

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

PAULO HENRIQUE MARQUES DE ANDRADE

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA
COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A *Coffea arabica* L. DE CULTIVO
CONVENCIONAL E ORGÂNICO

São Carlos - SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

PAULO HENRIQUE MARQUES DE ANDRADE

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA
COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A *Coffea arabica* L. DE CULTIVO
CONVENCIONAL E ORGÂNICO

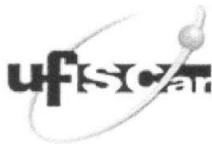
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica, Biologia Molecular e Estrutural.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

São Carlos - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Paulo Henrique Marques de Andrade, realizada em 04/07/2019:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
USP

Prof. Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho
EMBRAPA

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Otacílio de Andrade;
Ao meu amigo e sogro Geraldo Aparecido Soares.
“Para sempre em minha memória”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele pois, a glória eternamente.

Aos meus pais, Otacílio e Olerinda pelo amor incondicional, investimento e credibilidade. Sempre os honrarei por tudo que me ensinam! Papai, sempre será o meu herói!

Aquela que durante a execução deste trabalho foi minha namorada, noiva e agora esposa, Cinthia, por me dedicar o seu amor em todos os momentos; por cuidar do meu coração e me fazer acreditar e viver a vida de forma leve e divertida. Você sempre será minha melhor amiga e eternamente o meu amor!

A todos os meus familiares (irmãos, cunhados, sobrinhos e sobrinhos-netos) por suportarem a distância e o pouco tempo juntos. Vocês são minha base!

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela ímpar orientação, pela oportunidade de crescimento profissional, pela presença em todas as etapas e pela amizade que construímos durante este trabalho.

A Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa Departamento de Morfologia e Patologia – DMP UFSCar, pela amizade, contribuições e relevante apoio.

A amiga e parceira de trabalho Paula Cristiane Machado pelos ensinamentos e colaborações em todas as etapas deste trabalho. É sempre muito bom trabalhar com você! Obrigado por tudo!

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pelas imprescindíveis contribuições para a minha formação.

A Sra. Helena e toda equipe da Fazenda Monte Alto pela receptividade, credibilidade e apoio dados ao nosso trabalho.

A Sra. Maria de Lourdes Novais e equipe do Sítio Nova Aliança pela confiança, atenção e recepção calorosa em nossas coletas.

Ao Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho (EMBRAPA – Café) pela recepção e preciosas contribuições.

A Paloma Borato Cruz (EMBRAPA – Café) pela dedicação e qualidade na execução dos experimentos da casa de vegetação. Muito obrigado!

A Profa. Dra. Joyce Doria Rodrigues Souza (Universidade Federal de Lavras – UFLA) pela atenção, hospitalidade e contribuições.

Ao Paulo Sérgio Peixoto (Universidade Federal de Lavras – UFLA) pela paciência e

expertise nas análises de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight* (MALDI-TOF). Gratidão!

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (Departamento de Genética e Evolução – UFSCar) pelas valiosas colaborações e parceria em todo tempo. É sempre muito bom aprender um pouco mais com você!

A Profa. Dra. Maria Fernanda Peñafior (Universidade Federal de Lavras – UFLA) por fazer esse projeto ir mais longe. Com certeza faremos um belo trabalho juntos!

A DNA Consult e ao Laboratório de Genômica e Expressão (UNICAMP) pela parceria e colaboração no estudo de metagenômica.

Aos Docentes do Departamento de Morfologia e Patologia por acreditarem neste projeto juntamente comigo.

Aos técnicos e colegas de trabalho: Beto, Zélia, Cidinha, Adriano, Neto e Nely pelo companheirismo e apoio em todo o tempo. O meu “muito obrigado”! Essa conquista é de todos nós!

Aos colegas do LaMiB – Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas pelos anos de convivência e aprendizado. A parceria continua!

A todos colegas dos demais Laboratórios do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCaR (Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas – LIDI, Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Patologia e Biocompatibilidade). Foi uma experiência incrível compartilhar com vocês esse momento de aprendizado. Sucesso a todos nós!

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento, caracterização bioquímica, identificação e análise da diversidade genética da comunidade bacteriana endofítica associada a cultura de *Coffea arabica* L. provenientes de cultivo convencional e orgânico. As bactérias cultiváveis isoladas endofiticamente foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial para promoção de crescimento vegetal direto (solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio e produção de ácido indol acético) e indireto (antagonismo a fungos fitopatogênicos) e atividade enzimática (amilolítica, celulolítica, esterolítica, lipolítica, pectinolítica e proteolítica). Realizou-se a identificação por meio da análise proteica das células bacterianas por *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) de 59 isolados endofíticos. Também foram identificados 40 isolados por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA para avaliação e comparação da diversidade das comunidades bacterianas endofíticas associadas ao café de cultivo convencional e orgânico. A análise da diversidade indicou que a comunidade bacteriana endofítica do café proveniente da área de cultivo orgânico é mais diversa. Um total de dez linhagens bacterianas com potencial para promoção de crescimento vegetal foram selecionadas para inoculação *in vivo* em plântulas de *Coffea arabica* L. e os parâmetros indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vivo*, bem como o teor de macro e micronutrientes no tecido foliar foram avaliados após 180 dias da primeira inoculação. Também foi realizada a análise metagenômica do gene 16S rDNA em amostras de solo rizosférico de *Coffea arabica* L. proveniente das mesmas áreas. A partir das análises foi possível identificar sequências de 1 filo, 6 ordens e 27 famílias entre todas as amostras. Dentre elas, a família *Planctomycetaceae* foi a mais abundante nas duas áreas analisadas, enquanto as ordens *Xanthomonadales* e *Sphingomonadales* foram as que apresentaram menor abundância relativa na área de cultivo convencional e orgânico, respectivamente. Um total de 21 grupos bacterianos apresentou abundância relativa com diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras de rizosfera de café convencional e orgânico, o que indica a influência do manejo na diversidade bacteriana do solo rizosférico.

Palavras-chaves: bactérias endofíticas, solo rizosférico, promoção de crescimento vegetal, metagenômica, *Coffea arabica* L.

ABSTRACT

The present work had as objective the isolation, biochemical characterization, identification and analysis of the genetic diversity of the endophytic bacterial community associated with *Coffea arabica* L. culture from conventional and organic cultivation. The endophyte isolates were evaluated in vitro for the potential to promote direct plant growth (phosphate solubilization, biological nitrogen fixation and indole acetic acid production) and indirect (antagonism to phytopathogenic fungi) and enzymatic activity (amylolytic, cellulolytic, esterolytic, lipolytic, pectinolytic and proteolytic). Identification was performed by bacterial cell analysis by Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time-Of-Flight (MALDI-TOF) of 59 endophytic isolates. Forty isolates were also identified by partial sequencing of the 16S rDNA gene for evaluation and comparing the diversity of endophytic bacterial communities associated with conventional and organic coffee. The analysis of diversity indicated that the endophytic bacterial community of coffee from the organic growing area is more diverse. A total of ten bacterial strains with potential for plant growth promotion were selected for in vivo inoculation in *Coffea arabica* L. seedlings and in vitro plant growth promotion indicators as well as macro and micronutrient content in leaf tissue were evaluated after 180 days of the first inoculation. Metagenomic analysis of the 16S rDNA gene was also performed on samples of rhizospheric soil from *Coffea arabica* L. from the same areas. From the analyzes it was possible to identify sequences of 1 phylum, 6 orders and 27 families among all the samples. Among them, the family *Planctomycetaceae* was the most abundant in the two areas analyzed, whereas the orders *Xanthomonadales* and *Sphingomonadales* were the ones that presented smaller relative abundance in the area of conventional and organic cultivation, respectively. A total of 21 bacterial groups presented relative abundance with significant difference ($p \leq 0.05$) between the rhizosphere samples of conventional and organic coffee, indicating the influence of the management on the bacterial diversity of the rhizospheric soil.

