

MAURÍCIO DUARTE PONTES JÚNIOR

**SUCESSÃO BACTERIANA DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DE FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

T

P814s
2010

Pontes Júnior, Maurício Duarte, 1981-
Sucessão bacteriana durante o desenvolvimento de frutos
de café (*Coffea arabica* L.) / Maurício Duarte Pontes Júnior.
– Viçosa, MG, 2010.
ix, 27f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Arnaldo Chaer Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 25-27

1. Microorganismos endofíticos. 2. Café -- Qualidade.
3. *Coffea arabica* L. I. Universidade Federal de Viçosa. II.
Título.

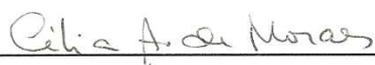
CDD 22. ed. 577.852012

MAURÍCIO DUARTE PONTES JÚNIOR

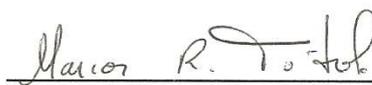
SUCESSÃO BACTERIANA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

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

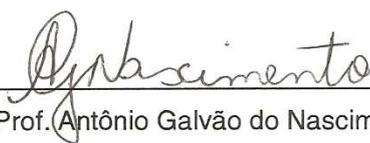
APROVADA: 19 de agosto de 2010



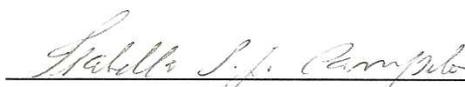
Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Co-orientadora)



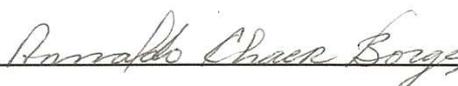
Prof. Marcos Rogério Tótola
(Co-orientador)



Prof. Antônio Galvão do Nascimento



Prof. Isabella de Souza Gomes Campelo



Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

Aos meus pais, Maurício e Maria do Carmo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por me dar tantas oportunidades.

Ao Departamento de Microbiologia e ao programa de Pós-Graduação.

À Coodenadoria de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizar meus estudos.

À Illycaffé, financiadora de parte importante do projeto.

Ao meu orientador, professor Arnaldo Chaer Borges, que foi um mestre e que sempre terei como exemplo de profissional. Obrigado por acreditar em meu objetivo.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, que sempre tiveram boa vontade em me ajudar.

Aos funcionários do Departamento, que me proporcionaram um convívio diário agradável e me auxiliaram nas tarefas diárias.

A cada colega que esteve comigo durante a minha caminhada. Muitos se tornaram grandes amigos e sei que sempre estarão comigo.

À minha família, por dar suporte às minhas metas.

À Glauce, pelo constante incentivo e apoio.

A todos que, diretamente e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MAURÍCIO DUARTE PONTES JÚNIOR, filho de Maurício Duarte Pontes e Maria do Carmo Fontes Duarte, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 25 de julho de 1981.

Em março de 2000, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG e, em agosto de 2005, graduou-se em Agronomia.

Em agosto de 2007, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da referida Instituição, em nível de Mestrado.

Em agosto de 2010, defendeu a dissertação.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Escolha da área e estratégia de amostragem	7
2.2 Extração de DNA bacteriano total	8
2.3 PCR com utilização de <i>primers</i> grupo específico	10
2.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	15
2.5 Análise dos dados de diversidade	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Análise de diversidade para bactérias endofíticas	17
3.2 Análise de diversidade para Firmicutes	18
3.3 Análise de diversidade para Actinomices	20
3.4 Análise de diversidade para alfa-Proteobacteria	21
3.5 Análise de diversidade para beta-Proteobacteria	22
3.6 Análise de diversidade para gama-Proteobacteria	22
4 CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMO

PONTES JÚNIOR, Maurício Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Sucessão bacteriana durante o desenvolvimento de frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Coorientadores: Célia Alencar de Moraes, Marcos Rogério Tótola e Maurício Dutra Costa.

Neste trabalho foi estudada a diversidade de bactérias endofíticas associadas a frutos de *Coffea arabica* L. durante o seu desenvolvimento. Foram realizadas sete coletas mensais, acompanhando o desenvolvimento dos frutos em cafeeiros de um talhão homogêneo de lavoura do cultivar Catuaí Vermelho. Cada amostra foi processada seguindo protocolo para obter o DNA total da comunidade bacteriana endofítica, associada a cada estágio de desenvolvimento do fruto. Foi empregada a estratégia de amplificação do rDNA16S pela técnica de *Nested*-PCR e discriminação em DGGE. A população total de bactérias endofíticas e os filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria (classes alfa, beta e gama) foram investigados. A análise de cada gel, representando a evolução de uma população ao longo do tempo, foi realizada empregando o programa Bionumerics[®]. Demonstrou-se a existência de populações de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café desde o primeiro mês de seu desenvolvimento, com emprego do *primer* universal para Eubacteria. Pela maior similaridade entre o padrão de distribuição das UTOs nas raias que representam os dois meses finais de desenvolvimento dos frutos

inferiu-se que as populações tendem para a estabilização. A menor similaridade entre as populações endofíticas, presentes nas diferentes fases de desenvolvimento dos frutos, foi constatada no filo Firmicutes, enquanto as beta-Proteobacteria exibiram maior similaridade entre as diferentes fases de desenvolvimento dos frutos. A amplificação do rDNA por *Nested* PCR e discriminação em DGGE mostrou-se adequada para a distinção da dinâmica de alterações nas populações entre os filos e as classes de bactérias estudadas.

ABSTRACT

PONTES JÚNIOR, Maurício Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2010. **Bacterial succession during coffee (*Coffea arabica* L.) fruit development.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Coadvisers: Célia Alencar de Moraes, Marcos Rogério Tótola and Maurício Dutra Costa.

This work aimed to study the diversity of endophytic bacteria associated to *Coffea arabica* L. fruit during their development. Seven monthly collections were conducted, following coffee fruit development in homogeneous stand of Catuai Vermelho coffee cultivar plantation. Each sample was processed according to protocol aiming to obtain total DNA from the endophytic bacterial community, associated to each stage of fruit development. The strategy of rDNA16S amplification through the *Nested*-PCR technique and DGGE discrimination were applied. The total population of endophytic bacteria and the phylos Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria (alpha, beta and gamma classes) were investigated. The analysis of each gel, representing the evolution of a population along time, was carried out using the program Bionumerics®. The existence of endophytic bacteria associated to coffee fruit since the first month of their development was confirmed, by using the universal primer for Eubacteria. Based on the similarity between the distribution pattern of the OTUs on the rays representing the two final months of fruit development, it was inferred that the populations tend to stabilize. Less similarity between the endophytic populations, present in the different phases of fruit development,

was confirmed in the phylo Firmicutes, while the beta-Proteobacteria displayed greater similarity among the different phases of fruit development. Amplification of the rDNA by *Nested* PCR and DGGE discrimination were found to be adequate to distinguish the alteration dynamics among the phylo populations and the bacterial classes studied.

