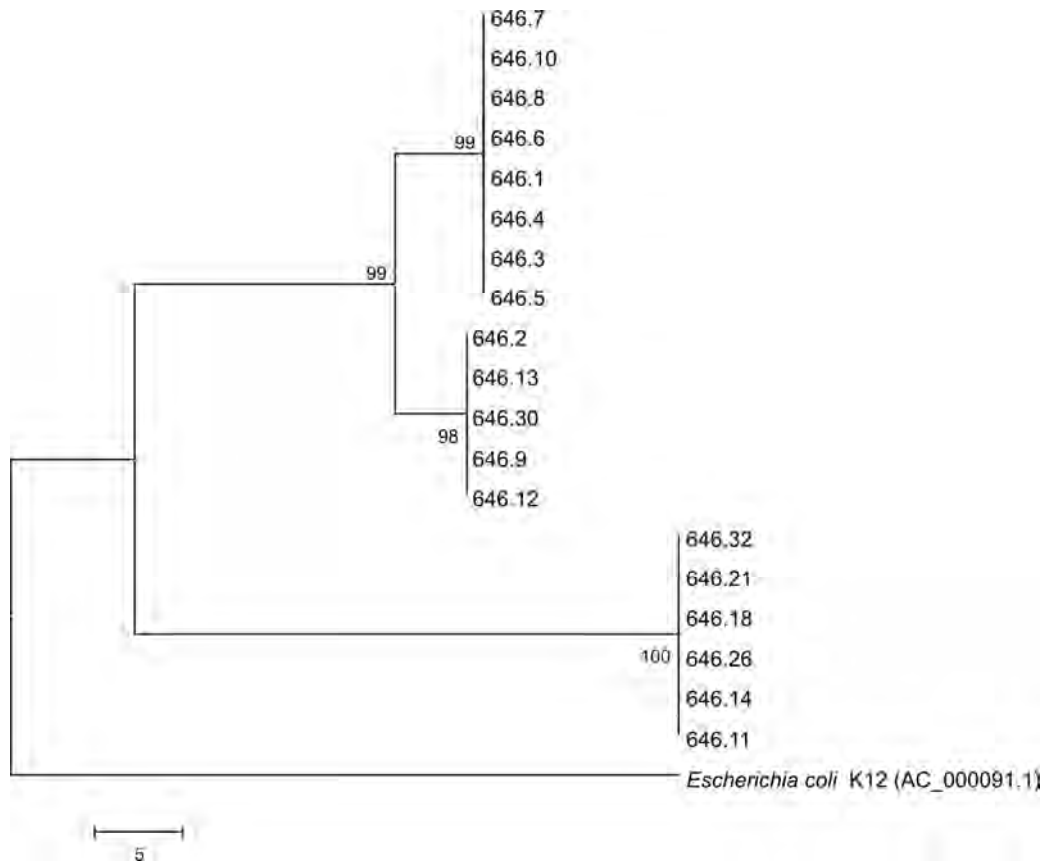


Figura 8: Relação filogenética, inferida pelo método da Máxima Parcimônia, dos clones sequenciados da biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 646, cultivar Catuaí Vermelho em altitude de 1189 m. Os valores nos pontos de ramificações representam o valor de *bootstrap* para 1000 replicações. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.

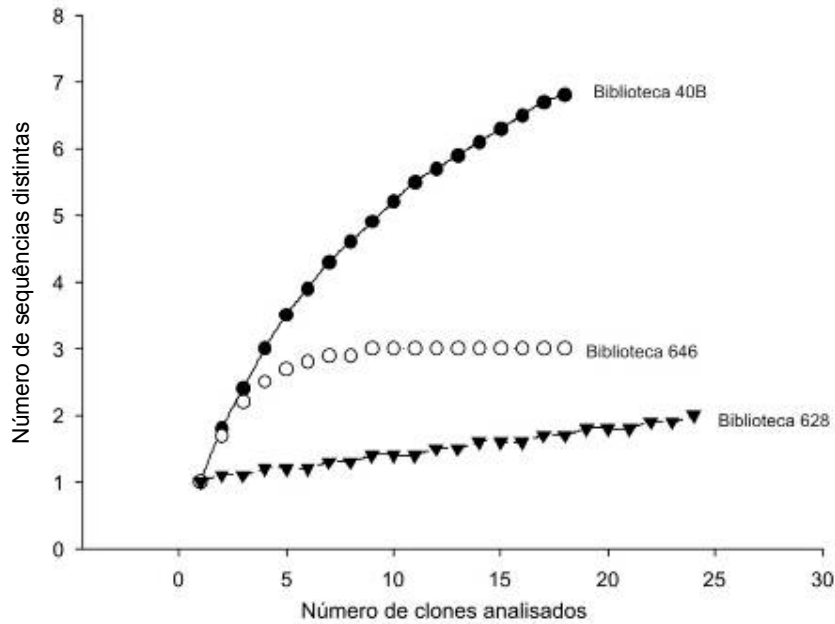


Figura 9: Curvas de rarefação representando a diversidade de seqüências esperada de clones de rDNA 16S para cada biblioteca construída. Biblioteca 40B: Catuaí Vermelho – 946 m; Biblioteca 628: Bourbon Amarelo – 687 m; Biblioteca 646: Catuaí Vermelho – 1189 m

A comparação das bibliotecas construídas neste trabalho com a biblioteca de rDNAs 16S de bactérias, construída por SANTOS (2008) revela, no caso da biblioteca 40B, uma maior diversidade de Archaea do que de bactérias do filo Firmicutes, enquanto ao comparar as bibliotecas 628 e 646 e a de Firmicutes, o número de seqüências encontradas foi maior na biblioteca de origem bacteriana.

A construção de bibliotecas de rDNA 16S é o método mais utilizado para analisar a diversidade microbiana em diferentes ambientes. A análise de 114 bibliotecas de Archaea e 45 bibliotecas bacterianas construídas a partir de amostras dos mesmos ambientes mostrou que apenas em cinco casos a diversidade de Archaea superou a de Bactéria (ALLER & KEMP, 2008). A análise também mostrou que as bibliotecas de Archaea, embora tenham menor número de clones do que as de Bactéria, na maioria das vezes são grandes o suficiente para representar a diversidade no ambiente. Isto mostra que, ao contrário do observado para bactérias, o número de filotipos encontrados em uma biblioteca de rDNA 16S de Archaea não é correlacionado com o tamanho da biblioteca. A ausência de

trabalhos com endofíticos do café não permite fazer comparações com esses níveis de detalhes.

As bibliotecas construídas neste trabalho são compostas por relativamente poucos clones, mas foram grandes o suficiente para cobrir a maior parte da diversidade de Archaea presentes em frutos de café cereja, e são os primeiros relatos de Archaea em associação com plantas da espécie *Coffea arabica* L.