Keywords: endophytic bacteria, rhizospheric soil, plant growth promotion, metagenomics, *Coffea arabica* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O cafeiro e suas principais estruturas botânicas.	20
Figura 2 - Propriedade de produção de café orgânico.	24
Figura 3 - Esquema da desinfecção superficial de tecidos vegetais de cafeeiro, obtenção, purificação e armazenamento de bactérias endofíticas de café.	31
Figura 4 - Cafeeiro acometido por fusariose com murchamento do terço superior da planta.	47
Figura 5 - Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo in vitro das bactérias endofíticas associadas ao café, em relação a fungo fitopatogênico. Isolado 1, 2, 3, e 4 representam as linhagens bacterianas.	71
Figura 6 - Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a técnica de pareamento direto in vitro para avaliação do potencial antagônico dos isolados endofíticos associados ao café, em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado “Y” representa o isolado bacteriano selecionado na etapa anterior (Figura5) e o disco com letra “X” na outra extremidade da placa Petri representa o fungo testado.	71
Figura 7 - Frequência de isolamento (FI) de bactérias endofíticas obtidas de diferentes partes do cafeeiro provenientes do manejo convencional e orgânico. Não foi possível o isolamento de bactérias endofíticas dos frutos de café provenientes do cultivo convencional devido à ocorrência de larvas de mosca-da-fruta no período de isolamento.	77
Figura 8 - Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolado bacteriano positivo inoculado em quadruplicada com o isolado.	78
Figura 9 - Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFb semi-sólido inoculado com o isolado endofítico.	84
Figura 10 - Atividade antagônica in vitro dos isolados bacterianos endofíticos aos fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Fusarium oxysporium</i> e <i>F. solani</i>	88
Figura 11- Atividade enzimática dos isolados bacterianos endofíticos oriundos de manejo convencional e orgânico da cultura do café.	90
Figura 12 - Frequência de bactérias endofíticas de café proveniente de cultivo convencional e orgânico identificados por MALDI-TOF.	94

Figura 13 - Frequência de bactérias endofíticas de café proveniente de cultivo convencional e orgânico identificados por sequenciamento do gene 16S rDNA.....	99
Figura 14 - Ávore filogenética dos genes 16S rRNA de comunidades bacterianas endofíticas presentes no café proveniente do cultivo convencional com bactérias obtidas no GenBank; construída por método de agrupamento “Neighbor-joining” usando “p-distance” para nucleotídeos e 1.000 repetições.....	100
Figura 15 - Ávore filogenética dos genes 16S rRNA de comunidades bacterianas endofíticas presentes no café proveniente do cultivo orgânico com bactérias obtidas no GenBank; construída por método de agrupamento “Neighbor-joining” usando “p-distance” para nucleotídeos e 1.000 repetições.....	101
Figura 16 - Casa de vegetação da Fundação Procafé em Varginha - MG.....	111
Figura 17 – a) Plântulas de café obtidas por embriogênese somática indireta de explantes foliares de cafeeiro; b) Plântulas de café em tubetes contendo substrato de fibra de côco adubado para serem inoculadas com as suspensões bacterianas.....	112
Figura 18 - Aferição das medidas das plantas após 180 dias: Altura da parte aérea (APA)(a); Diâmetro do caule (DC)(b); Comprimento do sistema radicular (CSR)(c).....	113
Figura 19 - Médias das alturas das partes aéreas (APA), em milímetros (mm), de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	114
Figura 20 - Médias dos diâmetros dos caules (DC) em milímetros (mm) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	115
Figura 21 - Médias dos comprimentos dos sistemas radiculares (CSR) em milímetros (mm) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	116
Figura 22 - Médias do peso seco da parte aérea (PSPA) em gramas (g) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	117
Figura 23 - Médias do peso seco do sistema radicular em gramas (g) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	117

Figura 24 - Gráfico biplot resultante da segunda estação de cruzamento, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 5 descritores para os Componentes 1 e 2.	120
Figura 25 - Perfil do teor (%) de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) em (dg.Kg ⁻¹) presentes nas folhas das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis (p≤0,05) e não houve diferença significativa entre as médias.	122
Figura 26 - Perfil do teor (em mg.Kg ⁻¹) de micronutrientes (Zn, Fe, Mn, Cu, B) presentes nas folhas das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis (p≤0,05) e não houve diferença significativa entre as médias.	122
Figura 27 - Curva de rarefação de bactérias rizosféricas de café de agricultura convencional e orgânica para avaliação de cobertura de sequências na identificação de novas OTUs.	134
Figura 28 - Abundância relativa de bactérias rizosféricas do café (<i>Coffea arabica</i> L.) na área de agricultura convencional e orgânica analisadas por sequenciamento utilizando o sistema Illumina MiSeq.	136
Figura 29 - Abundância relativa de grupos distintos no nível mais profundo identificados na rizosfera de <i>Coffea arabica</i> L. de cultivo convencional e orgânico. A cor amarela representa maior abundância bacteriana até 4,00 %. Grupos com abundância menor que 1 % não foram considerados.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Abundância bacteriana das diferentes partes dos cafeeiros proveniente de área de manejo convencional e orgânico.	77
Tabela 2. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> para os isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico.....	80
Tabela 3. Identificação por MALDI-TOF dos isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico.....	93
Tabela 4. Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico.....	97
Tabela 5. Abundância relativa dos grupos bacterianos associados ao café proveniente do cultivo convencional e orgânico.	98
Tabela 6. Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico e avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	110
Tabela 7. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.....	118
Tabela 8. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais das plântulas de cafeeiros inoculadas.	118
Tabela 9. Valores médios dos conteúdos dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), em dg.Kg ⁻¹ , e micronutrientes (Zn, Fe, Mn, Cu, B), em mg.Kg ⁻¹ , presentes nas folhas das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis ($p \leq 0,05$) e não houve diferença significativa entre as médias.....	124
Tabela 10 - Grupos bacterianos que apresentaram abundância relativa com diferença significativa entre as amostras de rizosfera de café de cultivo convencional e orgânico.....	139

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
REVISÃO DE LITERATURA	17
ANÁLISE DA DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A <i>Coffea arabica</i> L. DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO	17
1. Introdução	18
1.2. O cafeeiro	19
1.2.1. Características gerais	19
1.3. A importância econômica do café no Brasil	21
1.4. O sistema orgânico de produção de café	23
1.5. Micro-organismos endofíticos	26
1.6. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas	33
1.6.1. Solubilização de fosfato (SF)	34
1.6.2. Fixação biológica do nitrogênio (FBN)	37
1.6.3. Produção de ácido indol – acético (AIA)	39
1.6.4. Controle biológico microbiano	41
1.6.5. Fungos fitopatogênicos	44
1.7. Doenças do cafeeiro	45
1.7.1. Mancha manteigosa	45
1.7.2. Fusariose	46
1.8. Potencial biotecnológico: Produção de enzimas microbianas	47
1.9. Estudo da diversidade genética bacteriana	49
1.9.1. Caracterização proteômica	51
1.9.1.1. Identificação de bactérias por MALDI-TOFI (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight</i>)	51
1.10. Rizobactérias	53
1.11. Metagenômica	56
1.11.1. Estratégia para acessar a diversidade de micro-organismos do solo	57
1.11.2. Marcadores moleculares utilizados na identificação de micro-organismos	59
1.12. Análises metagenômicas	59
CAPÍTULO 2	61
ISOLAMENTO, DIVERSIDADE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADA A <i>Coffea arabica</i> L. DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO	61
RESUMO	62
ABSTRACT	63
2.1. Introdução	64
2.2. Objetivos	65
2.2.1. Objetivos específicos	65
2.3. Material e métodos	66

2.3.1. Coleta de Material	66
2.3.2. Obtenção, purificação e armazenamento das linhagens bacterianas	67
2.3.3. Seleção de bactérias endofíticas com potencial agrícola e biotecnológico.....	68
2.3.3.1. Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	68
2.3.3.1.1. Solubilização de Fosfato (SF).....	68
2.3.3.1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	69
2.3.3.1.3. Produção de ácido indolacético (AIA).....	69
2.3.3.2. Antagonismo a fungos fitopatogênicos	70
2.3.2.1. Pareamento direto “ <i>in vitro</i> ”	70
2.3.4. Ensaio enzimáticos: Potencial biotecnológico	72
2.3.4.1. Atividade amilolítica	72
2.3.4.2. Atividade celulolítica	72
2.3.4.3. Atividade lipolítica e esterolítica.....	73
2.3.4.4. Atividade pectinolítica	73
2.3.4.5. Atividade proteolítica	73
2.3.5. Identificação molecular dos isolados bacterianos.....	74
2.3.5.1. Extração de DNA bacteriano.....	74
2.3.5.2. Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR	74
2.3.5.3. Purificação do DNA, sequenciamento, edição e análise das seqüências	75
2.3.6. Análise proteica das células bacterianas por MALDI-TOF.....	75
2.4. Resultados e Discussão	76
2.4.1. Isolamento de bactérias endofíticas associadas ao cafeeiro.....	76
2.4.2. Caracterização bioquímica <i>in vitro</i> de bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	78
2.4.2.1. Solubilização de fosfato (SF)	78
2.4.2.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	82
2.4.2.3. Produção de ácido indol acético (AIA)	84
2.4.3. Atividade antagonica a fungos fitopatogênicos	86
2.4.4. Atividade enzimática	89
2.4.5. Identificação dos isolados bacterianos endofíticos.....	92
2.4.5.1. Análise proteica das células bacterianas por MALDI-TOF.....	92
2.4.5.2. Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA	95
CAPÍTULO 3	105
INOCULAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE <i>Coffea arabica</i> L. COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	105
RESUMO	106
ABSTRACT	107
3.1. Introdução	108
3.2. Objetivo Geral.....	109
3.3. Objetivos Específicos.....	109