1 INTRODUÇÃO

O café no mercado internacional é considerado como *commodity* e o valor anual de vendas estimado em US\$ 70 bilhões, menor apenas que os produtos de petróleo. A dimensão social e econômica da cafeicultura para mais de 50 países em desenvolvimento foi avaliada em 2005, ano em que foi efetuada a colheita em mais de 10 milhões de hectares ocupados com as lavouras, como atividade que envolveu o trabalho de cerca de 125 milhões de pessoas, o equivalente as 17 a 20 milhões de famílias que dependem do café para a sua subsistência na América Latina, África e Ásia (VEGA, 2008). O gênero *Coffea* integra a família Rubiaceae e compreende cerca de 100 espécies diferentes, com duas espécies de importância econômica destacada, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner.

A produção mundial de café é liderada pelo Brasil; no ciclo 2007/2008 foram colhidas 33,74 milhões de sacas, nas 11 regiões produtoras compostas por 1.850 municípios, onde ocupa 2,3 milhões de hectares plantados e alcança produtividade média de 21,63 sacas por hectare. A safra 2008/2009 correspondeu a 45,54 milhões de sacas, maior do que a do ciclo 2007/2008, de acordo com levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) em 2008. Desse total, a quantidade de café da espécie arábica representou 34,7 milhões de sacas, e a de café da espécie robusta representou 10,8 milhões de sacas. Antecipa-se a ocorrência nos próximos anos de um maior incremento na produção de café robusta em relação à

arábica em razão do crescimento considerável de consumidores de café solúvel em todo o mundo, especialmente dos residentes em áreas urbanas pela maior facilidade e rapidez no preparo do café solúvel, cuja base de fabricação é o café robusta (ANUÁRIO BRASILEIRO DO CAFÉ, 2008).

O Estado de Minas Gerais destacou-se na temporada 2007/2008 com a colheita de 15,49 milhões de sacas do total de 33,74 milhões produzidas no País (CONAB, 2009).

Uma característica da bebida do café é o fato de não possuir valor nutricional relevante, sendo consumida basicamente em razão dos efeitos fisiológicos e psicológicos relacionados à presença da cafeína e, principalmente, pelo prazer e satisfação que o aroma e o sabor são capazes de proporcionar. O café processado contém um número maior de compostos voláteis do que qualquer outro alimento ou bebida; aproximadamente 1.000 compostos voláteis já foram identificados nesse produto (DE MARIA, 2000).

O processo de frutificação, a maturação dos frutos, as características genéticas intrínsecas do cafeeiro, os procedimentos da colheita e pós-colheita e as condições climáticas são fatores diretamente associados com a qualidade da bebida. A integração correta desses fatores leva à produção de café que proporciona bebida de qualidade superior. A busca de boa qualidade da bebida disseminou a cultura do cafeeiro para altitudes mais elevadas, como ocorre no sudeste do Brasil, e em países como a Costa Rica, Guatemala e Honduras. O processo de amadurecimento dos frutos é mais lento em altitudes mais elevadas, onde as temperaturas do ar são mais baixas, ou a cultura é feita em áreas sob sombreamento, o que permite maior tempo para completar o desenvolvimento do fruto (DAMATA, 2007).

A característica de sabor da infusão do café torrado moído, preparada segundo procedimento padrão e avaliada em teste de degustação, é o determinante da classificação utilizada no Brasil. Os níveis de qualidade da classificação são divididos em seis graus, a saber: i) bebida Estritamente Mole, com característica de sabor muito macio, ligeiramente doce e com baixa acidez; ii) bebida Apenas Mole, com característica de sabor macio, com ligeira adstringência; iii) bebida Mole, com característica de sabor macio, ligeiramente doce; iv) bebida Dura, com característica de sabor adstringente, gosto áspero e carência de doçura; v) bebida Riada, com característica de sabor leve de ácido

fenólico e iodofórmio; e vi) bebida Rio, com característica de sabor fortemente desagradável de ácido fenólico e iodofórmio.

A atividade de enzimas nos grãos de café pode também ser usada para interferir a qualidade da bebida. Pectinases, celulases e xilanase favorecem a degradação de compostos importantes no processo fermentativo do café. A maior atividade de polifenoloxidasas (PFO) é observada em cafés de melhor qualidade. A sequência de eventos que conduzem à baixa atividade da PFO inclui os danos na membrana, ativação enzimática, oxidação de ácidos clorogênicos a quinonas e inibição enzimática pela presença de quinonas (CARVALHO *et al.*, 1994). A deterioração da qualidade está relacionada ao esgotamento do ácido clorogênico, o principal composto fenólico na semente de café. A atividade de PFO (CARVALHO *et al.*, 1994), o índice de coloração dos grãos e a acidez titulável total têm sido propostos como índices objetivos para se classificar os cafés quanto à qualidade da bebida superior. De acordo com estes autores, a atividade das polifenoloxidasas e o índice de coloração aumentam, enquanto a acidez decresce, quando há melhoria da qualidade do café.

A determinação da atividade de PFO e a construção de uma tabela de classificação de qualidade da bebida do café com base nesses valores concorreram para uma avaliação mais objetiva da qualidade da bebida, complementando a “prova de xícara”. Em cafés extrafinos (bebida estritamente mole), a atividade de PFO é superior a $67,66 \text{ U.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de amostra; em café fino (bebida mole e “apenas mole”) a atividade de PFO varia entre 62,99 e $67,66 \text{ U.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de amostra; em café aceitável (“bebida dura”), a atividade PFO varia entre 55,99 e $62,99 \text{ U.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de amostra; e em café não aceitável (“bebida riada” e “rio”) a atividade de PFO é inferior a $55,99 \text{ U.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de amostra (CARVALHO *et al.*, 1994).

A qualidade do café é fator determinante de preço e aceitação nos mercados, nacional e internacional. Essa qualidade é definida pelos atributos físicos dos grãos, beneficiados crus (cor, tamanho, integridade, densidade e uniformidade) e do torrado (homogeneidade na cor do grão), além da combinação dos constituintes químicos (açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, cafeína, compostos voláteis, ácidos graxos, proteínas e algumas enzimas) cujas presenças, teores e atividades conferem ao café uma

qualidade característica. Os teores de potássio dos grãos e a qualidade de bebida se correlacionam de forma positiva e significativa (ALVES, 1999, 2000).

Alguns cafés, produzidos de maneira peculiar, como o Kopi Luwak na Indonésia, resulta uma bebida com sabor e aroma de alta qualidade, que faz desta uma bebida rara e valiosa (MARCONE, 2004), resultado da ação de microrganismos 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.

O estabelecimento de método objetivo para ser usado na classificação da qualidade da bebida em substituição à “prova de xícara” requer conhecimentos mais específicos sobre a origem dos precursores daqueles compostos que compõem o aroma, o sabor e a acidez, alguns provavelmente originados por síntese microbiana (LONGO; SANROMÁ, 2006).

A constatação da existência de diversidade de endofíticos em *C. arábica* evidencia a urgência de estudos funcionais desta microbiota, especialmente com relação a compostos precursores de aroma, sabor e acidez, de interesse para produção comercial de cafés de qualidade superior (CORDEIRO, 2008). A literatura existente sobre diversos aspectos da produção cafeeira é vasta, porém limitada quando se refere especificamente a microrganismos endofíticos associados ao cafeeiro.

As plantas podem ser consideradas como um ecossistema complexo, constituído por diferentes nichos e uma vasta microbiota. Nesse contexto, as bactérias podem ser consideradas como habitantes normais tanto nas superfícies da planta como no interior dos tecidos da maioria dos vegetais, onde podem estabelecer interações neutras, simbióticas, parasíticas ou antagônicas. As bactérias são denominadas como endofíticas quando habitam o interior de órgãos ou tecidos da planta hospedeira sem causar dano aparente e, epifíticas, quando crescem e vivem sobre superfícies do vegetal.

As bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico similar ao de fitopatógenos e por esta razão podem ser utilizadas como agentes de biocontrole de fitopatógenos, insetos e nematóides. Em alguns casos elas também podem acelerar a emergência das plântulas, promover o desenvolvimento de plantas em condições adversas e aumentar o crescimento

vegetal. Bactérias endofíticas foram descritas como capazes de prevenir doença por meio de mecanismo de síntese *de novo* de compostos antifúngicos (RYAN, 2007).

Estima-se que as atuais técnicas de cultivo *in vitro* revelam apenas de 1 a 10% da população microbiana nos ambientes. Esta situação é atribuída a dois fenômenos: i) a presença de espécies desconhecidas, ou que não são cultiváveis pelos métodos existentes, e ii) a presença de espécies conhecidas que são metabolicamente ativas e viáveis, porém ainda permanecem no estágio denominado viáveis não cultiváveis (VNC) (FLEET, 1999).

O conhecimento das populações de cada ambiente tem evoluído a partir da utilização de métodos moleculares para detectar as espécies não cultiváveis. A principal estratégia é a com base na análise do DNA total extraído do ecossistema. Utilizando a reação de polimerização em cadeia (PCR), o rDNA microbiano no extrato é especificamente amplificado, clonado e, em seguida, sequenciado. As sequências de dados são comparadas com sequências de rDNA, em bases de dados para identificação do gênero ou espécie em questão. Outras abordagens utilizam sondas de rDNA marcadas com fluoresceína que permitem a detecção e localização espacial das espécies visadas *in situ* (FLEET, 1999).

Ao empregar métodos como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) é possível discriminar os amplicons de rDNA gerados na PCR em um perfil eletroforético específico, o que permite a detecção de alterações que refletem a composição da estrutura da microbiota no ecossistema e também a evolução da composição durante o período de tempo em estudo (MUYZER, 1998).

A técnica de DGGE permite a detecção de diferenças muito discretas em uma sequência de nucleotídeos em genes conservados, além de permitir a identificação dos grupos filogenéticos dominantes em uma comunidade microbiana complexa. A sua sensibilidade e poder de resolução discriminam diferenças em um único nucleotídeo na sequência. A metodologia depende da obtenção de condições físicas que retardem o movimento de moléculas de DNA pela desnaturação parcial de regiões específicas da dupla fita, enquanto as moléculas migram através de uma matriz gélica. A desnaturação é causada

pelo incremento da concentração de agentes desnaturantes, como ureia e formamida.

A impossibilidade de separação de fragmentos maiores que 500 pares de bases restringe o detalhamento da informação gerada por esta técnica, e esta é a sua principal limitação (MUYZER, 1998). Alterações nos procedimentos de extração de DNA da comunidade microbiana são refletidas em desvios na estimativa de grupos filogenéticos dominantes. As bandas exibidas nos perfis de eletroforese pela técnica de DGGE podem não corresponder a uma só espécie de bactéria, uma vez que fragmentos de rDNA 16S de diferentes espécies podem ter mobilidade eletroforética similar e uma mesma espécie de bactéria também pode ter diferentes operons codificando para rDNA 16S com sequências que apresentam micro-heterogeneidade. Assim, elas podem ser discriminadas pela técnica, resultando no aparecimento de várias bandas para uma mesma espécie (NUBEL *et al.*, 1996). Por essas razões, as bandas resultantes do gel de DGGE são denominadas como unidades taxonômicas operacionais (UTOs).

O objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade genética das comunidades microbianas associadas aos frutos de *Coffea arabica* L. em diferentes fases do seu desenvolvimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Escolha da área e estratégia de amostragem

A área para coleta de amostras foi a de talhão homogêneo em lavoura localizada na Fazenda Braúna, município de Araponga, Zona da Mata Norte, Minas Gerais, cujas coordenadas geográficas são 20° 43' 03,25" de latitude S; 42° 33'08,04" de longitude O e altitude de 889 metros acima do nível do mar. O talhão implantado com a cultivar Catuaí foi escolhido com base nos dados disponíveis de boa produtividade e qualidade dos frutos. A bebida classificada pelo teste da xícara foi qualificada como estritamente mole para o talhão. Na análise física do tipo de grão foi pontuada em 84 pontos, sendo considerado um café especial. As coletas foram realizadas na safra dos anos 2008/2009, entre os meses de novembro de 2008 e maio de 2009.

Foram realizadas campanhas mensais para a coleta dos frutos, acompanhando o desenvolvimento por um período de sete meses. Durante a coleta eram cortados ramos do terço médio da planta, que eram embalados dentro de sacos plásticos, identificados e acondicionados em caixas de isopor contendo gelo. A amostra foi transportada para o Laboratório de Ecologia Microbiana, BIOAGRO, UFV. Dentro de cada campanha foram amostrados frutos que apresentavam o mesmo estágio de desenvolvimento, a saber: chumbinho-pequeno, chumbinho-médio, verde, verde-cana e cereja. O estágio

chumbinho-pequeno foi identificado nos dois primeiros meses de coleta, o chumbinho-médio no terceiro mês de coleta, o estágio verde no quarto e quinto meses de coleta, o verde-cana no sexto mês de coleta e o cereja no sétimo mês de coleta. Cada amostra foi constituída de 500 g de frutos, coletados juntamente com seus pedúnculos, com o auxílio de tesoura, na mesma fase de desenvolvimento e na posição do terço médio de plantas, sem injúrias ou qualquer outro defeito que viesse a comprometer a qualidade.

Os procedimentos laboratoriais foram executados no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) e no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), ambos localizados no Departamento de Microbiologia, Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Os frutos obtidos em cada campanha de coleta foram imediatamente desinfestados superficialmente seguindo protocolo proposto por SAKIYAMA, 2001, em seguida congelados na presença de nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C até o momento do processamento. Para checar a eficácia do processo de desinfestação superficial foi realizada a inoculação de uma alíquota de 0,1 mL da última água de lavagem dos grãos na superfície do meio R2A contido em placa de Petri (REASONER, 1985), sendo as placas incubadas por 72 horas a 28 °C. A ausência de crescimento de bactérias na superfície do meio foi o critério utilizado para o uso dos frutos no processo de extração de DNA de bactérias endofíticas.

2.2 Extração de DNA bacteriano total

O protocolo para a extração de DNA de bactérias endofíticas presentes em frutos de café foi o adaptado no Laboratório de Ecologia Microbiana.

Para a extração do DNA bacteriano de oito frutos de café previamente desinfestados efetuou-se a maceração individual em almofariz de porcelana, com pistilo também de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, até se obter um pó fino. Uma porção de 0,5 g do pó resultante foi transferida para microtubo esterilizado com capacidade de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 700 µL de tampão de extração (4% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM

EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1% PVP), 4 μL de β -mercaptoetanol e lisozima para uma concentração final de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O conteúdo foi homogeneizado e o microtubo colocado em banho-maria a 37 °C por 1 hora, seguindo-se nova incubação em banho-maria a 65 °C por 20 minutos e a estabilização da temperatura por 10 min em ar do ambiente.