4.3.3. Filogenia de Archaea presentes em frutos de café

Foram construídas duas árvores filogenéticas para estabelecer a relação filogenética das 12 sequências encontradas nas três bibliotecas. Foi necessária a separação das unidades encontradas na biblioteca 40B daquelas encontradas nas bibliotecas 628 e 646 em razão da diferença no tamanho das sequências geradas. Para as duas últimas só foi observado produto de amplificação na segunda reação de *Nested-PCR* e, embora as sequências sejam relativamente pequenas, a reconstrução filogenética foi possível por compreenderem uma região hipervariável do rDNA 16S de Archaea.

Apenas duas unidades da biblioteca 40B agruparam com sequências pertencentes ao filo Crenarchaeota (Figura 10), ao qual pertence grande parte das sequências de Archaea de amostras ambientais mesófilas (SCHELEPER et al., 2005). O clone 40B.14 agrupou com sequências originárias de ambientes marinhos, enquanto o clone 40B.16 formou um *cluster* com outras duas sequências amplificadas a partir de solos em diferentes regiões do planeta (Figura 10).

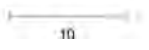
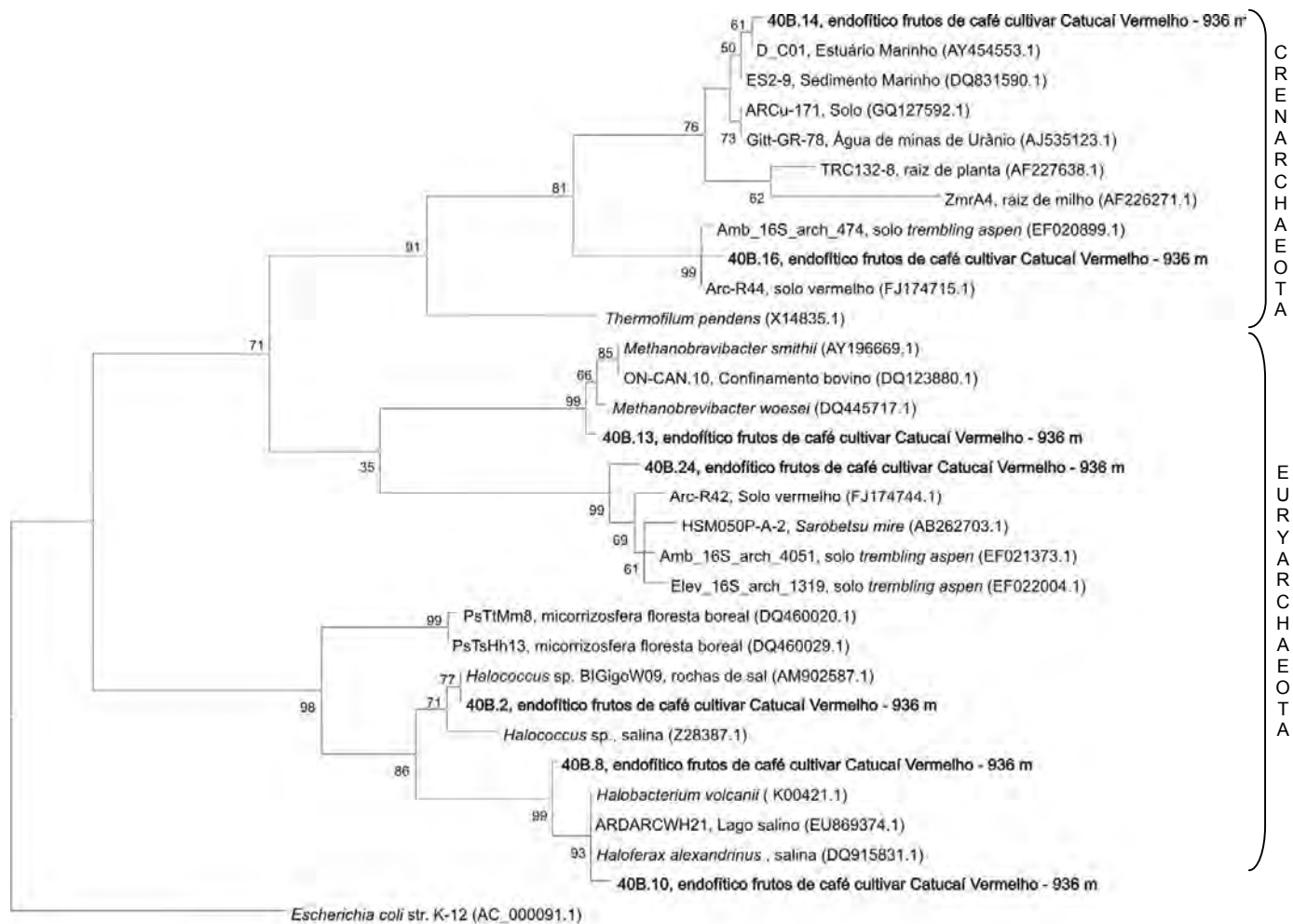


Figura 10: Reconstrução filogenética, inferida pelo método da Máxima Parcimônia, das sequências identificadas na biblioteca de rDNA 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostra 40B, cultivar Catucaí Vermelho em altitude de 936 m. As sequências encontradas neste estudo estão em negrito. Os números de acesso de cada sequência extraída do NCBI são mostrados entre parênteses. Valores de *bootstrap* maiores que 50 são mostrados nos nós de ramificação. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.

As sequências correspondentes ao filo Euryarchaeota distribuíram-se em três diferentes grupos (Figura 10). O clone 40B.13 agrupou com sequências de arqueas metanogênicas, formando um clado distinto. O clone 40B.24, que apresentou 97% de identidade com uma sequência de *Thermoplasma* sp. não cultivado, agrupou com sequências amplificadas de amostras ambientais e que também estão associadas ao grupo de euryarqueotas termófilos (SCHELEPER et al., 2005; LESAULNIER et al., 2008). A maioria das sequências recuperadas da biblioteca 40B (73,68%), correspondentes a três unidades distintas, pertence à ordem Halobacteriales. As sequências formaram um grupo com gêneros de arqueas hiperhalofílicas, como *Halococcus*, *Halobacterium* e *Haloferax*, separado do grupo de arqueas desta mesma ordem, identificadas na região da micorrizosfera de espécies de *Pinus* (BOMBERG & TIMONEM, 2007).