3.4.	Material e Métodos.....	109
3.4.1.	Seleção das linhagens bacterianas	109
3.5.	Inoculação de bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento vegetal em plântulas de café (<i>Coffea arabica</i> L.)	111
3.6.	Resultados e Discussão	114
CAPÍTULO 4		125
DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA ASSOCIADA A <i>Coffea arabica</i> L. DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO POR ANÁLISE METAGENÔMICA.....		125
RESUMO		126
ABSTRACT		127
4.1.	Introdução	128
4.2.	Objetivos	130
4.2.1.	Objetivo geral.....	130
4.2.2.	Objetivos específicos.....	130
4.3.	Material e Métodos.....	130
4.3.1.	Coleta das Amostras.....	130
4.3.2.	Extração do DNA, normalização das amostras e preparo dos <i>pools</i>	131
4.3.3.	Amplificação do DNA.....	132
4.3.4.	Confecção das bibliotecas metagenômicas e sequenciamento	132
4.3.5.	Análise dos dados de sequenciamento.....	133
4.4.	Resultados	133
4.4.1.	Avaliação e análise de unidades taxonômicas operacionais (OTUs).....	133
4.4.2.	Classificação taxonômica de OTUs.....	134
4.4.3.	Índices ecológicos entre manejos convencional e orgânico	136
4.4.4.	Análise estatística.....	140
5.	Discussão.....	140
6.	CONCLUSÕES.....	148
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

APRESENTAÇÃO

Esta tese está dividida em quatro capítulos, conforme descrito a seguir:

O capítulo 1 - **Análise da diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico** - trata-se de uma Revisão de Literatura incluindo os principais conceitos e métodos envolvidos no estudo de bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a *Coffea arabica* L.; para a compreensão da diversidade genética bacteriana e caracterização do potencial biotecnológico.

O capítulo 2 - **Isolamento, diversidade e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias endofíticas cultiváveis associadas a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico** - trata dos métodos utilizados para o isolamento, diversidade e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias endofíticas cultiváveis associada a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico.

O capítulo 3 – **Inoculação in vivo de bactérias endofíticas de *Coffea arabica* L. com potencial para promoção de crescimento vegetal** - trata da inoculação de bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento vegetal em plântulas de *Coffea arabica* L.

O capítulo 4 – **Diversidade bacteriana da rizosfera associada a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico por análise metagenômica** - traz o estudo da diversidade bacteriana da rizosfera associada a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico por análise metagenômica.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A *Coffea arabica* L. DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO

1. Introdução

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas no comércio internacional e o segundo maior gerador de riquezas, perdendo apenas para o petróleo (MOREIRA et al., 2000). No Brasil, a importância histórica, econômica e social da atividade cafeeira é traduzida pelos benefícios trazidos ao processo de urbanização e industrialização do país e pela conseqüente capacidade geradora de empregos, direta ou indiretamente. Atualmente, o Brasil responde por aproximadamente um terço da produção e exportação mundial de café (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019)

Graças às suas dimensões continentais, o Brasil possui uma variedade de condições climáticas, de relevos, altitudes e latitudes. Isso permite a produção de muitos tipos e qualidades de cafés, incluindo os especiais, como os orgânicos, cujo consumo tem aumentado à medida que a sociedade vem questionando a sustentabilidade do modelo agrícola convencional atual (MAPA, 2019).

Dependendo do tipo de adubos utilizados, o café orgânico geralmente tem qualidade de grãos similar ou superior ao manejo convencional, bem como, maiores teores de açúcares totais. Isso garante uma elevada qualidade da bebida, porém a principal diferença entre a cafeicultura orgânica e a convencional é a sua importância ecológica, uma vez que os produtores orgânicos preconizam a restrição ao uso de fertilizantes químicos e a não utilização de agrotóxicos (THEODORO et al., 2009).

O desenvolvimento das abordagens moleculares para os estudos de Ecologia Microbiana levou à concepção de novas tendências e à definição de novos conceitos que ultrapassam as limitações da abordagem clássica (SANTOS, 2008).

As bactérias endofíticas, por exemplo são capazes de colonizar os tecidos internos das plantas e podem apresentar vantagens ecológicas quando comparadas as que colonizam apenas a superfície de seus hospedeiros graças às condições internas mais favoráveis e com menores variações em relação às condições externas (HALMANN ET AL., 1997; PAVLO et al., 2011; LACAVA; AZEVEDO 2013).

É válido lembrar que o solo rizosférico também é um ambiente altamente competitivo no que diz respeito a espaço e obtenção de nutrientes pelos micro-organismos (DUARTE et al., 2014; RAIJ, 2011). Assim, pode-se dizer que esses micro-organismos, potencialmente benéficos ou patogênicos e que são altamente competitivos na colonização de tecidos vegetais e na obtenção de nutrientes, irão colonizar este microambiente e, possivelmente, ter um efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOARES et

al., 2010).

Dessa forma, pode-se explicar a ocorrência de micro-organismos endofíticos e rizosféricos associados a diversas plantas e culturas agrícolas com elevada importância econômica. Uma vez que a diversidade das comunidades bacterianas presentes nos diferentes ecossistemas, bem como as associadas a plantas é praticamente desconhecida; estudos dessa natureza merecem atenção uma vez que estão empenhados em analisar a biodiversidade, a importância ecológica e as possíveis aplicações tecnológicas dos micro-organismos envolvidos (CERQUEIRA et al., 2019; RYAN et al., 2008).

1.2. O cafeeiro

1.2.1. Características gerais

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é um arbusto da família *Rubiaceae* e do gênero *Coffea* L. do qual se conhecem 103 espécies. Originário da Etiópia, onde ainda hoje faz parte da vegetação natural, chegou à Europa no século XV, sendo a Arábia a responsável pela propagação da cultura do café (MARTINS, 2012).

A primeira descrição correta do gênero *Coffea* sp. foi feita em meados do século XVIII, mas desde então, entre os botânicos não houve um acordo com respeito a um sistema preciso para sua classificação. Há pelo menos 25 espécies importantes, todas nativas da África tropical e de algumas ilhas do Oceano Índico – de Madagascar em particular (WRIGLEY, 1988).

A dificuldade em classificar e até mesmo designar uma planta como membro verdadeiro do gênero *Coffea* sp. deve-se à grande variação de suas plantas e sementes. Todas as espécies do gênero são lenhosas, mas em apresentação elas podem variar de pequenos arbustos a grandes árvores com mais de 10 metros de altura, com folhas amareladas, verde-escuro, cor de bronze ou com toques de púrpura (COSTE, 1955; SOUZA, 2004; WRIGLEY, 1988).

A maior parte são árvores e arbustos tropicais, que crescem nas áreas mais baixas das matas. Outros membros da família *Rubiaceae* são as gardênias e as plantas produtoras de quinino e de outras substâncias úteis, mas o gênero *Coffea* sp. é o mais importante, em termos econômicos (COSTE, 1955; FIOROTTI; STURM, 2015; MARTINS, 2012; WRIGLEY, 1988).

A planta do café apresenta longevidade perene e habitat terrestre. Pode medir de 2 a 5 m na fase adulta. Apresenta sistema radicular esbranquiçado em forma cônica, onde 80% das

raízes prevalecem nos primeiros 20 centímetros de profundidade, nas chamadas raízes da placa superficial. Caule lenhoso tipo tronco de cor verde na fase juvenil e marrom quando adulto (COSTE, 1955).

Caracteriza-se por folhas persistentes, com a presença de domácias nas junções entre a nervura principal e as secundárias. Filotaxia oposta e nervação perinérvea. Suas folhas apresentam constituição simples e limbo de forma elíptica, base acuminada, ápice aristado e margem ondulada. Seu tamanho pode variar de 90 a 180mm na fase adulta. Sua superfície é sem pelo, com brilho acentuado na face adaxial e fosca na face abaxial; cerca de 200 estômatos/mm², com consistência coriácea e presença e estípulas persistentes. Sua inflorescência é de posição axial e as flores, em forma de glomérulos, simétricas, actinomorfas, hermafroditas e diclamídeas medindo de 1 a 2 cm. A cor do cálice é verde e da corola branca. Sua prefloração é imbricada; possui cinco estames. Filete em forma filiforme e antera extrorsa. Deiscência dos estames longitudinal. Somente um pistilo de construção aberta e coesão simples; estilete de longevidade persistente e inserção terminal. O estigma é terminal e apresenta ovário com 2 lóculos, de inserção ínfera, placentação axial. Seu fruto caracteriza-se por apresentar duas lojas e ser indeiscente; tipo drupa com duas sementes. As principais estruturas da planta podem ser visualizadas na Figura 1 (COSTE, 1955; SOUZA, 2004).