A cada microtubo foram adicionados 700 μL (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), a suspensão foi homogeneizada por seguidas inversões do microtubo, intercaladas com incubação em gelo, durante 5 minutos. Os tubos foram colocados para centrifugação por 5 min a 10.000 g em microcentrífuga (JOUAN, modelo MR 23i). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de igual volume e a ele adicionados 0,7 volume de isopropanol (armazenado em temperatura ambiente), seguido-se nova incubação a temperatura ambiente por 2 horas e centrifugação por 5 min a 10.000 g . O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado em álcool 70% e secado no próprio tubo a temperatura ambiente, antes da nova ressuspensão do precipitado em 50 μL de água milli-Q esterilizada e adição de RNase (Sigma-Aldrich Co. USA) para atingir uma concentração final de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O Eppendorf foi colocado a 37 °C por 1 hora e o DNA extraído dividido em três alíquotas antes da adição de 1/10 do volume da solução de NaCl 5 mol/L e de duas vezes o volume da solução com etanol absoluto, para a precipitação e conservação a -20 °C, até o momento de uso.

Por ocasião do uso o DNA precipitado no Eppendorf foi centrifugado por 5 min a 10.000 g , o sedimento lavado novamente com etanol 70%, secado a temperatura ambiente e, em seguida, resuspendido em água ultrapura estéril, para ser aplicado em gel de agarose (Sigma-Aldrich Co. USA) 0,8% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1mM EDTA). Alíquotas de 3 μL de DNA foram acrescidas de corante (0,25% azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 15% de ficol), corados com 1 μL de SYBR GOLD[®] 1X (Invitrogen) antes da aplicação no gel, antes de serem submetidas à eletroforese por 2 horas a 60 volts, utilizando-se uma fonte Power Pac Basic[™] BIO-Rad. O perfil de bandas de DNA no gel foi visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye[™] (Stratagene), em arquivo eletrônico com extensão jpg. A quantificação foi feita

utilizando-se de marcadores de DNA de fago λ nas concentrações de 25 e 50 ng/ μ L.

2.3 PCR com utilização de *primers* grupo específico

As PCRs foram executadas em termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient* (Eppendorf ag, Hamburg - Germany). Cada reação representa uma época de amostragem eleita para o estudo.

A amplificação de sequências de rDNA 16S das bacterianas endofíticas foi realizada em uma PCR, utilizando como molde o DNA bacteriano extraído das amostras de frutos de café em diferentes estádios de desenvolvimento, com emprego dos *primers* universais para eubactérias F984GC e R1378 (HEUER *et al.*, 1997; GELSOMINO *et al.*, 2005). As *Nested-PCR* das abordagens grupo específico utilizaram esta mesma reação. Uma sequência rica em GC foi adicionada na extremidade 5' do iniciador F984GC para prevenir a desnaturação completa durante a separação no gradiente desnaturante (MUYZER *et al.*, 1993). Em todas as reações foi utilizado um controle negativo, sem a utilização de DNA molde.

As reações foram realizadas em microtubos com capacidade de 200 μ L, contendo um volume total da reação de 25 μ L, sendo aos Eppendorfs adicionados 5 μ L tampão Green GoTaq 5X (Promega), 2,0 μ L de deoxirribonucleotídeos (dNTPs 250 μ M), 1,5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 0,5 μ L de cada *primer* na concentração de 10 μ M, 0,5 μ L de formamida deionizada, 1,0 μ L de albumina sérica bovina (Invitrogen) 50 mg/mL, 0,5 μ L de Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Promega), 2,0 μ L da suspensão de 20 ng/mL DNA total e água mili-Q para completar o volume final. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo, sem o DNA molde. A PCR para eubactérias foi realizada em termociclador PTC-100TM *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.), programado para temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 min de desnaturação, 1 min para o anelamento do *primer* a 55 °C e 1 min a 72 °C para a extensão, sendo o último ciclo de 10,0 min a 72 °C e resfriamento final a 4 °C (PEIXOTO, 2001). A PCR *Nested* para todos os grupos foi realizada no mesmo termociclador já citado, programado para temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos

consistentes de 94 °C por 1 min de desnaturação, 1 min para o anelamento do *primer* a 60 °C e 2 min e a 72 °C para a extensão do *primer*. A etapa final foi de dez ciclos de 0,5 min a 60 °C e 1 min a 72 °C e, finalmente, resfriamento a 4 °C. A verificação dos produtos da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich Co. USA) 1,2%, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) 1 µL de SYBR GOLD 1X. Foram aplicados 5 µL de cada reação juntamente com o marcador de tamanho DNA 100 pb DNA *leader* (PROMEGA, Madison, WI, USA).

Para a amplificação dos fragmentos de rDNA 16S, com utilização de *primers* grupo específico, a normalização deste protocolo foi realizada por meio de uma abordagem direcionada pela técnica de *nested*-PCR. Em uma primeira etapa da PCR, fragmentos da sequência dentro do rDNA 16S foram amplificados usando *primers* grupo específicos, ou seja, oligonucleotídeos que direcionam a amplificação para membros dos filos α -, β - e γ -Proteobacteria, Actinomyces e Firmicutes. A segunda PCR foi realizada com um segundo conjunto de iniciadores universais que têm a função de reduzir e padronizar o comprimento dos fragmentos específicos e, ainda, de adicionar um grampo GC necessário para análise da DGGE. Uma vez que os grupos pertencem ao domínio Bactéria, os *primers* na segunda PCR foram escolhidos para reamplificar todos os *amplicons* obtidos após a primeira. A utilização dessa abordagem grupo específica pode ampliar as possibilidades do PCR-DGGE nos estudos das comunidades microbianas, permitindo uma melhor análise por revelar mudanças sutis na comunidade microbiana (BOON, 2001).

No estudo do grupo α -Proteobacteria a amplificação foi realizada em duas etapas: a primeira foi utilizando como molde o DNA genômico da comunidade total na PCR com o *primer* grupo específico F203 α juntamente com o primer reverso R1492. Em seguida, os amplicons resultantes dessa primeira reação foram utilizados como molde numa segunda PCR com os *primers* universais F984GC/R1378 (HEUER, 1997; GOMES, 2001). No estudo do grupo β -Proteobacteria a amplificação foi realizada em duas etapas, a primeira utilizando como molde o DNA genômico da comunidade total na PCR com o *primer* grupo específico F984 β juntamente com o primer reverso R1492. Em seguida, os amplicons resultantes dessa primeira reação foram utilizados

como molde em uma segunda PCR com os *primers* universais F984GC/R1378 (GOMES, 2001; HEUER, 1997).

Na amplificação de fragmentos de rDNA 16S, para grupos específicos de α e β -Proteobacteria, as reações foram realizadas em tubos Eppendorf de 200 μ L, com um volume final de 25 μ L, contendo 5 μ L de tampão Green GoTaq[®] (Promega), 2,0 μ L de deoxirribonucleotídeos (dNTPs 250 μ M), 1,5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ L de cada *primer* 10 μ M, 0,5 μ L de formamida deionizada, 1,0 μ L de albumina sérica bovina (Invitrogen) 50 mg/mL, 0,5 μ L de Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Promega), 2,0 μ L da suspensão de 20 ng/mL DNA total e água mili-Q para completar o volume final. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100TM *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.), programado para temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida de 25 ciclos consistentes de 94 °C por 1 min de desnaturação, 1 min para o anelamento do *primer* a 56 °C (alfa) e 61 °C (beta) e 2 min a 72 °C para a extensão do *primer*. O ciclo foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min e resfriamento final a 4 °C.