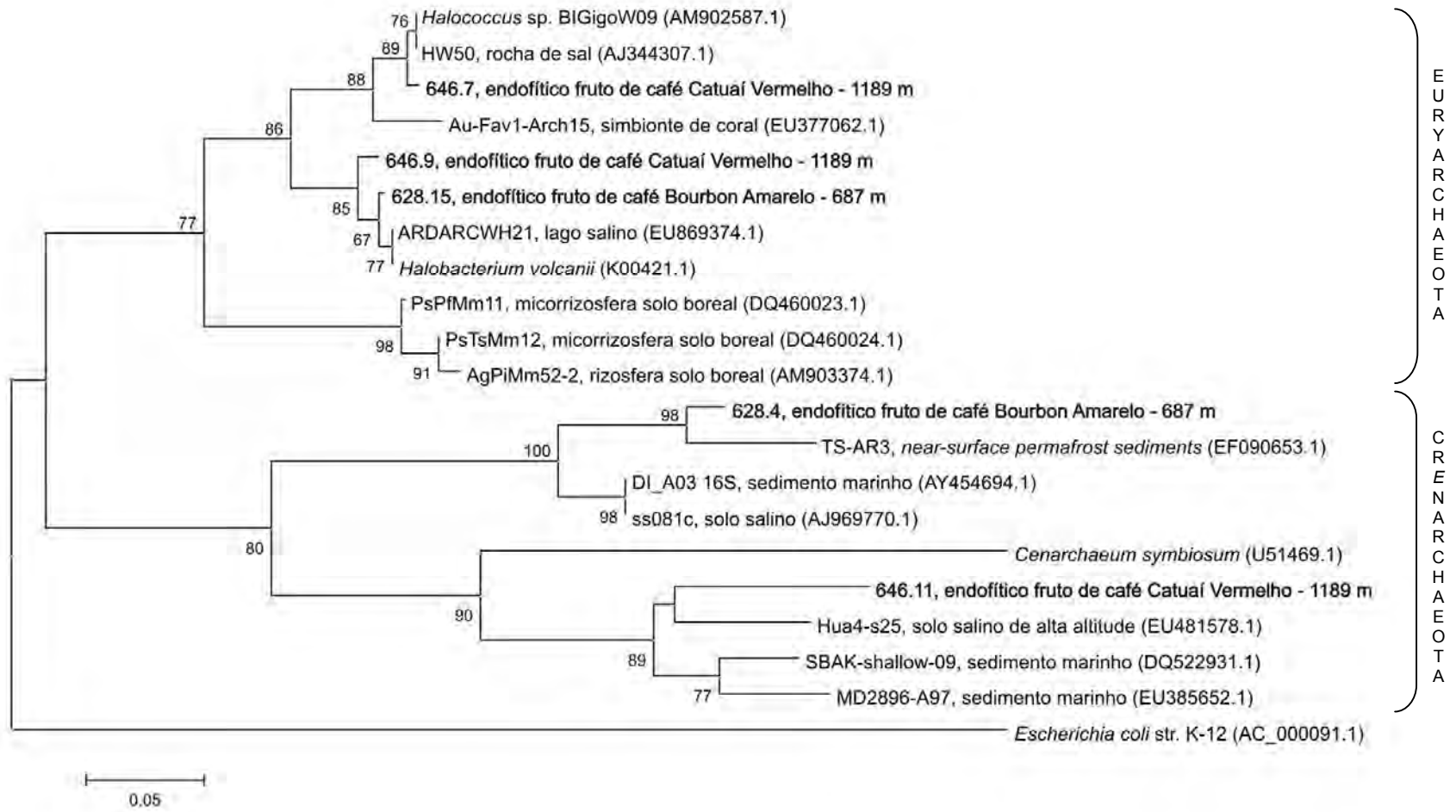


Figura 11: Reconstrução filogenética, inferida pelo método de *Neighbour-Joining*, das sequências identificadas nas bibliotecas de rDNAs 16S de Archaea presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), amostras 628, cultivar Bourbon Amarelo em altitude de 687 m, e 646, cultivar Catuaí Vermelho e altitude de 1189 m. As sequências encontradas neste estudo estão em negrito. Os números de acesso de cada sequência extraída do NCBI são mostrados entre parênteses. Valores de *bootstrap* maiores que 50 são mostrados nos nódulos de ramificação. *Escherichia coli* K-12 foi utilizada como grupo externo.

As relações filogenéticas das sequências identificadas nas bibliotecas 628 e 646 (Figura 11) mostram, de forma similar ao observado para a biblioteca 40B, que o maior número das unidades nessas bibliotecas pertence ao filo Euryarchaeota, com três clones (628.15, 646.7 e 646.9) agrupados com sequências de arqueas de ambientes halofílicos, como lagos salinos e rochas de sal.

O clone 628.4, único representante do filo Crenarchaeota encontrado na biblioteca 628, agrupou, com altos valores de *bootstrap*, com sequências de arqueas de ambientes terrestres e marinhos, especialmente com uma sequência identificada em sedimento permanentemente congelado.

O clone 646.11 foi o único representante do filo Crenarchaeota identificado na biblioteca 646 e agrupou com sequências de arqueas de amostras marinhas, formando subgrupo separado com uma sequência encontrada em um pântano salino de alta altitude.

As sequências de arqueas identificadas nas três bibliotecas foram agrupadas com outras de diversos ambientes ao redor do planeta, indicando a distribuição global dos vários grupos de Archaea. Como apenas uma fração dos representantes deste domínio é cultivável, o papel fisiológico de Archaea no ambiente ainda é pouco conhecido. A maior parte das sequências obtidas neste trabalho agrupou com sequências, ou grupos de sequências, de arqueas cultiváveis, como as halofílicas e as metanogênicas, cujo metabolismo é relativamente conhecido. Organismos de um mesmo grupo filogenético possuem propriedades semelhantes (BOMBERG & TIMONEM, 2007) e, possivelmente, as sequências relacionadas a metanogênicos e halofílicos também o são em frutos de café.

Arqueas metanogênicas são micro-organismos anaeróbios, abundantes no rúmen bovino, no intestino de diversos animais e também em plantações de arroz, onde contribuem com grande parte do metano emitido dos campos alagados. Entretanto, dados genômicos indicam a presença de várias enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e açúcares, sugerindo uma capacidade adaptativa a ambientes ricos em compostos orgânicos, como a rizosfera (CONRAD et al., 2006) e neste caso, tecidos internos dos frutos de café. Linhagens de arqueas metanogênicas endofíticas já foram identificadas em raízes de arroz (SUN et al., 2008), comprovando a capacidade de endossimbiose dessas arqueas também com plantas.