Figura 1 - O cafeiro e suas principais estruturas botânicas.



1.3. A importância econômica do café no Brasil

O gênero *Coffea* sp. reúne aproximadamente 100 espécies (DAVIS et al., 2006) sendo duas delas as mais utilizadas para a produção comercial. São elas: *Coffea arabica* L., reconhecida pela qualidade potencial de sua bebida (KY et al., 2001) e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, que compõem em torno de 70% e 30% do mercado internacional total, respectivamente (VIEIRA et al., 2006). Duas outras espécies cultivadas em menor escala são o *Coffea liberica* e o *Coffea dewevrei*.

As primeiras mudas e sementes de café foram trazidas da América Central e das Guianas e introduzidas no Brasil, mais precisamente em Belém, por volta do ano de 1727, pelo Sargento-mor Francisco de Melo Palheta. Devido às circunstâncias climáticas, de relevo e solo, em meados do século XIX, a cultura do café se estabeleceu mais fortemente no Vale do Rio Paraíba, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, iniciando um novo ciclo econômico no Brasil. Com a inserção da produção no mercado internacional, tornou-se o principal produto das exportações brasileiras. Por quase um século o café foi a principal riqueza nacional e as divisas fomentaram o desenvolvimento, com criação de cidades e ampliação de outros centros urbano no interior do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Em 1850 o Brasil já era o maior produtor mundial com 40% da produção total (MAPA, 2019; MARTINS, 2012).

O *Coffea arabica* L. permite ao consumidor degustar um produto mais fino, requintado e de melhor qualidade. É cultivado em altitudes acima de 800 metros e predomina nas lavouras de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia, Rio de Janeiro e em parte do Espírito Santo. Já o *Coffea canephora* é usado principalmente para a fabricação de cafés solúveis e em algumas misturas com o arábica. Apresenta um sabor único, menos acidez e teor de cafeína maior. Predomina nas lavouras do Espírito Santo, em Rondônia e em parte da Bahia e de Minas Gerais. (FIOROTT; STURM, 2015; MAPA, 2019)

O café, atualmente produzido em mais de 60 países, é um dos importantes produtos agrícolas no comércio internacional, sendo considerado como o segundo maior gerador de riquezas do mundo, perdendo apenas para o petróleo (MOREIRA; TRUGO; DE MARIA, 2000; VIEIRA et al., 2006).

Com uma área plantada de 2,2 milhões de hectares e exportação média de 35 milhões de sacas, o Brasil é o maior produtor mundial de café, seguido pelo Vietnã e Colômbia, e responde por mais de um terço de toda a produção mundial e exportação (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019; VIEIRA et al., 2006).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a safra brasileira, em 2018 foi recorde e atingiu 61,65 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, cultivados em Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás e Mato Grosso, Amazonas e Pará.(MAPA, 2019).

A produção de *Coffea arabica* tem uma característica vegetativa de bienalidade com um ano de safra mais elevada, e redução na seguinte. Sendo assim, em 2018 a produção de café arábica foi de aproximadamente 47,50 milhões de sacas. A produção de *C. canephora* ficou na marca de 14,20 milhões de sacas. A área plantada em produção das duas espécies totaliza 1,88 milhão de hectares e a produtividade média é de 30,86 sacas por hectare, o melhor nível quando comparado à média histórica dos últimos 10 anos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019; SOUZA, 2004).

O setor cafeeiro é responsável pela geração de empregos diretos e indiretos no País, e por US\$ 2,5 bilhões na pauta de produtos exportados no ano. Entre os Estados produtores, Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional de café. De 2012 a 2017 as exportações do complexo café – verde, solúvel, torrado e moído, totalizaram 200 milhões de sacas, trazendo US\$ 35 bilhões de divisas para o País. Em 2017 as exportações foram de 30,9 milhões de sacas e a receita de US\$ 5,24 bilhões, ocupando a 5ª posição entre os produtos mais exportados pelo agronegócio brasileiro. (MAPA, 2019)

Dados do Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (Cecafé) informaram em relatório anual que o Brasil exportou 29,04 milhões de sacas de *Coffea arabica* em 2018, ou 7,1% mais que em 2017. Os embarques de *C. canephora* atingiram 2,48 milhões de sacas, bem acima das 295.623 sacas exportadas em 2017, ano impactado por uma forte seca (Conselho de Exportadores de Café do Brasil, 2019).

É necessário salientar que o Brasil desenvolve o maior programa mundial de pesquisas em café. Avanços significativos da cafeicultura brasileira estão relacionados a consideráveis investimentos em pesquisas em áreas importantes como: melhoramento genético, biotecnologia, manejo de pragas, controle biológico, irrigação e qualidade da produção. Todas as pesquisas têm destacado a preocupação e responsabilidade com a sustentabilidade econômica e a preservação ambiental. São desenvolvidas pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café - CBP&D/Café, coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, integrando uma rede de instituições brasileiras de pesquisa (MAPA, 2019; RICCI et al, 2002).

1.4. O sistema orgânico de produção de café

Devido à crise do café convencional em 2000, muitos produtores migraram para o sistema orgânico, principalmente pela possibilidade de venda a preços superiores. Nos anos de 2002 a 2004 o Brasil chegou a produzir até 300 mil sacas de café orgânico por ano. No entanto, a maioria desses produtores não detinham bons conhecimentos sobre as práticas orgânicas de manejo do solo, pragas e doenças, além de não terem realizado investimentos em qualidade e pós-colheita, o que resultou em dificuldade de venda dos seus produtos. Com o retorno dos melhores preços do café convencional, muitos produtores abandonaram suas lavouras orgânicas e voltaram ao sistema convencional. (ACOB, 2019)

O interesse pela conversão dos sistemas de café convencional para agroecossistemas orgânicos surge como uma motivação de compradores e consumidores preocupados com a degradação ambiental causada pela agricultura industrial e como incentivo a valorização social do trabalhador rural. Dessa forma, para os pequenos produtores tradicionais, constitui-se numa alternativa para diversificar e tornar mais sustentável a produção de café mediante a disponibilização de tecnologias validadas pela ciência (ARAUJO, 2004; MOREIRA, 2003; RICCI ET AL, 2002; THEODORO, 2007).

O Café orgânico é aquele produzido de acordo com as normas e procedimentos preconizados pela agricultura orgânica, em conformidade com a legislação vigente no País. Sua produção preconiza os princípios da agricultura sustentável e tem como meta garantir a manutenção dos recursos naturais e da produtividade agrícola em longo prazo, otimizando a produção com o uso mínimo de insumos externos à propriedade e sem causar impactos adversos ao meio ambiente. Ele deve proporcionar rentabilidade econômica adequada aos produtores para satisfação das suas necessidades, atuais e futuras, de alimentos e renda, além do atendimento das necessidades sociais das famílias e comunidades rurais.(ACOB, 2019; BRASIL, 1999).

Para isso, o sistema orgânico de produção de café exclui o uso de agroquímicos e de adubos minerais e está fundamentado em princípios agroecológicos. Ou seja, a adubação do sistema pode ser feita com esterco animal, compostos orgânicos, adubos verdes, torta de mamona, farinha de ossos, termofosfatos, preparados tipo Bokashi, dentre outras fontes alternativas previstas na legislação vigente (ACOB, 2019; BRASIL, 1999).

A adubação verde com espécies leguminosas é uma prática muito comum e pode ser

usada para diversificar a lavoura, além de ser uma alternativa para reciclar nutrientes no sistema de produção. A utilização desse tipo de adubação também contribui para o aporte de matéria orgânica e nitrogênio, via fixação biológica do nitrogênio atmosférico. (ACOB, 2019; THEODORO, 2007)

A ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* é a principal doença do cafeeiro e não existe, ainda, um produto alternativo eficiente para combatê-la em cultivos orgânicos. O uso de produtos alternativos de manejo fitossanitário para melhorar a qualidade ambiental e o controle de doenças é um objetivo a ser alcançado na cafeicultura orgânica. Dentre as opções de manejo, alguns trabalhos citam o uso de extratos vegetais que possuam substâncias bioativas capazes de atuar como indutores de resposta de defesa das plantas aos patógenos (BESERRA JÚNIOR et al., 2006; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019; DIAS, 2011).

A melhor solução é optar por cultivares resistentes à doença. Além disso, em regiões onde há pouca incidência de chuvas, é preciso selecionar cultivares também resistentes à seca. Os compostos orgânicos são uma boa opção de adubo e podem ser produzidos dentro da propriedade ou do próprio cafezal. Para sua produção, podem ser utilizados resíduos vegetais da propriedade ou de fácil aquisição na região (Figura 2). (Ricci et al, 2002).