No estudo do grupo γ -Proteobacteria a amplificação foi realizada em duas etapas, a primeira utilizando como molde o DNA genômico da comunidade total na PCR com o *primer* grupo específico FD2 juntamente com o *primer* reverso RP1 (WEISBURG, 1991). Em seguida, os amplicons resultantes dessa primeira reação foram utilizados como molde em uma segunda PCR com os *primers* universais F984GC/R1378 (GOMES, 2001; HEUER, 1997). As reações para amplificação de fragmentos de rDNA 16S para γ -Proteobacteria foram realizadas em tubos Eppendorf de 200 μ L, com um volume final de 25 μ L, contendo 5 μ L de tampão Green GoTaq[®] (Promega), 2,5 μ L de deoxirribonucleotídeos (dNTPs 250 μ M), 1,5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,525 μ L de cada *primer* 10 μ M, 0,4 μ L de Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Promega), 2,0 μ L da suspensão de 20 ng/mL DNA total e água mili-Q para completar o volume final. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100TM *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.), programado para temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos consistentes de 94 °C por 15 seg de desnaturação, 1 min para o anelamento do *primer* a 52 e 72 °C para a extensão do *primer*. As últimas 20 etapas de extensão foram realizadas usando

um incremento de temperatura de 20 seg por ciclo (BUNGE; LECHNER, 2001). Em todas as condições foi utilizado controle negativo sem DNA molde.

No estudo do filo Firmicutes, grupo gram-positivo, com baixo conteúdo de G+C, a amplificação foi realizada em duas etapas, a primeira utilizando como molde o DNA genômico da comunidade total na PCR com o *primer* grupo específico BLS342F juntamente com o *primer* reverso 1392R (BLACKWOOD, 2005). Em seguida, os amplicons resultantes desta primeira reação foram utilizados como molde em uma segunda PCR com os *primers* universais F984GC/R1378 (HEUER, 1997; GOMES, 2001).

A reação grupo específico foi realizada em microtubo com capacidade de 200 µL, com um volume final de 25 µL, contendo 5 µL de tampão Green GoTaq® (Promega), 1,6 µL de deoxirribonucleotídeos (dNTPs 250 µM), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,25 µL de cada *primer* 10 µM, 0,5 µL de albumina sérica bovina (Invitrogen) 50 mg/mL, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5 U/µL (Promega), 2,0 µL da suspensão de 20 ng/mL DNA total e água mili-Q para completar o volume final. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100™ *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.), programado para temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30 seg de desnaturação, 30 seg para o anelamento do *primer* a 57 °C e 90 seg a 72 °C para a extensão do *primer*. O ciclo foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 7 min e resfriamento final a 4 °C.

No estudo do filo Actinomycetes, grupo gram-positivo, com alto conteúdo de G+C, a amplificação foi realizada em duas etapas, a primeira utilizando como molde o DNA genômico da comunidade total na PCR com o *primer* grupo específico F243H GC juntamente com o *primer* reverso R1492. Em seguida, os amplicons resultantes desta primeira reação foram utilizados como molde em uma segunda PCR com os *primers* universais F984GC/R1378 (HEUER, 1997).

As reações foram realizadas em tubos Eppendorf de 200 µL, com um volume final de 25 µL, contendo 5 µL de tampão Green GoTaq® (Promega), 2,0 µL de deoxirribonucleotídeos (dNTPs 250 µM), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,25 µL de cada *primer* 10 µM, 0,5 µL de formamida deionizada, 0,5 µL de albumina sérica bovina (Invitrogen) 50 mg/mL, 0,25 µL de Taq DNA polimerase 5 U/µL (Promega), 2,0 µL da suspensão de 20 ng/mL DNA total e água mili-Q para completar o volume final. A PCR foi realizada em termociclador PTC-

Tabela 1 – *Primers* utilizados para amplificar fragmentos de genes rDNA 16S de grupos específicos de bactérias

Grupo	<i>Primers</i> ^a	Posição no 16S rDNA ^b	Sequência (5´-3´)	Referências
α-Proteobacteria	F203α	(174-203)	CCGCATAGCCCCTACGGGGGA AAGTTTATCGCACAAAGCGGTGGATGA	Gomes <i>et al.</i> (2001)
β-Proteobacteria	F948β	(931-948)	CGCACAAAGCGGTGGATGA	Gelsomino <i>et al.</i> (2006)
Actinobacteria	F243H GC	(226-243)	CCGGGGCGCGCCCCGGGCGGG GCG GGGGCACGGGGGG	Gomes <i>et al.</i> (2001)
Bactéria	R1492	(1492-1513)	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACT T	Heuer <i>et al.</i> (1997)
Bactéria	F984GC	(968-984)	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC	Gelsomino <i>et al.</i> (2006)
Bactéria	R1378	(1378-1401)	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA ACG	Heuer <i>et al.</i> (1997)
Firmicutes	BLS342F	(342-402)	CAG CAG TAG GGA ATC TTC	Blackwood <i>et al.</i> (2006)
Bactéria	1392R	(1392-1406)	ACGGGCGGTGTGTAC A	Blackwood <i>et al.</i> (2006)
γ-proteobacteria	FD2	(18-47)	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
Bactéria	RP1	(1512-1406)	ACGGTTACCTTGTTACGCTT	Weisburg <i>et al.</i> (1991)

^aF, *primer forward*; R, *primer reverse*, ^bPosição no genoma de *Escherichia coli*.

100™ *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc.), programado para temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 5 min de desnaturação, 1 min para o anelamento do *primer* a 63 °C e 2 min a 72 °C para a extensão do *primer*. O ciclo foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min e resfriamento final a 4 °C.

Uma mistura de fragmentos de rDNA 16S das espécies bacterianas *Alcaligenes xylosoxydans* ATCC 13138, *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 23858, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Pseudomonas putida* ATCC 15176 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12692 foram amplificadas com o par de *primers* para eubactéria. Alíquotas de cada reação foram combinadas formando um padrão e foram utilizadas como marcadores específicos para os diferentes filos.

2.4 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A análise por DGGE (MUYZER *et al.*, 1993) foi realizada no sistema *DCode Universal Mutation Detection System*® (BIO-Rad – Califórnia, USA), sendo os produtos de PCR aplicados no gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 37,5:1) vertical a 6% (p/v), com um gradiente de ureia e formamida (40 a 60%). O gradiente foi obtido a partir da mistura de soluções-estoque de poliacrilamida com 100% dos agentes desnaturantes, formamida deionizada 40% e ureia 7 mol.L⁻¹, e a outra a 0%, sem os agentes desnaturantes. Além dessas soluções foram utilizados 125 µL de persulfato de amônio – APS (polimerizador), 16 µL de TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletileno diamino (catalisador) e 50 µL do corante para visualização do gradiente (azul de bromofenol 0,5%, xilenocianol 0,5% e TAE). O gradiente foi obtido com a aplicação das soluções por um sistema dispensador (Modelo 475 Gradient Delivery System®, BIO-Rad Califórnia, USA). Esse gel foi exposto a uma corrente de 50 volts durante 16 horas a 60 °C (CORDEIRO, 2008). Após o término da corrida, o gel foi corado por 20 minutos em solução 1X de SYBR GOLD (INVITROGEN® – Califórnia, USA). Imagens dos géis sob luz UV foram digitalizadas em transiluminador com sistema para fotodocumentação de géis, Eagle-Eye II Still Vídeo System® (Stratagene – Califórnia,USA), em arquivo

eletrônico com extensão tiff. A imagem de um gel representa a evolução de um filo da comunidade bacteriana ao longo do período de desenvolvimento dos frutos.