As sequências relacionadas às arqueas halofílicas representaram cerca de 42% de todos os clones sequenciados neste trabalho. Arqueas isoladas de ambientes hipersalinos requerem uma concentração de sal de pelo menos 1 M, e o controle da salinidade do citoplasma é feito por diferentes estratégias (MARTIN et al., 1999). Arqueas que bombeiam K^+ para o interior celular requerem uma adaptação da maquinaria celular às altas concentrações de sais. Contudo, a estratégia mais disseminada na natureza é a haloadaptação baseada no acúmulo ou biossíntese de solutos compatíveis, que não exige muitas adaptações celulares, uma vez que altas concentrações desses solutos não interferem significativamente na atividade enzimática (OREN, 2008). Existem dois principais tipos de solutos compatíveis utilizados por arqueas: açúcares e poliálcoois; e α e β aminoácidos (MÜLLER et al., 2005). Alguns desses solutos são sintetizados pelos organismos, enquanto outros podem ser transportados pelas células a partir do meio extracelular.

A presença de arqueas, tanto em ambientes salinos quanto em ambientes com altas concentrações de açúcares, como o café, exige mecanismo de controle da osmolaridade do citoplasma. As diferentes maneiras de controle podem refletir as pressões evolutivas às quais as arqueas são submetidas no ambiente. As concentrações de sais nos frutos de café não são expressivas, mas existe uma alta concentração de polissacarídeos, que varia de 50 a 55% do peso seco do fruto (DE CASTRO & MARRACINI, 2006). Muitos dos compostos utilizados como solutos compatíveis por arqueas, especialmente a sacarose, estão presentes no fruto de café, o que poderia suportar a presença destes micro-organismos neste nicho ecológico.

A origem dos micro-organismos endofíticos em frutos de café é desconhecida, mas existem várias possíveis rotas de entrada, e as arqueas identificadas podem ser originárias de várias destas. Por exemplo, metanogênicas

podem estar presentes no intestino de insetos que pousam sobre as flores da planta. Ainda, *C. arabica* é uma espécie que estabelece interações micorrízicas na região da rizosfera, e a presença de vários grupos de arqueas, dentre os quais as halofílicas, na região da micorrizosfera de outras plantas, é conhecida (BOMBERG & TIMONEM, 2007; BOMBERG & TIMONEM, 2009). A identificação de organismos considerados extremófilos na rizosfera pode ser explicada pelas condições existentes nesse ambiente. A liberação de exudados pela raiz eleva a osmolaridade, enquanto a evapotranspiração das plantas provoca uma forte variação da atividade de água na rizosfera durante o dia (PAPENDICK & CAMPBELL, 1975), tornando este um ambiente que poderia ser considerado extremo. Entretanto, a ampla distribuição de vários grupos de Archaea nos diversos ambientes aumenta o número de possíveis origens destes micro-organismos endofíticos em frutos de café.

Este trabalho demonstrou a presença de diferentes grupos de Archaea ocupando, endofiticamente, tecidos internos de frutos de café de diferentes cultivares amostradas em três altitudes. O sequenciamento das bibliotecas de rDNAs 16S revelou a predominância de genes relacionados a arqueas halofílicas nas bibliotecas 40B e 646, enquanto na biblioteca 628 houve maior abundância de sequências relacionadas a organismos não cultiváveis do filo Crenarchaeota.

A ausência de estudos fisiológicos de arqueas não cultiváveis, especialmente de ambientes mesófilos, limita a predição da fisiologia desses micro-organismos e a determinação do seu papel no interior dos frutos de café. Contudo, estudos metagenômicos da comunidade microbiana associada a frutos de café ajudarão a identificar genes de Archaea e estabelecer relações entre a presença de determinados micro-organismos, composição dos frutos e qualidade final da bebida.

4.4. Diversidade e sucessão de Archaea durante o processo de seca natural dos grãos

As amostras de DNAs metagenômico de grãos de café despulpados, coletados durante o processo de secagem natural em terreiro revestido com cimento, apresentaram contaminação com polissacarídeos e polifenóis, sendo necessária a etapa de purificação pelo kit Wizard® Genomic DNA Purification. O protocolo de extração utilizado (CORDERO, 2008) com as adaptações nas etapas de lise celular, apesar da adição de proteases ao tampão de lise, não resultou em produto de amplificação na primeira reação de PCR com os *primers* Arch344fGC/927r. A ausência de amplificação pode ter sido resultado da menor pureza do DNA, uma vez que não foram feitas as etapas de desproteinização com Fenol:Fenol-Clorofórmio:Clorofórmio, e, conseqüentemente, algum contaminante presente alterou a eficiência de amplificação. Outra hipótese seria a de que o processo de despulpamento, quando são retirados o exocarpo e mesocarpo dos frutos, retirou parte da microbiota presente, diminuindo a concentração de archaea nas amostras e assim, resultando em uma menor recuperação de DNA.

A análise visual do gel de DGGE (Figura 12) permitiu a identificação de algumas bandas dominantes, presentes em todos os dias coletados, enquanto outras estão presentes em determinados dias e ausentes em outros. Esta dinâmica de aparecimento e desaparecimento de UTOs durante todos os dias de secagem mostra que a população de Archaea é influenciada por fatores que variam durante o processo. O cálculo da variável Riqueza (Figura 13) mostrou um maior número de UTOs a partir do sétimo dia, indicando um aumento da diversidade de Archaea presente na metade final do processo de secagem. O menor número de UTOs, encontrado para o dia 11 pode ser atribuído a menor intensidade do produto de amplificação (Dados não mostrados), resultando em bandas fracas no gel de DGGE, imperceptíveis para o programa. Para a confirmação da prevalência de maior Riqueza na metade final da secagem será necessária a repetição deste experimento, mas isto não limitou a interpretação dos resultados.

A análise de agrupamento (Figura 14) separou as amostras em dois grandes grupos. O maior deles é formado pelas amostras compreendidas entre o primeiro e o nono dia, sendo que a maior similaridade foi encontrada entre os dias um e três, que formaram um subgrupo com 71,43% de similaridade (Tabela 5). Apesar do número de UTOs do nono dia ser superior ao dos dias iniciais de secagem, esta amostra agrupou com os primeiro e terceiro dias, com similaridade próxima a 60% (Tabela 5). No ramo mais externo deste grupo está o sétimo dia, a partir do qual o

número de UTOs aumenta. O segundo grupo é formado pelos últimos dias amostrados, indicando diferença significativa entre a população do início e término da secagem, também mostrado pela diferença no número de UTOs. Os valores de similaridades compartilhados entre os dias iniciais são maiores do que os compartilhados pelos últimos dias, uma indicação de que ao final do processo a população ainda não havia se estabilizado.