Figura 2 - Propriedade de produção de café orgânico.



Fonte: Arquivo pessoal.

As pilhas de compostos devem ser instaladas próximo ao local onde os mesmos serão utilizados, para reduzir os custos com transporte. A vegetação espontânea deve ser manejada com roçadas, de forma seletiva, eliminando-se as espécies agressivas e mantendo-se as espécies de porte baixo, que podem servir de cobertura viva, ou aquelas que podem trazer algum benefício para a área cultivada, como as leguminosas, que fixam o nitrogênio do ar. (RICCI et al, 2002; RICCI et al., 2004)

Insetos-praga e doenças são controladas com produtos alternativos, como as caldas sulfocálcica e bordalesa, que têm função fungicida, acaricida e repelente. A arborização do cafezal é uma prática bem-vinda, também conhecida como cultivo em sistemas agroflorestais. Nessas condições, há maior diversificação da lavoura, aumento na longevidade das plantas, menor compactação e melhoria nas condições do solo, aumento da população de inimigos naturais e geração de renda extra para o produtor, reduzindo os riscos provocados por quedas nos preços do café no mercado mundial. (ANDRADE; NUNES, 2001).

É válido salientar que os produtores de café orgânico precisam dominar boas técnicas de produção, garantir a qualidade de bebida, valorizar os princípios ecológicos, dispor de um mercado bastante remunerador e estável, boa produtividade e custo razoáveis (ACOB, 2019).

No período de 2005 a 2013, a produção de café orgânico manteve-se numa média anual de 70 a 80 mil sacas. Entre 2015 e 2016 houve uma mudança nesse cenário e um maior estímulo à produção orgânica, sendo que a safra de 2017 foi estimada entre 80 e 90 mil sacas de café orgânico certificado além de cerca de 20 mil sacas em transição para orgânico (ABIC, 2019).

Em nível mundial, nos últimos anos a área cultivada com café orgânico praticamente quadruplicou, saltando de 200 mil hectares, em 2004, para quase 800 mil hectares, em 2014(ACOB, 2019).

A tendência para os próximos anos é de ainda mais crescimento. No Brasil, a estimativa atual é que a área cultivada com café orgânico seja de 5 a 6 mil hectares. Assim, pode-se considerar que o café orgânico é um nicho de mercado bem estabelecido e com clara tendência de crescimento, não se questionando mais a sua viabilidade técnica ou econômica (ACOB, 2019).

1.5. Micro-organismos endofíticos

O estabelecimento das plantas em seus respectivos habitats depende, entre outros fatores, da sua capacidade de interagir com outras espécies de seres vivos. Entre essas possíveis interações, podemos citar as associações mutualísticas com os fungos especializados do solo e as associações com bactérias fixadoras de nitrogênio. Além destas, interações com micro-organismos denominados endofíticos têm recebido especial atenção pela importância em relação a diferentes espécies vegetais (PEIXOTO NETO et al., 2003).

Diversas definições de endófitos estão descritas na literatura. Originalmente o termo endófito refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície (de BARY, 1866). (HALMANN et al., 1997) sugeriu que endófitos podem ser considerados micro-organismos que são isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente ou do interior destes, e que não causam danos aparentes às plantas hospedeiras.

Posteriormente, Mendes e Azevedo (2007), definiram micro-organismos endofíticos conforme outros autores (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; HALLMANN et al., 1997), mas dividiu os endófitos em dois tipos, sendo: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiontes fixadoras de nitrogênio. Todos esses conceitos, entretanto, são suficientemente amplos para incluir virtualmente qualquer micro-organismo que resida dentro de uma planta hospedeira (TIAN; CAO; ZHANG, 2015).

Estes micro-organismos podem ser encontrados em diferentes órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos, raízes, frutos, sementes e flores, sendo a comunidade microbiana endofítica representada, principalmente, por diferentes espécies de fungos e bactérias (CASTRO et al., 2018; LACAVA; AZEVEDO, 2013).

A penetração desses micro-organismos nos vegetais ocorre por meio de aberturas naturais ou artificiais, tais como: estômatos, ferimentos causados por instrumentos agrícolas e microferimentos nas raízes ocasionados pelo atrito destas com as partículas do solo, o que promove a disseminação de maneira sistêmica ou restrita a diversas partes da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos pode ocorrer colonização intracelular (CASTRO et al., 2014; HALLMANN et al., 1997; SILVA et al., 2016).

Outra forma menos comum de penetração de endofíticos ocorre por meio de insetos

(ELY; SMETS, 2019; KLUEPFEL, 2003). Além disso, as bactérias endofíticas podem também penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas, por exemplo, celulasas e pectinases (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; SINGH, 2018) , como observado em *Agave schottii* (WHITE et al., 2018) *Dahlia* sp. (LI et al., 2015) *Fallopia japônica*, (WHITE et al., 2018), *Festuca arundinacea* (WHITE et al., 2012), *Hedera helix* (SOARES et al., 2016) e *Rhus radicans* (WHITE et al., 2014).

A degradação enzimática das paredes celulares de plantas por bactérias endofíticas foi observada apenas durante a colonização da epiderme da raiz, mas nunca após a colonização dos espaços intercelulares do córtex da raiz (QUADT-HALLMANN; KLOEPFER; BENHAMOU, 1997a; RANA, 2016)

Esses resultados sugerem que a produção de celulasas e pectinases pelos endófitos é induzida especificamente para a penetração no interior da planta hospedeira. Essas observações indicam, ainda, a possibilidade de existência de mecanismos de penetração ativa para algumas bactérias endofíticas, embora a origem e a regulação dessas enzimas sejam pouco conhecidas. Assume-se que essas bactérias possuem mecanismos de controle específicos que regulam tanto a síntese quanto a atividade dessas enzimas, quantitativa e temporalmente (LODEWYCKX et al., 2002).

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

Sendo assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições e do genótipo do hospedeiro, se tornar um patógeno; e este pode, dependendo das fases do ciclo vital, viver em harmonia com o hospedeiro (MISAGHI, 1990). Ou ainda, uma bactéria epifítica pode, eventualmente, penetrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica (ANDREWS; HARRIS, 2000; ZHANG et al., 2019a). Da mesma forma, os endófitos têm primeiro que se localizar na superfície para penetrarem no hospedeiro sendo, durante esse estágio, semelhantes a epifíticos, conforme ocorre com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em milho (WAGNER et al., 2000).

Em suma, pode-se dizer que há um gradiente separando essas possíveis relações estabelecidas entre plantas e micro-organismos em que se torna difícil determinar claros limites para discriminar cada uma das três categorias mencionadas (AZEVEDO, 2014;

AZEVEDO et al., 2000).

A importância de microrganismo endofítico está sendo destacada nos últimos 30 anos, a partir da demonstração de que têm capacidade para proteger seu hospedeiro contra predadores e patógenos (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006a; LACAVA; AZEVEDO, 2014).

O fato de bactérias endofíticas serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas confere vantagem ecológica sobre outras bactérias capazes de colonizar apenas epifiticamente seus hospedeiros. Nos tecidos internos o micro-organismo encontra condições ambientais mais uniformes em que as variações de determinados fatores limitantes de crescimento, como as de temperatura, de potencial osmótico e de radiação ultravioleta, são menos estressantes (HALMANN ET AL., 1997; PAVLO et al., 2011; LACAVA; AZEVEDO 2013).

Além disso, o modo de vida de micro-organismos endofítico pode conferir proteção contra a predação por protozoários do solo (CASTRO et al., 2014; LODEWYCKX et al., 2002). Ainda, as populações endofíticas, à semelhança das populações rizosféricas ou epifíticas, são condicionadas por fatores bióticos (outros micro-organismos, parasitas e planta hospedeira) e abióticos (nutrientes e outros fatores físicos e químicos do ambiente), tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (BRADER et al., 2014; XIA et al., 2019)

Os micro-organismos endofíticos encontram nas plantas um vasto e diverso nicho (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). As bactérias endofíticas têm sido encontradas em uma variedade de tecidos de numerosas espécies vegetais colonizando-os de forma ativa, local ou sistemicamente, ou em estado latente. Esse tipo de interação planta-bactéria parece ocorrer na maioria, senão em todas, as espécies vegetais superiores (LODEWYCKX et al., 2002).

Dessa forma, os micro-organismos endofitos configuram-se como fontes potenciais de produtos naturais, bioativos e quimicamente novos, para a exploração na medicina, na agricultura e na indústria (LACAVA; AZEVEDO, 2013; PAMPHILE et al., 2017; SEBASTIANES; AZEVEDO; LACAVA, 2017; STROBEL; DAISY, 2003).