2.5 Análise dos dados de diversidade

A análise da diversidade das imagens obtidas foi executada no *software* Bionumerics® (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Para a análise de agrupamento, os padrões de DGGE foram comparados por processo de agrupamento das raias, com a construção de uma matriz de similaridade. Para o cálculo da matriz foi utilizado o coeficiente de similaridade de Dice (S_D), um coeficiente binário que calcula a similaridade entre pares de raias, por meio da razão entre o número de bandas comuns, presentes nas duas raias, pela soma do número de bandas diferenciadas, únicas em cada raia.

$$S_D = (2N_{AB})/(N_A + N_B)$$

em que

N_{AB} = número de bandas presentes nas duas raias comparadas;

N_A = número de bandas presentes apenas na primeira raia comparada; e

N_B = número de bandas presentes apenas na segunda raia comparada.

O dendograma foi derivado da matriz de similaridade pelo método de grupo com par não ponderado com média aritmética (UPGMA). Dessa forma, os dendogramas foram gerados, onde cada raia representa a microbiota associada a uma fase de desenvolvimento do fruto de café. Para avaliação da significância do agrupamento foi realizada a análise de *bootstrap*, exibindo o valor da correlação cofenética.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da diversidade genética da comunidade de bactérias endofíticas, com a utilização dos *primers* que amplificaram sequências do rDNA 16S e da estratégia de utilização de reação de *Nested-PCR*, revelou com o padrão de migração dos fragmentos de DNA no gel a existência de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) distintas das bactérias associadas aos frutos de café, sendo diverso o padrão de distribuição das UTOs durante o período de desenvolvimento do fruto (Figura 1). O resultado da análise de diversidade em um único gel da amostra necessariamente não representa a real diversidade microbiana, em razão da superposição de bandas e de dificuldade de discriminação dessas bandas. Além disso, um único microrganismo pode possuir várias cópias de um mesmo *operon* e, como consequência, a PCR-DGGE de um isolado não corresponderá necessariamente a uma única banda no gel.

Nos dendogramas das Figuras 1 a 6 os valores elevados dos coeficientes cofenéticos das diversas análises atestam a significância do agrupamento.

3.1 Análise de diversidade para bactérias endofíticas

Na análise de agrupamento os valores de similaridades entre os perfis das bactérias endofíticas das amostras de café foram superiores a 60% (Figura 1). Os perfis mostram a existência de duas fases distintas, na primeira o agrupamento relaciona-se a populações dos dois primeiros meses de

desenvolvimento dos frutos, enquanto o segundo grupo foi formado pelas raiais que representam os cinco meses seguintes do desenvolvimento dos frutos. Por esse resultado inferiu-se a existência de sucessão na comunidade de endofíticas durante o desenvolvimento dos frutos.

A maior similaridade entre os perfis referentes aos quatro últimos meses de coleta, principalmente entre os dois últimos, foi interpretado como uma tendência à homogeneidade do padrão de distribuição das bandas, uma estabilização dos componentes das populações associadas aos frutos (Figura 1).

Pela PCR-DGGE constatou-se populações bacterianas endofíticas associadas aos frutos de café desde o início de seu desenvolvimento (Figura 1 amostra 1e).

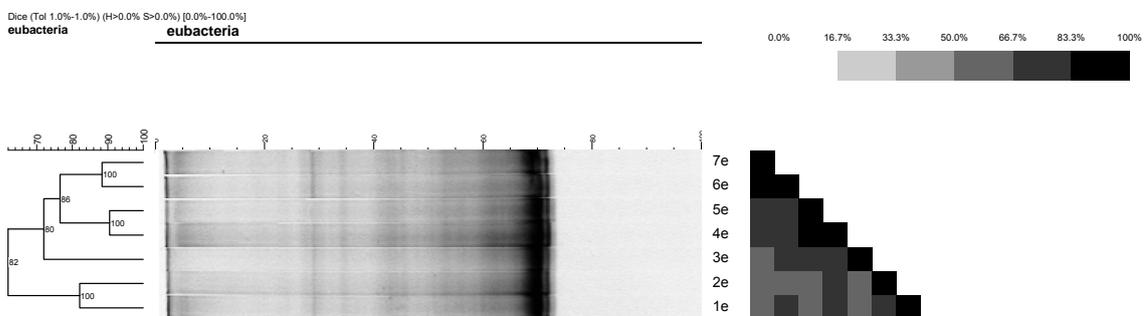


Figura 1 – Comparação estatística e agrupamento dos perfis de DGGE com base em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade total de bactérias endofíticas, associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, coletados mensalmente durante o desenvolvimento dos frutos (1e, 2e, 3e, 4e, 5e, 6e, 7e). Escala de 70 a 100 indica o nível de similaridade, enquanto os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação. A matriz apresenta os níveis de similaridade entre cada etapa de desenvolvimento. Escala de intensidade de cor indica nível de similaridade. O programa Bionumerics®, versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para os cálculos.

3.2 Análise de diversidade para Firmicutes

Na análise do filo Firmicutes foi adotada uma otimização sugerida pelo programa Bionumerics, o que reduziu a tolerância para diferenciação de bandas entre as raiais investigadas. A tolerância adotada foi de 0,3% para

discriminar bandas identificadas como representando UTOs distintas (Figura 2). Nessa figura observa-se a existência de distinção das bandas na raia do primeiro mês de desenvolvimento (Figura 2, amostra 1f), constituindo um ramo isolado dos demais. Esse fato é um diferencial quando comparado com os das populações dos frutos nos meses seguintes, onde a similaridade com as demais populações é menor que 20%. Na Figura 2 observa-se ainda o agrupamento de duas fases, sendo o primeiro agrupamento do segundo ao quarto mês de desenvolvimento e o segundo do quinto ao sétimo mês. A similaridade dentro de cada um dos grupos foi maior que 50%, mostrando a existência de homogeneidade entre as populações representadas nas raia e entre os grupos a similaridade observada foi de 25%, o que discrimina os dois grupos.

Entre os filos pesquisados, Firmicutes foi o que exibiu populações com uma dinâmica mais evidente, apresentando uma alteração no estágio inicial de desenvolvimento do fruto e com uma distinção mais significativa entre os grupos formados. Considerando a classificação ecológica, esse grupo bacteriano é constituído pelos denominados estrategistas r, grupo que usualmente se caracteriza por flutuações na população.