Os resultados obtidos neste trabalho são, em parte, similares aos encontrados no estudo da sucessão de leveduras (VALE, 2008) durante a secagem dos grãos nas mesmas amostras. Nesse trabalho foi verificado que a comunidade de leveduras nos primeiros dias é distinta da encontrada nos últimos dias de secagem. A avaliação da diversidade de Archaea também encontrou uma variação entre a população inicial e final durante a fermentação do Kimchi, um alimento em conserva de origem coreana (CHANG et al., 2008).

Este é o primeiro estudo da diversidade e sucessão de Archaea durante a secagem do café. Vários tipos de fermentações podem ocorrer durante esse processo, influenciando na qualidade final da bebida. A grande variação de organismos pertencentes aos três domínios durante esse processo sugere a presença de populações ativas e sujeitas às variações das condições ambientais, tais como umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Entretanto, o papel de cada grupo microbiano e a real influência na qualidade da bebida precisam ser avaliados.

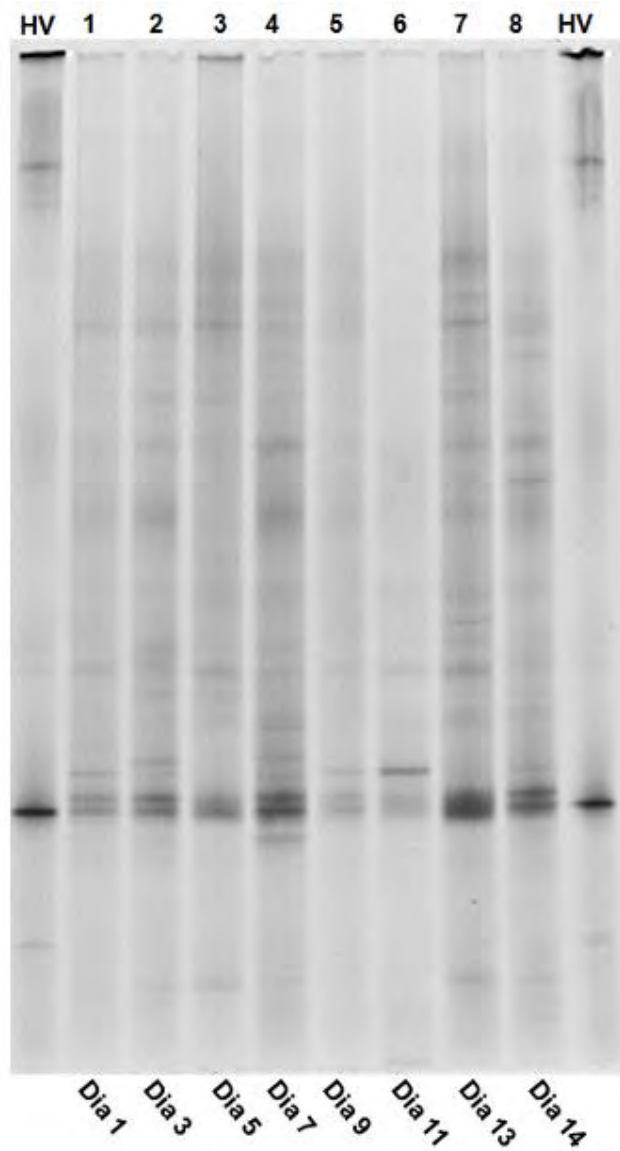


Figura 12: Perfis eletroforéticos de DDGE baseado em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade de Archaea associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despolpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido com cimento. HV: *Haloferax volcanii* ATCC 29605.

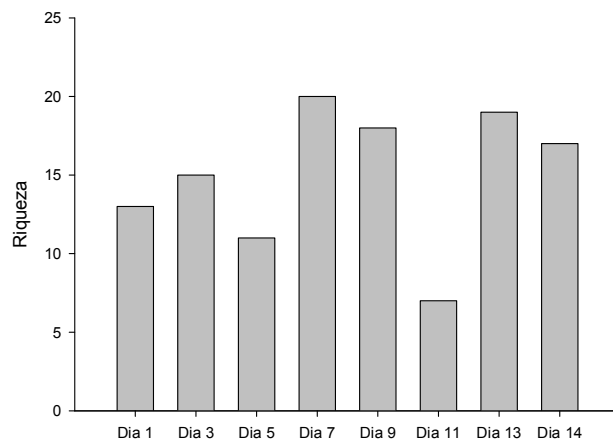


Figura 13: Riqueza das comunidades de Archaea endofíticas associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despolpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca em terreiro revestido com cimento.

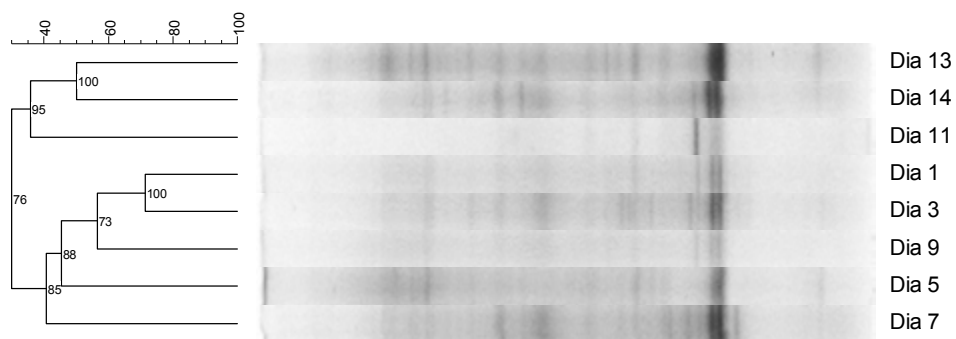


Figura 14: Comparação estatística dos perfis de DGGE baseados em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade de Archaea endofítica associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despolpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido com cimento, utilizando o programa Bionumerics. Escala de 40 a 100 indica o nível de similaridade. Os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nós de ramificação.

Tabela 5: Matriz de similaridade calculada pelo programa Bionumerics a partir da análise das imagens dos perfis de DDGE baseados em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade de Archaea associada a grãos de café (*Coffea arabica* L.) despolpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido com cimento.

Amostras	Dia 13	Dia 14	Dia 11	Dia 1	Dia 3	Dia 9	Dia 5	Dia 7
Dia 13	100							
Dia 14	50	100						
Dia 11	38,47	33,33	100					
Dia 1	43,75	40	20	100				
Dia 3	41,18	31,25	27,27	71,43	100			
Dia 9	43,25	22,86	24	64,52	48,49	100		
Dia 5	33,33	7,15	11,11	41,67	46,15	48,28	100	
Dia 7	46,15	27,03	29,63	42,43	51,43	36,85	32,26	100

5. CONCLUSÕES

A presença de Archaea em frutos de plantas é demonstrada pela primeira vez em *Coffea arabica* L., em frutos no estágio cereja e durante o processo de seca natural dos grãos despolidos.