Não se sabe se as comunidades dentro da planta interagem entre si e tem sido especulado que os efeitos benéficos ao hospedeiro são resultantes dos efeitos combinados de suas atividades (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Geralmente as plantas possuem uma microbiota endofítica característica importante para sua sanidade e manutenção (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016; CASTRO et al., 2014). As bactérias endofíticas trazem muitos benefícios às plantas, como o controle

biológico (LACAVA; AZEVEDO, 2013, 2014; AZEVEDO et al., 2000;; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001) feito por meio da competição de nutrientes ou com a produção de toxinas nocivas aos fitopatógenos (PAVLO et al., 2011). Além disso, elas são capazes de produzir ácido indol acético (AIA), solubilizar fosfato e realizar a fixação biológica do nitrogênio (BATISTA et al., 2018; BATISTA; QUECINE-VERDI; LACAVA, 2018; CASTRO et al., 2014, 2018b; DAWWAM et al., 2013; LACAVA; AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014)..

O potencial para a promoção de crescimento da planta, controle biológico de pragas e doenças e produção de enzimas por bactérias endofíticas é relatado em diversos trabalhos (LACAVA et al. 2018; BATISTA et al., 2018; CASTRO et al., 2018; CASTRO et al., 2014; LACAVA; AZEVEDO, 2013). Na íntima relação entre endófito e planta hospedeira também pode ocorrer produção de enzimas extracelulares que podem ser purificadas para uso em diferentes indústrias (SILVA et al., 2016), dentre elas as proteases, lípases e amilases.

Além disso, é importante conhecer a diversidade genética de bactérias endofíticas, não somente para compreender seu papel na interação com a planta hospedeira, mas também para sua aplicação biotecnológica (JALGAONWALA; MAHAJAN, 2011; MILIUTE et al., 2015).

Em adição aos aspectos econômicos e biotecnológicos, o estudo de micro-organismos endofíticos é de grande interesse acadêmico, pela possibilidade de descoberta de novas espécies microbianas, principalmente quando hospedeiros de regiões tropicais são investigados (AFFE; RIGONATO; NUNES, 2018; AZEVEDO et al., 2000; CASTRO et al., 2014).

Como resultado de estudos mais aprofundados de biologia e ecologia de micro-organismos endofíticos, pode-se destacar que eles podem conferir importantes características e, conseqüentemente, podem trazer benefícios para as plantas com as quais se associam. Pesquisas demonstram que bactérias endofíticas alteram propriedades anatômicas e fisiológicas das plantas, aumentam a resistência às condições de estresse, promovem o crescimento vegetal e reduzem os sintomas de doenças causadas por diversos fitopatógenos (BESERRA JÚNIOR et al., 2006; DIAS, 2011; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997b).

Os principais mecanismos pelos quais as bactérias endofíticas exercem seus efeitos são: a fixação de nitrogênio (AHEMAD; KIBRET, 2014), a produção de fitormônios, o controle biológico de fitopatógenos na zona da raiz, seja este pelo antagonismo direto da microbiota deletéria (por meio da produção de agentes antibacterianos e antifúngicos, produção de sideróforos e competição por nutrientes) ou pela indução de resistência sistêmica

no hospedeiro, e o aumento na disponibilidade de minerais (LODEWYCKX et al., 2002; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997b).

Além dos efeitos benéficos para as plantas, diversos compostos de interesse biotecnológico como, por exemplo, toxinas, antimicrobianos e outros metabólitos secundários, imunossuppressores, antitumorais, antioxidantes e enzimas, produzidos por microorganismos endofíticos também tem sido isolados e caracterizados. A expectativa é de que tais compostos sejam utilizados na medicina moderna, agricultura e indústria (BRADER et al., 2014).

A existência ubíqua das bactérias endofíticas nos tecidos dos seus hospedeiros vegetais sugere e permite especulações sobre suas possíveis origens, formas de penetração e de dispersão desses endófitos uma vez que a microbiota endofítica já foi estudada em diversas espécies de plantas, sendo os principais representantes encontrados amplamente distribuídos entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Podemos citar os gêneros: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*, *Agrobacterium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*, *Aminobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*, *Blastomonas*, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*, *Brenneria*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter*, *Zymomonas* (LODEWYCKX et al., 2002; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997b; WHITE et al., 2018) .

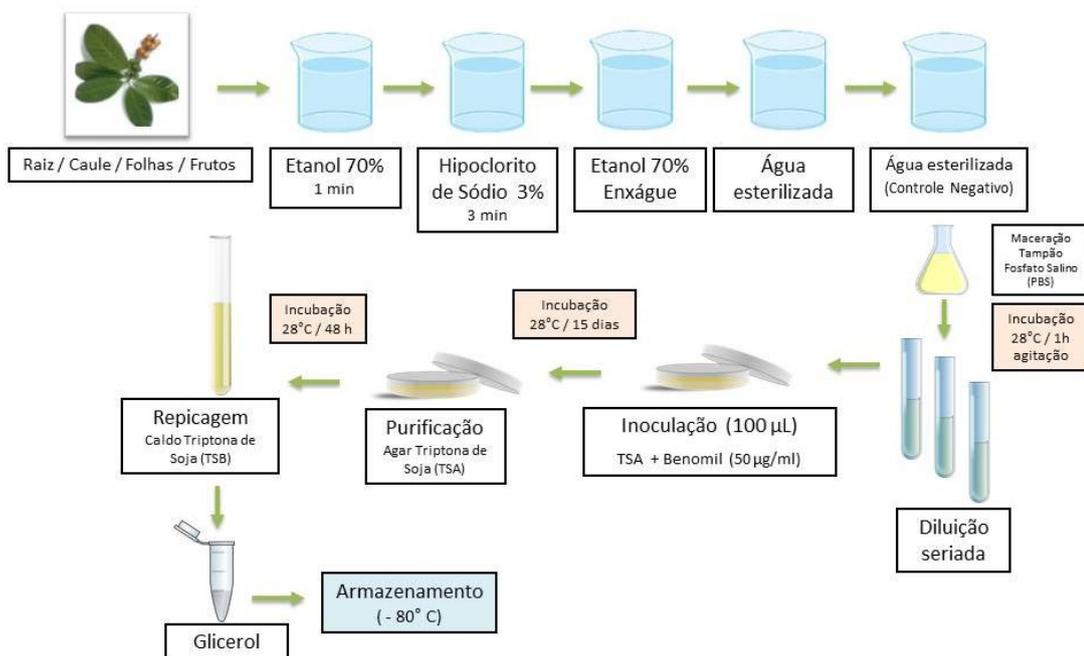
Essas bactérias endofíticas têm sido isoladas de uma ampla variedade de plantas (LODEWYCKX et al., 2002; MILIUTE et al., 2015; WHITE et al., 2018) de relevante importância agrônômica, a exemplo de algodão(SAAD; GHAREEB; SAEED, 2019), arroz (SHEN et al., 2019), batata (KÕIVID et al., 2019), café (NETO et al., 2017), cana-de-açúcar (DA SILVEIRA et al., 2019), canola (ROMERO et al., 2019), citrúrus (DAUNGFU; YOUNPENSUK; LUMYONG, 2019), feijão (TIRYAKI; AYDIN; ATICI, 2019), milho

(ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019), soja (ZHAO; XU; LAI, 2018), trigo (SANTOS et al., 2018), uva (VITULO et al., 2019), entre outras.

O procedimento de isolamento das bactérias endofíticas envolve cuidados especiais e é de fundamental importância para o enquadramento do organismo como um endófito. Teoricamente, qualquer procedimento que elimina a microbiota epifítica e retrata as populações internas de forma completa deve ser considerado (ARAÚJO et al., 2014).

Como o caráter endofítico é atribuído às bactérias isoladas, exclusivamente, a partir de tecidos vegetais sadios superficialmente esterilizados (HALLMANN et al., 1997; STONE; BACON; WHITE, 2000) os processos de desinfecção superficial são definitivos para manter o conceito e delimitar o habitat endofítico. Entretanto, erros podem advir como resultado de uma desinfestação incompleta da superfície, da adsorção de células bacterianas por estruturas celulares das plantas ou da penetração do agente esterilizante, no interior dos tecidos da planta, resultando em perda de endofíticos (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da desinfecção superficial de tecidos vegetais de cafeeiro, obtenção, purificação e armazenamento de bactérias endofíticas de café.



Fonte: Modificado de Araújo et al., 2014.

Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfestante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares de adequação da metodologia, para que apenas sejam eliminados os micro-organismos epifíticos. Além do processo de desinfestação superficial, as condições de cultivo

devem ser apropriadas e particulares para o grupo de endófitos que se deseja isolar. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, e a temperatura de incubação utilizada para o isolamento (ARAÚJO et al., 2014).