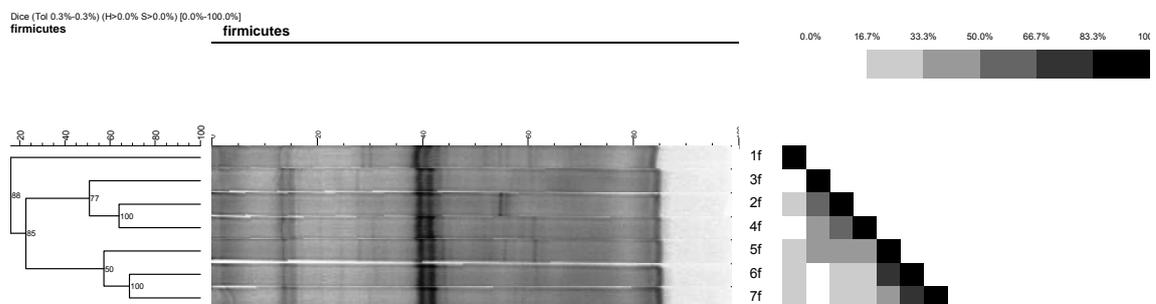


Figura 2 – Comparação estatística e agrupamento dos perfis de DGGE com base em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade total de bactérias endofíticas do filo Firmicutes (baixo conteúdo de GC), associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, coletados mensalmente durante o desenvolvimento dos frutos (1f, 2f, 3f, 4f, 5f, 6f, 7f). Escala de 20 a 100 indica o nível de similaridade, enquanto os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação. A matriz apresenta os níveis de similaridade entre cada etapa de desenvolvimento. Escala de intensidade de cor indica nível de similaridade. O programa Bionumerics® versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para os cálculos.

3.3 Análise de diversidade para Actinomicetes

No filo Actinomicetes, a análise de agrupamento gerou dois grupos distintos, com similaridade entre ambos de 60%. A visualização de bandas com intensidade reduzida no DGGE foi suficiente para a constatação de representantes do filo nas fases iniciais da coletas. O programa utilizado na análise foi capaz de discriminar dois períodos com populações distintas, porém houve um agrupamento em que a cronologia do estágio de desenvolvimento do fruto não correspondeu ao da ordem cronológica dos meses de coleta, fato atribuído a possíveis alterações na dinâmica da constituição das populações e baixa estabilidade de seus membros (Figura 3).

Na Figura 3 é observada uma banda predominante durante todos os sete meses de coleta, com variações entre as bandas de menor intensidade. Com os dados disponíveis não foi possível determinar se a dinâmica observada se deveu a oferta de nutrientes ao fruto, variável durante os estágios de desenvolvimento ou a influência do clima. Existe ainda a possibilidade de que todas as populações estavam presentes em todas as fases investigadas, porém em razão dos fatores já referidos de oferta de nutrientes ou da variação climática.

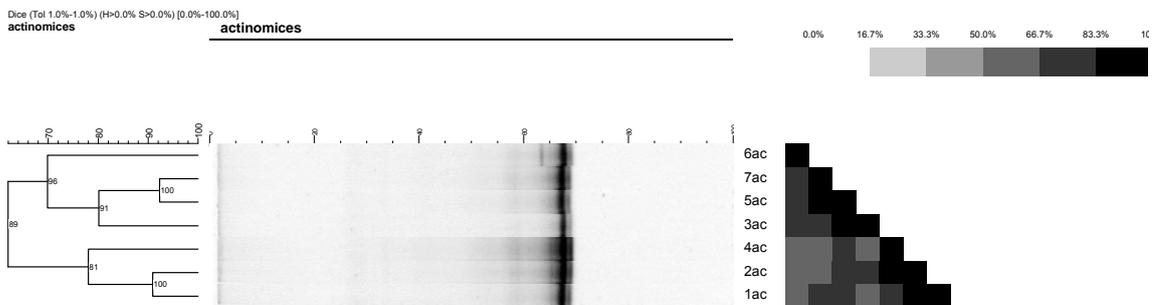


Figura 3 – Comparação estatística e agrupamento dos perfis de DGGE com base em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade total de bactérias endofíticas do filo Actinomicetes (alto conteúdo de GC), associadas a fruto de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, coletados mensalmente durante o desenvolvimento (1ac, 2ac, 3ac, 4ac, 5ac, 6ac, 7ac). Escala de 70 a 100 indica o nível de similaridade, enquanto os coeficientes de similaridade são mostrados nos nós de ramificação. A matriz apresenta os níveis de similaridade entre cada etapa de desenvolvimento. Escala de intensidade de cor indica nível de similaridade. O programa Bionumerics® versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para os cálculos.

3.4 Análise de diversidade para alfa-Proteobacteria

No filo Proteobacteria, a análise de agrupamento da classe alfa-Proteobacteria (Figura 4) gerou dois grupos distintos. A similaridade entre estes grupos foi menor que 40%, demonstrando uma diferenciação das populações entre a fase inicial e final. Nos quatro primeiros meses de investigação foi observada uma alteração da ordem cronológica dos agrupamentos, período em que as populações sofreram alterações mais significativas. Nos três meses finais de desenvolvimento dos frutos houve uma tendência a uma maior estabilidade das populações endofíticas, em razão da maior similaridade entre os dois meses finais.

Na análise da classe alfa-Proteobacteria foi adotada uma otimização sugerida pelo programa Bionumerics, o que reduziu a tolerância para diferenciação de bandas entre as raias investigadas. A tolerância adotada foi de 0,3% do comprimento do gel para afirmar que as bandas representam UTOs distintas.

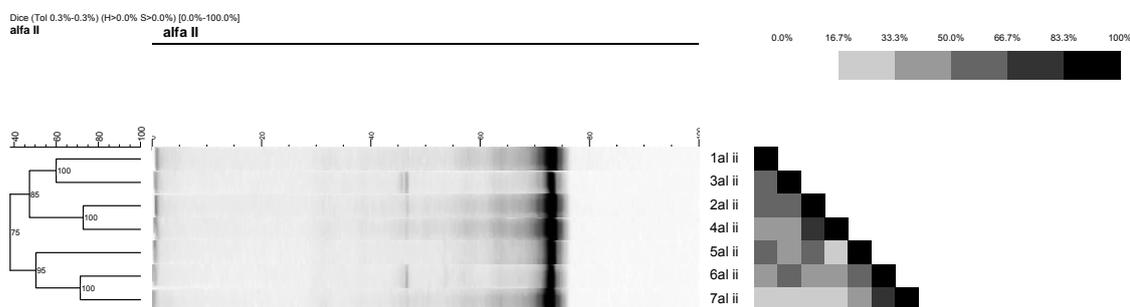


Figura 4 – Comparação estatística e agrupamento dos perfis de DGGE com base em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade total de bactérias endofíticas, filo Proteobacteria, classe alfa-Proteobacteria, associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, coleta-dos mensalmente durante o desenvolvimento dos frutos (1alii, 2alii, 3alii, 4alii, 5alii, 6alii, 7alii). Escala de 40 a 100 indica o nível de similaridade, enquanto os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação. A matriz apresenta os níveis de similaridade entre cada etapa de desenvolvimento. Escala de intensidade de cor indica nível de similaridade. O programa Bionumerics® versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para os cálculos.

3.5 Análise de diversidade para beta-Proteobacteria

No filo Proteobacteria, o agrupamento da classe beta-Proteobacteria mostrou-se distinto entre a fase inicial de desenvolvimento nos três primeiros meses e a fase final reuniu em um mesmo agrupamento os quatro últimos meses (Figura 5). Foi observada uma maior similaridade, próxima a 70%, entre os dois agrupamentos citados e uma menor diferenciação dentre os DGGE analisados. A ordem cronológica da coleta foi observada após a análise do agrupamento, fato atribuído a ocorrência de uma sucessão gradual e pouco pronunciada dos representantes da classe beta-Proteobacteria (Figura 5).