A modificação do protocolo de extração de DNA metagenômico de frutos de café, adicionando-se proteases para a lise de células microbianas, propiciou melhor recuperação de DNA de Archaea.

A melhor resolução da diversidade de Archaea, por DGGE, é obtida quando se utiliza a região V3 do rDNA 16S.

A análise do gel de DGGE com o uso do programa Bionumerics mostra que a diversidade das populações de Archaea em quatro cultivares de *C. arabica* é dependente da altitude da lavoura.

As sequências de 63 clones de bibliotecas de rDNA 16S de três cultivares de *C. arabica* corresponderam a 12 diferentes UTOs.

As UTOs relacionadas às sequências de arqueas halofílicas dos gêneros *Halobacterium*, *Halococcus* e *Haloferax*, do filo Euryarchaeota, foram as dominantes. Outras sequências incluídas neste filo foram similares à de arquea metanogênica *Methanobrevibacter*, à da termófila *Thermoplasma* e às sequências de arqueas não cultiváveis de ambiente marinho.

As quatro sequências de rDNA 16S correspondentes a indivíduos³ do filo Crenarchaeota agruparam com sequências de arqueas não cultiváveis do solo e de ambientes marinhos.

No processo de seca natural dos grãos a sucessão em Archaea mostrou tendência de aumento do número de UTOs a partir do sétimo dia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIR, K.L.; SCHWARTZ, E. Evidence that ammonia-oxidizing Archaea are more abundant than ammonia-oxidizing Bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA. **Microbial Ecology**, v.56, p.420-426. 2008.
- ALBERS, S.V.; SZABO, Z.; DRIESSEN, A.J.M. Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.3918-3925. 2003.
- ALBERS, S.J.; SZABÓ, Z.; DRIESSEN, A.J.M. Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.5637-547. 2006.
- ALLEN, E.E.; BANFIELD, J.F. Community genomics in microbial ecology and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.489-498. 2005.
- ALLERS, T.; MEVARECH, M. Archaeal genetics – the third way. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.58-73. 2005.
- ALLER, J.Y.; KEMP, P.F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? **FEMS Microbiology Letters**, v.65, p.74-87. 2008.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410. 1990.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.J.; van ELSAS, J.D.; van VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914. 2002.
- ASCHERIO, A., ZHANG, S. M., HERNAN, M. A., KAWACHI, I., COLDITZ, G. A., SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Annual Neurology**, v.50, p.56-63. 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em 07 de maio de 2009.

- AUCHTUNG, T.A.; TAKACS-VESBACH, C.D.; CAVANAUGH, C.M. 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "*Korarchaeota*". **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5077-5082. 2006.
- AVALLONE, S.; GUIRAUD, J. P.; GUYOT, B., OLGUIN, E.; BRILLOUET, J. M. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.5556-5559. 2001.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W., PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65. 2000. (Publicação eletrônica)
- BACKMAN, P.A.; SIKORA, R.A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**, v.46, p.1-3. 2008.
- BANO, N.; RUFFIN, S.; RANSON, B.; HOLLIBAUGH, J.T. Phylogenetic Composition of Arctic ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic Assemblages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.781-789. 2004.
- BARNS, S.M.; FUNDYGA, R.E.; JEFFRIES, M.W.; PACE, N.R. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.1609-1613. 1994.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal Food Microbiology**, v.85, p.293-300. 2003.
- BINTRIM, S.B.; DONOHUE, T.J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G.P.; GOODMAN, R.M. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.277-282. 1997.
- BLÖCHL, E.; RACHEL, R.; BURGGRAF, S.; HAFENBRADL, D.; JANNASCHE, H.W.; STETTER, K.O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. **Extremophiles**, v.1, p.14-21. 1997.
- BOETIUS, A.; RAVENSCHLAG, K.; SCHUBERT, C.J.; RICKERT, D.; WIDDEL, F.; GIESEKE, A.; AMANN, R.; JÜRGENSEN, B.B.; WITTE, U.; PHANNKUCHE, O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **Nature**, v.9, p.623-626. 2000.
- BOMBERG, M.; TIMONEM, S. Distribution of Cren- and Euryarchaeota in scots pine mycorrhizospheres and boreal forest humus. **Microbial Ecology**, v.54, p.406-416. 2007.
- BOMBERG, M.; TIMONEM, S. Effect of tree species and mycorrhizal colonization on the archaeal population of boreal forest rhizospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.308-315. 2009.

- BORGNE, S.L.; PANIAGUA, D.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic Bacteria and Archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.74-92. 2008.
- BRADBURY, A.G.W.; HALLIDAY, D.J. Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38. p.389-392. 1990.
- BROCHIER, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. An emerging phylogenetic core of Archaea: phylogenies of transcription and translation machineries converge following addition of new genome sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v.5, p.36. 2005.
- BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRA, P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.245-252. 2008.
- BURGHARDT, T.; NÄTHER, D.J.; JUNGLAS, B.; HUBERAND, H.; RACHEL, R. The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic archaeum *Ignococcus hospitalis*: a novel pore-forming complex. **Molecular Microbiology**, v.63, p.166-176. 2007.
- CASANUEVA, A.; GALADA, N.; BAKER, G.C.; GRANT, W.D.; HEAPHY, S.; JONES, B.; YANHE, M.; VENTOSA, A.; BLAMEY, J.; COWAN, D.A. Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. **Extremophiles**, v.12, p.651-656. 2008.
- CASE, R.J.; BOUCHER, Y.; DAHLLO, I.; HOLMSTROM, C.; DOOLITTLE, W.F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.278-288. 2007.
- CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.52, p.7-76. 2002.
- CHABAN, B.; NG, S.Y.M.; JARREL, K.F. Archaeal habitats-from the extreme to the ordinary. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, p.73-116. 2006.
- CHANG, H.W.; KIM, K.H.; NAM, Y.D.; ROH, S.W.; KIM, M.S.; JEON, C.O.; OH, H.M.; BAE, J.W. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.156-166. 2008.
- 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.
- CLEMENTINO, M.M.; FERNANDES, C.A.C.M.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; POLYCARPO, C.R.; MARTINS, O.B. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.141-151. 2007.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 01 de maio de 2009.
- CONRAD, R.; ERKEL, C.; LIESACK, W. Rice cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.262-267. 2006.
- CORDERO, F.P.C. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café**. 2008. 89f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEW, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.321-329. 2005.
- 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.
- DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v.22, p.1-18. 1998.
- DE PAULA, E. M. **Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DELONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.5685-5689. 1992.
- DELONG, E.F. Everything in moderation: archaea as “non-extremophiles”. **Current Opinion in Genetics e Development**, v.8, p.649-654. 1998.
- EGOROVA, K.; ANTRANIKIAN, G. Biotechnology. In: GARRET, R.A.; KLENK, H.S. (eds) **Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology**. Blackwell Publishing, p.295-321. 2007.
- FALB, M.; MÜLLER, K.; KÖNIGSMAIER, L.; OBERWINKLWS, T.; HORN, P.; von GRONAU, S.; GONZALEZ, O.; PFEIFFER, F.; BORNBERG-BAUER, E.; OESTERHELT, D. Metabolism of halophilic Archaea. **Extremophiles**, v.12, p.177-196. 2008.
- FARAH, A.; MONTERIO, M.C.; CALADO, V.; FRANCA, A.S.; TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v.98, p.373-380. 2006.
- FERRER, M.; GOLYSHINA, O.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P.N. Mining enzymes from extreme environments. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p.207-214. 2007.
- FORTERRE, P.; BROCHIER, C.; PHILIPPE, H. Evolution of the Archaea. **Theoretical Population Biology**, v.61, p.409-422. 2002a.
- FORTERRE, P. A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. **Trends in Genetics**, v.18, p.236-237. 2002b.