No entanto, o isolamento de bactérias a partir de tecidos superficialmente desinfestados demonstra apenas de forma indireta o caráter endofítico. A confirmação do estado endofítico do isolado é uma exigência que, obrigatoriamente, deve ser adotada como critério de reconhecimento da natureza endofítica do microrganismo (RYAN et al., 2008; STONE; BACON; WHITE, 2000). Faz-se necessário a demonstração da interação bactéria endofítica-planta *in loco* por meio de estudos microscópicos (FERREIRA et al., 2008; HALLMANN et al., 1997; QUECINE et al., 2012; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006) e a diferenciação entre a bactéria de interesse e a microbiota indígena. O uso do termo “endofíticos putativos” tem sido recomendado para classificar os isolados que não atendem a este critério (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

A localização *in situ* de bactérias endofíticas pode também ser avaliada associando-se às técnicas microscópicas imunológicas ou as moleculares, que empregam sondas construídas a partir de genes marcadores específicos (FENG et al., 2017; HARTMANN et al., 2019; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998). Adicionalmente, a fim de revelar o caráter endofítico, é recomendável avaliar a recorrência do isolado, o que significa avaliar sua capacidade de reinfetar plântulas livre de micro-organismos, (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006) e o reisolamento a partir do hospedeiro infectado.

Bactérias endofíticas em uma única planta hospedeira não são restritas a espécies únicas, mas compreendem diversos gêneros e espécies (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; LACAVA & AZEVEDO 2013). A diversidade associada a essas bactérias endofíticas existe não somente em relação às espécies de plantas colonizadas, mas também em relação às diferentes espécies colonizadoras; o que significa que plantas podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande variedade de bactérias endofíticas (LODEWYCKX et al., 2002; WHITE et al., 2018).

Em alguns casos, constata-se uma especificidade endófito-hospedeiro ou seleção da população endofítica por parte do hospedeiro (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006), em que poucas espécies são encontradas, mas uma variedade de gêneros e espécies está presente simultaneamente na maioria dos casos (FISHER; PETRINI; SCOTT, 1992; GARDNER; SENWO; DOWD, 2011; ZINNIEL et al., 2002).

Em razão das dificuldades inerentes relacionadas aos estudos de isolamento e

caracterização, associadas às limitações das tradicionais técnicas de cultivo, o conhecimento da biologia, ecologia e química das bactérias endofíticas evolui mais lentamente do que o desejado. Esse progresso do conhecimento, entretanto, tem demonstrado o potencial das bactérias endofíticas em diversos processos biotecnológicos e em sistemas de produção agrícolas (BOGAS et al., 2015; GARDNER; SENWO; DOWD, 2011).

Assim, a aplicação biotecnológica e agrícola desses micro-organismos tem aumentado substancialmente nos últimos anos, já que eles representam substitutos desejáveis de produtos químicos largamente utilizados, favorecendo, desta forma, a diminuição dos custos, aumento na produtividade e preservação do ambiente (JOHNSTON-MONJE et al., 2016; MARAG; SUMAN; GOND, 2018; OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018; SUBRAMANIAM; ARUMUGAM; RAJENDRAN, 2016).

1.6. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas podem conferir vantagens para a planta hospedeira por meio da promoção de crescimento vegetal e controle biológico (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; CASTRO et al., 2018a; KHARE; MISHRA; ARORA, 2018; LACAVAL; AZEVEDO, 2013; RYAN et al., 2008; SANTOYO et al., 2016). O efeito de promoção de crescimento vegetal atribuído às bactérias endofíticas pode ocorrer por meio da solubilização de fosfato (SF) (CASTRO et al., 2014; DINESH et al., 2015) fixação biológica de nitrogênio (FBN) (CASTRO et al., 2018a; QUECINE; BATISTA; LACAVAL, 2014), e produção de fitormônios (AIA) (ácido indol acético, citocinas, giberilinas, ácido abscísico, etileno) (BATISTA et al., 2018; QUECINE; BATISTA; LACAVAL, 2014)

A utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para a agricultura moderna enfrentar o desafio de promover o aumento da produção de culturas gerando sustentabilidade (LUZ et al., 2006).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) estimulam o crescimento da planta por meio de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, aumentam a resistência a doenças, melhoram a habilidade da planta de resistir aos estresses (CASTRO et al., 2014; LACAVAL; AZEVEDO, 2014; PAZ et al., 2012) .

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal podem estimular o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos como produção de substâncias ou metabólitos análogos a hormônios vegetais, como giberelinas, auxinas e citocininas

(QUECINE et al., 2012; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; SANTOYO et al., 2016) e por mecanismos indiretos; como antagonismo contra fitopatógenos pela produção de moléculas bioativas produzido pelo micro-organismos antagonico (AZEVEDO et al., 2000; CASTRO et al., 2014; PEIXOTO NETO ET AL., 2003; SANTOYO et al., 2016; LACAVA et al. 2018) .

O estudo dessas interações, micro-organismos-planta, permite a exploração para o aumento na produtividade agrícola e industrial, além de um melhor entendimento da ecologia microbiana e ambiental (CERDA et al., 2017; GUIMARÃES, 2009).

Bactérias endofíticas já foram isoladas a partir de diversas espécies de plantas (BOTTA et al., 2013; JI; GURURANI; CHUN, 2014; QUECINE et al., 2012; SILVA, 2015); em alguns casos, eles podem estimular o crescimento do hospedeiro por meio de diversos mecanismos, incluindo o controle biológico, a indução de resistência sistêmica à fitopatógenos, fixação biológica de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento e aumento de nutrientes minerais ou captação água (LACAVA; AZEVEDO, 2013, 2014; PROCÓPIO et al., 2009; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; SANTOYO et al., 2016).

No caso do café, é necessário lembrar que seus frutos (casca, polpa e semente) apresentam celulose, hemicelulose, pectinas, açúcares redutores, amido, óleos, proteínas, ácidos e cafeína. Isso faz com que bactérias, leveduras e fungos filamentosos se desenvolvam sendo supridos de carbono e nitrogênio (AMORIM, 1968).

A utilização de bactérias endofíticas para promoção de crescimento vegetal e inibição de fitopatógenos já é descrita como eficiente para outras culturas (CASTRO ET AL., 2018; HALMANN et al., 1997; LACAVA; AZEVEDO, 2013, 2014; STROBEL; DAISY, 2003) e podem apresentar resultados favoráveis para a cultura do café.

1.6.1. Solubilização de fosfato (SF)

O Fósforo (P), assim depois do Nitrogênio é o elemento mais importante na nutrição das plantas (VAN RAIJ, 1991). Esse elemento desempenha um papel importante em praticamente todos os principais processos metabólicos das plantas, incluindo fotossíntese, transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos, transdução de sinal, biossíntese macromolecular e respiração (GRANT et al., 2001; SAHARAN; NEHRA, 2011; SANTOYO et al., 2016). Embora o fósforo seja um dos macronutrientes menos requeridos pelas plantas, é

o mais usado na adubação, no Brasil, devido a sua forte interação com a fase sólida do solo, sendo essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente a parte aérea (SOUCHIE; ABBOUD, 2007).

As plantas necessitam de um fornecimento constante de fosfato durante toda a sua vida. No início do desenvolvimento as quantidades exigidas são pequenas, aumentando com o tempo, respondendo à limitação de fósforo estendendo as raízes secundárias, de modo a alcançar sítios mais distantes em busca do elemento ou exsudando ácidos orgânicos (FABIAŃSKA et al., 2019; WILLIAMSON et al., 2001). O P é abundantemente disponível em solos em ambas as formas orgânicas e inorgânicas. No entanto, as plantas são incapazes de utilizar o fosfato por que apenas uma pequena parte encontra-se disponível às plantas, cerca de 95-99% de fosfato nos solos está disponível na forma insolúvel. (AHEMAD; KIBRET, 2014; TEYMOURI et al., 2016). As plantas absorvem o P da solução do solo apenas em duas formas solúveis, os íons monobásicos (H_2PO_4^-) e dibásico HPO_4^{2-} . (GUPTA; PANWAR; JHA, 2013; TEYMOURI et al., 2016). Os teores de fósforo solúvel no solo são baixos, da ordem de 0,1 mg de P/L de solo, o que decorre da baixa solubilidade dos compostos e da alta capacidade de adsorção pelas partículas de solo. Com a ação do tempo e da temperatura o fósforo adsorvido passa da forma lábil para a não-lábil, havendo uma queda da eficiência relativa do fósforo aplicado (VAN RAIJ, 1991).