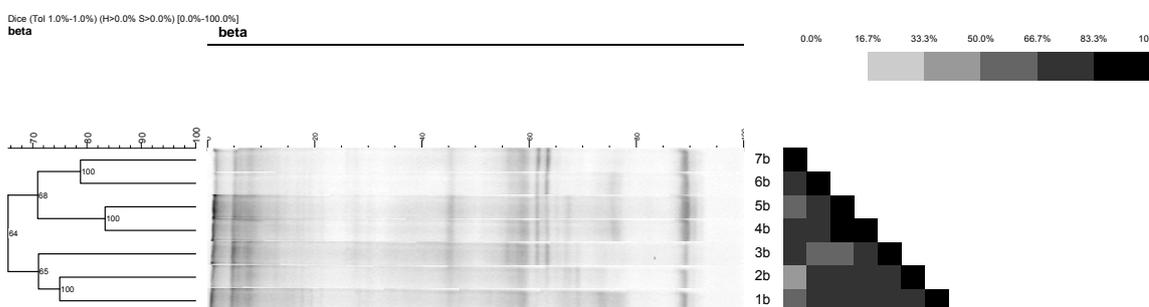


Figura 5 – Comparação estatística e agrupamento dos perfis de DGGE com base em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade total de bactérias endofíticas, filo proteobactéria, classe beta-Proteobacteria, associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, coleta-dos mensalmente durante o desenvolvimento dos frutos (1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b). Escala de 70 a 100 indica o nível de similaridade, enquanto os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nós de ramificação. A matriz apresenta os níveis de similaridade entre cada etapa de desenvolvimento. Escala de intensidade de cor indica nível de similaridade. O programa Bionumerics[®] versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para os cálculos.

3.6 Análise de diversidade para gama-Proteobacteria

Na análise de agrupamento do filo Proteobacteria na classe gama-Proteobacteria foi observada a formação de dois grupos com uma similaridade menor do que 60% (Figura 6). O primeiro grupo abrange os quatro meses

iniciais de desenvolvimento dos frutos e apresenta maior similaridade entre os componentes, com pouca variação dos representantes da classe gama-Proteobacteria. Embora os dois grupos apresentem níveis de similaridade pouco distintos entre si, o programa discriminou as populações associadas a cada fase de desenvolvimento dos frutos, a inicial e a final.

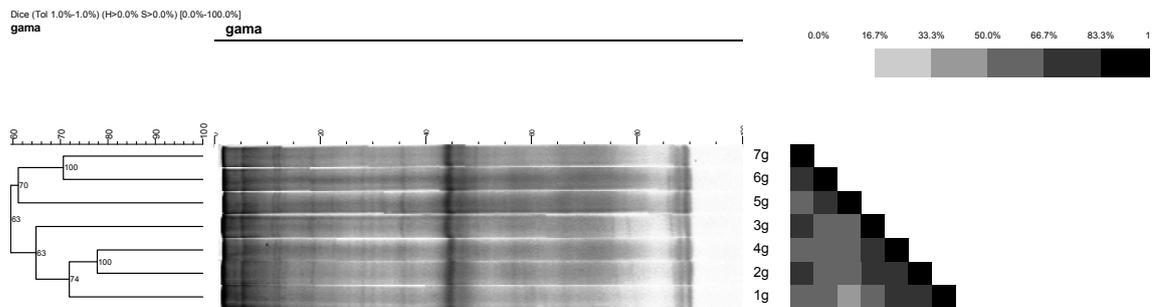


Figura 6 – Comparação estatística e agrupamento dos perfis de DGGE com base em fragmentos de rDNAs 16S da comunidade total de bactérias endofíticas, filo Proteobactéria, classe gama-Proteobactéria, associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, cole-tados mensalmente durante o desenvolvimento dos frutos (1g, 2g, 3g, 4g, 5g, 6g, 7g). Escala de 60 a 100 indica o nível de similaridade, enquanto os coeficientes cofenéticos são mostrados nos nódulos de ramificação. A matriz apresenta os níveis de similaridade entre cada etapa de desenvolvimento. Escala de intensidade de cor indica nível de similaridade. O programa Bionumerics® versão 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para os cálculos.

4 CONCLUSÕES

Demonstrou-se a existência de populações de bactérias endofíticas associadas aos frutos de café desde o primeiro estágio de desenvolvimento, com emprego do *primer* universal para Eubacteria.

Inferiu-se que a estabilidade das populações de bactérias endofíticas nos frutos é maior no último estágio de desenvolvimento, pela maior similaridade entre UTOs nas raías que representam os dois meses finais de desenvolvimento dos frutos.

A maior diferenciação entre as populações endofíticas presentes nos estágios de desenvolvimento dos frutos, inicial e final, foi constatada nas do filo Firmicutes, enquanto as beta-Proteobacteria exibiram a maior similaridade entre esses estágios.

A técnica de *Nested* PCR-DGGE mostrou-se adequada para a distinção da dinâmica de alterações nas populações entre os filos e as classes de bactérias estudadas.

A dinâmica das populações de bactérias endofíticas, considerando a diversidade genética, varia durante os estágios de desenvolvimento dos frutos de café com diferentes progressões entre filos e classes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES R.; TRUGO, C.; BASTOS, C. Componentes voláteis do café torrado Parte I. Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 22, p. 1-18, 1999.

ALVES, R.; TRUGO, C.; BASTOS, C. Componentes voláteis do café torrado Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v. 23, p. 195-203, 2000.

BELING, R. R. *et al.* **Anuário brasileiro do café 2008**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2008. 128 p.

BLACKWOOD, C. H.; OAKS, A.; BUYER, J. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6193-6198, 2005.

BOON, N.; DE WINDT, W.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39 p. 101-112, 2001.

BUNGE, M.; LECHNER, U. Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from river sediments: diversity of the dehalogenating community. **Anaerobic Dehalogenation**, p. 69-81, 2001.

CAVAHLO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N.; JUSTE JUNIOR, E. Relação entre composição físico-química e química do grão beneficiado e qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, 1994.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café Safra 2009** - primeira estimativa, jan. 2009. Brasília-DF: Conab, 2009.

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

DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; RAIMUNDO S. BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte ii. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 101-117, 1999.

GELSOMINO, A.; CACCO, G. Composition shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 1-12, 2005.

GOMES, N. C.; HEUR, H.; SCHOLFED, J.; COSTA, R.; MENDOÇA-HANGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 232, p. 167-180, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3233-3241, 1997.

LONGO, M. E.; SANROMAN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, p. 335-353, 2006.

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.

MUYZER, G.; DE WALLA, E.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; DE WALLA, E.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 695-700, 1993.

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

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

REASONER, D. J. ; GELDERICH, E.E. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 49, No. 1, p. 1-7, 1985

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

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letter in Applied Microbiology**, v. 333, p. 117-121, 2001.

VEGA, F. E.; ANDREAS, W. E.; RAY, M. Coffee germplasm resources, genomics and breeding. **Plant Breeding Reviews**, v. 31, n. 1, p. 415-448, 2008.

WEISBURG, W.; BARNES, S.; PELLETIER, D.; LANE, D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, p. 697-703, 1991