- FORTERRE, P.; GRIBALDO, S.; BROCHIER-ARMANET, C. Natural history of the Archaeal domain. In: GARRET, R.A.; KLENK, H.S. (eds) **Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology**. Blackwell Publishing, p.16-28. 2007.
- FRANCIS, C.A.; BEMAN, J.M.; JUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and Archaeal ammonia oxidation. **The ISME Journal**, v.1, p.19-27. 2007.
- FUNGARO, M.H.P.; VISSOTTO, P.C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L.A.; FURLANETO, M.C.; TANIWAKI, M.H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v.49, p.123-127. 2004.
- GENARI, R. **Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café**. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, v.345, p.60-63. 1990.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914. 1997.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v.5, p.R245-R249. 1998.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.669-685. 2004.
- HARDOIM, R.P.; van OVERBEEK, L.S.; van ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p.463-471. 2008.
- HECK, K.L.; VAN BELLE, G.; SIMBERLOFF, D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. **Ecology**, v.56, p.1489-1461. 1975.
- HENNING, K.; VILLFORTH, F. Experimentelle untersuchungen zur frage der bacteriesymbiose in hoheren pflanzen und ihre beeinflussung durch 'Leitemente'. **Biochem, Zeitschr**, v.305, p.299-309. 1940.
- HERNDL, G.J.; REINTHALER, T.; TEIRA, E.; van AKEN, H.; VETH, C.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep atlantic ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2303-2309. 2005.
- HERRMANN, M.; SAUNDERS, A.M.; SCHRAMM, A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.3279-3283. 2008.

- HESS, M. Thermoacidophilic proteins for biofuel production. **Trends in Microbiology**, v.10, p.414-419. 2008.
- 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.
- HUBER, H.; HOHN, M.J.; RACHEL, R.; FUCHS, R.; WIMMER, V.C.; STETTER, K.O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, v.417, p.63-67. 2002.
- HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, v.3, p.1-8. 2002.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). Disponível em <<http://www.ico.com>>. Acesso em 07 de maio de 2009.
- INOUE, H.; NOKIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v.96, p.23-28. 1990.
- JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMIREZ, L.E., TAPIA-HERNANDEZ, A., MASCARUA-ESPARZA, M.A., MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.3676-3683. 1997.
- JURGENS, G.; LINDSTROM, K.; SAANO, A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.803-805. 1997.
- KLAUDA, J.B.; SANDLER, S. Global distribution of methane hydrate in ocean sediment. **Energy & Fuels**, v.19, p.459-470. 2005.
- KOSHIRO, Y.; ZHENG, X-Q.; WANG, M-L.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* e *Coffea canephora* fruits. **Plant Science**, v.171, p.242-250. 2006.
- LA VECCHIA, C. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. **Journal of Hepatology**, v.42, p.444-446. 2005.
- LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.82, p.6955-6959. 1985.
- LEININGER, S.; URICH, R.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, v.442, p.806-889. 2006.
- LESAULNIER, C.; PAPAMICHAIL, D.; MCCORKLE, S.; OLLIVIER, B.; SKIENA, S.; TAGHAVI, S.; ZAK, D.; LELIE, D.V.D. Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. **Environmental Microbiology**, v.10, p.926-941. 2008.

- LI, X.; QIN, L. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.539-543. 2005.
- LIPP, J.S.; MORONO, Y.; INAGAKI, F.; HINRICHS, K.U. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. **Nature**, v.454, p.991-994. 2008.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; van DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.583-606. 2002.
- LÖHR, A.J.; LAVERMAN, A.M.; BRASTER, M.; van STRAALLEN, N.M.; RÖLING, W.F.M. Microbial communities in the world's largest acidic volcanic lake, Kawah Ijen in Indonesia, and in the Banyupahit river originating from it. **Microbial Ecology**, v.52, p.609-618. 2006.
- LOPEZ, P.; FORTERRE, P.; PHILIPPE, H. The root of the tree of life in the light of the covarion model. **Journal of Molecular Evolution**, v.49, p.496-508. 1999.
- MAGALHÃES, C.; BANO, N.; WIEBE, W.J.; HOLLIBAUGH, J.T.; BORDALO, A.A. Composition and activity of beta-Proteobacteria ammonia-oxidizing communities associated with intertidal rocky biofilms and sediments of the Douro River estuary, Portugal. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1239-1250. 2007
- MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V. Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next? **Genome Biology**, v.4, p.115. 2003.
- MANERKAR, M.A.; SEENA, S.; BARLOCHER, F. Q-RT-PCR for Assessing Archaea, Bacteria, and Fungi during leaf decomposition in a stream. **Microbiology Ecology**, v.56, p.467-473. 2008.
- MARCONE, M.F. Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. **Food Research International**, v.37, p.901-912. 2004.
- MARTIN, D.D.; CIULLA, R.A.; ROBERTS, M.F. Osmoadaptation in Archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1815-1825. 1999.
- 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.
- MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811. 1990.
- MOISSL, C.; RACHEL, R.; BRIEGEL, A.; ENGELHARDT, H.; HUBER, R. The unique structure of archaeal "hami" highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. **Molecular Microbiology**, v.56, p.361-370. 2005.

- MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L.C.; DE MARIA, C.A.B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v.23, p.195-203. 2000.
- MÜLLER, V.; SPANHEIMER, R.; SANTOS, H. Stress response by solute accumulation in archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.729-736. 2005.
- MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.3131-3145. 1985.
- NAUHAUS, K.; ALBRECHT, M.; ELVERT, M.; BOETIUS, A.; WIDDEL, F. *In vitro* cell growth of marine Archaeal-bacterial consortia during anaerobic oxidation of methane with sulfate. **Environmental Microbiology**, v.9, p.187-196. 2007.
- NG, S.Y.M.; ZOLGHADR, B.; DRIESSEN, A.M.; ALBERS, S.V.; JARRELLI, K.F. Cell Surface Structures of Archae. **Journal of Bacteriology**, v.190, p.6039-6047. 2008.
- OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, v.4, p.1. 2008.
- PAPENDICK, R.I.; CAMPBELL, G.S. Water Potential in the rhizosphere and plant and methods of measurement and experimental control. **In: Biology and control of soil-borne pathogens** The American Phytopathological Society, p.39-49. 1975.
- PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochatoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v.10, p.45-49. 2004.
- PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Editora UFLA - LAVRAS, 304p. 2003.
- POREBSKI, S.; BAILEY, L.G.; BAUM, B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.15, p.8-15. 1997.
- PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. **Environmental Microbiology**, v.10, p.2931-2941. 2008.
- RADAX, C.; GRUBER, C.; STAN-LOTTER, H. Novel haloarchaeal 16S rRNA gene sequences from Alpine Permo-Triassic rock salt. **Extremophiles**, v.5, p.221-228. 2001.
- RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. Groupspecific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1232-1240. 1994.
- REYSENBACH, A.L.; LIU, Y.; BANTA, A.B.; BEVERIDGE, T.J.; KIRSCHTEIN, J.D.; SCHOUTEN, S.; TIVEY, M.K.; DAMM, K.L.V.; VOYTEK, M.A. A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. **Nature**, v.442, p.444-447. 2006.

- RIEGER, G.; RACHEL, R.; HERMANN, R.; STETTER, O. Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. **Journal of Structural Biology**, v.115, p.78-87.
- ROBERTSON, C.E.; HARRIS, J.K.; SPEAR, J.R.; PACE, N.R. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.638-642. 2005.
- RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2541-2547. 2000.
- ROSENBLUEH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.19, p.827-837. 2006.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, p.1-9. 2008.
- SAKIYAMA, C.C.H. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento**. 2001. 72f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa.
- SALAZAR-MARTINEZ, E.; WILLETT, W. C.; ASCHERIO, A.; MANSON, J. E.; LEITZMANN, M. F.; STAMPFER, M. J.; HU, F. B. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v.140, p.1-8. 2004.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v.50, p.1-8. 2005.
- SANTOS, T.M.A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica*)**. 2008. 127f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SEKIGUCHI, H.; TOMIOKA, N.; NAKAHARA, T.; UCHIYAMA, H. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Biotechnonology Letters**, v.23, p.1205-1208. 2001.
- SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.479-488. 2005.
- SCHLEPER, C. Diversity of uncultivated Archaea: perspectives from microbial ecology and metagenomics. In: GARRET, R.A.; KLENK, H.S. (eds) **Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology**. Blackwell Publishing, p.39-50. 2007.
- SHARMA, A.K.; SPUDICH, J.L.; DOOLITTLE, F. Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. **Trends in Microbiology**, v.14, p.463-469. 2006.

- 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.
- SIMON, H.M.; JAHN, C.R.; BERGERYD, L.T.; SLIWINSKI, M.K.; WEIMER, P.J.; WILLIS, D.K.; GOODMAN, R.M. Cultivation of mesophilic soil crenarchaeotes in enrichment cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.4751-4760. 2005.
- SLIWINSKI, M.K.; GOODMAN, R.M. Comparison of crenarchaeal consortia inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1821-1826. 2004.
- SOPPA, J. From genomes to function: haloarchaea as model organisms. **Microbiology**, v.152, p.585-590. 2006.
- SOPPA, J.; BAUMANN, A.; BRENNEIS, M.; DAMBECK, M.; HERING, O.; LANGE, C. Genomics and functional genomics with haloarchaea. **Archives of Microbiology**, v.190, p.197-214. 2008.
- SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, v.18, p.21-26. 1997.
- STAFFORD, W.H.; BAKER, G.C.; BROWN, S.A.; BURTON, S.G.; COWAN, D.A. Bacterial diversity in the rhizosphere of Proteaceae species. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1755-1768. 2005.
- STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v.247, p.105-111. 2005.
- STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics--the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.492-498. 2004.
- STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.240-244. 2006.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30. 2000.
- SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, v.55, p.415-424. 2008.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599. 2007.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.782-787. 1990.
- TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W.; PODAR, M.; SHORT, J.M.; MATHUR, E.J.; DETTER, J.C.;

- BORK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E.M. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, v.308, p.554-557. 2005.
- TYSON, G. W.; BANFIELD, J. F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, v.13, p.411-415. 2005.
- UCHIYAMA, T.; ABE, T.; IKEMURA, T.; WATANABE, K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. **Nature Biotechnology**, v.23, p.88-93. 2005.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Disponível em <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em 07 de maio de 2009.
- VALE, H.M.M. **Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.) e sucessão durante a seca natural**. 2009. 88f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L.. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p.371-380. 2005.
- VIEIRA, L. G. E.; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; MORAES, A. H. A.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C. A.; MARINO, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MONTE, D. C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; ALMEIDA, E. R. P.; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, É. V. S.; SILVA, F. R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; LIMA, L. M.; CAMARGO, L. E. A.; PEREIRA, L. F. P.; COUTINHO, L. L.; LEMOS, M. V. F.; ROMANO, M. R.; MACHADO, M. A.; COSTA, M. M. C.; SÁ, M. F. G.; GOLDMAN, H. S.; FERRO, M. I. T.; TINOCO, M. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; VAN SLUYS, M-A; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; EIRA, T. S.; GUERREIRO-FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, R. L. B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; MAURO, S. M. Z.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian coffee genome project: na EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.95-108. 2006.
- WARD, N. New directions and interactions in metagenomics research. **FEMS Microbiology Ecology**, v.55, p.331-338. 2006.
- WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B.R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, p.137-144. 2001.
- WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, p.5088-5090. 1977.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.51, p.221-271. 1987.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v.87, p.4576-4579. 1990.

WOESE, C.R. The birth of the Archaea: a personal retrospective. In: GARRET, R.A.; KLENK, H.S. (eds) **Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology**. Blackwell Publishing, p.1-15. 2007.

YAMADA, C. M. **Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de café**. 1999. 56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

YU, Z.; GARCIA-GONZA, R.; SCHANBACHER, F.L.; MORRISON, M. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.889-893. 2008.

XU, Y.; WANG, G.; JIN, J.; LIU, J.; ZHANG, Q.; LIU, X. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. **Soil Biology & Biochemistry**, v.41, p.919-925. 2009

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v.23, p.753-771. 2006.