Para suprir deficiência de P nos solos, são realizadas aplicações frequentes de fertilizantes fosfatados em campos agrícolas. As plantas absorvem pequenas porções de fertilizantes fosfatados aplicados e o resto é rapidamente convertido em complexos insolúveis no solo (AHEMAD; KIBRET, 2014; SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018). A aplicação regular de fertilizantes de fosfato é dispendioso bem como ambientalmente indesejável, resultando na busca de uma alternativa ecologicamente segura e economicamente viável para melhorar a produção agrícola em solos de P baixos (LACAVA; AZEVEDO, 2013; MATOS et al., 2017; WALIA et al., 2017).

A utilização de processos biológicos está entre as possíveis medidas para evitar a deficiência nutricional das plantas, cuja maior reserva mineral ocorre nas rochas, ou na forma não disponível para as plantas (FABIAŃSKA et al., 2019; MATTHUS et al., 1991; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

Nesse sentido, a utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSF), se apresenta como uma alternativa viável ao uso de fertilizantes fosfatados químicos, fornecendo um melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (AWAIS et al., 2017). A solubilização do fósforo inorgânico ocorre como consequência da liberação de ácidos

orgânicos que são sintetizados por diferentes gêneros bacterianos (AHEMAD; KIBRET, 2014; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; YU et al., 2019; ZAIDI et al., 2015). Por outro lado, a mineralização do fósforo orgânico ocorre por meio da síntese de uma variedade de diferentes enzimas fosfatases, catalisando a hidrólise de ésteres fosfóricos (GLICK, 2012; RASHID; CHARLES; GLICK, 2012). É importante ressaltar que a solubilização e mineralização de fosfato podem coexistir na mesma estirpe bacteriana (TAO et al., 2008).

Assim, as bactérias solubilizadoras de fosfato facilitam a conversão de formas insolúveis de fósforo para as solúveis e o torna disponível para a planta (AHEMAD; KIBRET, 2014). O fósforo é essencial para o desenvolvimento das plantas uma vez que melhora o sistema radicular e a parte aérea das mesmas e sua disponibilidade é limitante para o crescimento dos vegetais (QIN et al., 2015; SOUCHIE; ABOUD, 2007). A utilização dessas bactérias é uma alternativa ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (FILHO; VIDOR, 2001; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), pode-se organizar os isolados com resultados positivos para solubilização de fosfato em três classes: Isolados com baixo potencial de solubilização ($ISF < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 < ISF < 3$) e com alto potencial de solubilização ($ISF > 3$).

Graças ao notável potencial desses micro-organismos, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. Entre os gêneros bacterianos que são conhecidos por terem esta capacidade, estão: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (BATISTA, 2012; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; CASTRO et al., 2014; GUPTA; PANWAR; JHA, 2013; SINGH et al., 2015; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

Assim, há interesse do uso desses micro-organismos como biofertilizante para maximizar o aproveitamento do fósforo existente no solo ou do adicionado como fertilizante (DUARTE et al., 2014).

Em suma, a importância das bactérias solubilizadoras de fosfato não está apenas no fato de contribuir para o crescimento das plantas, mas também para reduzir a necessidade ou maximizar o uso de fertilizantes manufaturados (BATISTA et al., 2018; CASTRO et al., 2018a; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

1.6.2. Fixação biológica do nitrogênio (FBN)

O nitrogênio é o elemento mais abundante do planeta, em sua forma molecular (N_2), constitui quatro quintos da atmosfera terrestre (NELSON; COX, 2014). O N é o elemento mineral mais demandado pelas plantas, desempenhando um papel em quase todos os processos metabólicos dos vegetais e essencial no desenvolvimento e produtividade das plantas. Este elemento é um componente responsável por várias reações além de fazer parte da constituição das bases nitrogenadas, aminoácidos e conseqüentemente das proteínas, estando presente também na molécula de clorofila e em outros pigmentos, demonstrando assim a sua importância na constituição de moléculas vitais para os organismos vivos (RAIJ, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2009). O seu fornecimento em quantidades adequadas estimula o crescimento, regulariza o ciclo e aumenta a produtividade das plantas (JI; GURURANI; CHUN, 2014).

A atmosfera é a mais importante fonte de nitrogênio, onde cerca 78% do ar atmosférico são constituídos por nitrogênio livre na forma de gás, no entanto o nitrogênio atmosférico, não é acessível nutricionalmente a todos os eucariotos (incluindo as plantas) e à maioria dos procariotos, sendo então limitada sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos, necessitando ser transformada em uma forma combinada para facilitar sua assimilação (AHEMAD; KIBRET, 2014; BRILL, 1977; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Dentre as principais fontes de nitrogênio no solo para a planta estão os materiais orgânicos mortos (de origem vegetal e animal), nos quais existe sob a forma de compostos orgânicos complexos, tais como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e nucleotídeos, fertilizantes industriais, sais de amônio e nitrato trazidos da atmosfera pelas chuvas e fixação biológica de nitrogênio (AHEMAD; KIBRET, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Esse processo biológico responsável pela redução do nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3) por meio de micro-organismos fixadores de nitrogênio é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN), (EADY; POSTGATE, 1974; FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). Este processo ocorre devido a presença de um complexo enzimático denominada nitrogenase, presente em bactérias diazotróficas. A nitrogenase é um complexo dependente de molibdênio, consistindo de duas metalo-proteínas, a ferro-proteína (Fe-proteína ou dinitrogenase redutase) e a ferro-molibdênio-proteína (FeMo-proteína ou dinitrogenase). A Fe-proteína é a componente doadora de elétrons e ligadora de nucleotídeos, enquanto a FeMo-proteína contém o sítio redutor do substrato (BULEN; LECOMTE, 1972; SILVA et al., 2018a). Deste modo, são incorporados íons H^+ abundantes nas células das bactérias a esta

amônia, ocorrendo à transformação em íons NH_4^+ , que serão distribuídos para a planta e incorporados na forma de nitrogênio orgânico (HUNGRIA et al., 1997).

Na natureza há um reduzido número de micro-organismos que são denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio. Esses micro-organismos são capazes de reduzir nitrogênio atmosférico a amônia e a esse processo dá-se o nome de fixação biológica do nitrogênio (FBN). É realizado pelo complexo proteico da nitrogenase, a enzima que catalisa a reação (EADY; POSTGATE, 1974).

A disponibilidade de nitrogênio em formas assimiláveis aos organismos vivos é um dos fatores mais limitantes no planeta, tornando a fixação biológica de nitrogênio o segundo processo biológico mais importante depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). Alguns gêneros bacterianos são capazes de capturar o nitrogênio atmosférico (N_2) e transformá-lo em N assimilável pelas plantas. Na agricultura, a FBN é explorada e se encontra comercialmente disponível para muitas culturas, como a soja, o feijão e o milho, na forma de inoculantes. Estima-se uma economia mundial de US\$ 6 bilhões anuais pela exploração da FBN em substituição à adubação nitrogenada mineral (MAPA, 2010).

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é uma alternativa tecnológica para aumentar a produtividade agropecuária e minimizar a emissão dos Gases de Efeito Estufa (GEE), contribuindo para atenuar os efeitos das mudanças climáticas. (DONG; INIGUEZ; TRIPLETT, 2003) Este processo tecnológico foi incluído no Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas visando à Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura, como parte do compromisso internacional assumido pelo Brasil, em 2009, de reduzir suas emissões de Gases de Efeito Estufa entre 36,1% e 38,9% até 2020 o que significa uma redução que gira em torno de 1 bilhão de toneladas de dióxido de carbono, principal gás de efeito estufa na atmosfera (MAPA, 2010; ZAMBUDIO; FERREIRA, 2012).

A capacidade de um isolado bacteriano crescer e formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio por duas inoculações sucessivas sugere a fixação biológica de nitrogênio por esse isolado bacteriano. A formação desta película é uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa a sua tensão; permitindo assim, uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência; proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio (ARAÚJO et al., 2014; PELZER et al., 2011a).

As bactérias de fixadoras de nitrogênio estão distribuídas entre distintos grupos taxonômicos e apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser classificadas de acordo com o modo de vida ou nutrição em: não simbióticas (vida livre, associativa e endófitas), contribuindo para o crescimento vegetativo sem a formação de estruturas diferenciadas tais como cianobactérias (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Azocarus* etc., ou em simbiose, incluindo membros da família *rhizobiaceae* que formam simbiose com plantas leguminosas (por exemplo, rizóbios), formando estruturas especializadas denominadas nódulos e árvores não leguminosas (por exemplo *Frankia*)(SINGH et al., 2015).

Bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de solo, raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola, como é o caso de cepas do gênero *Gluconacetobacter* que por meio da técnica de imunocaptura foram isoladas de amostras de solo cultivado com café (JI; GURURANI; CHUN, 2014; MOREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2006). A *Burkholderia vietnamiensis*, que é a única conhecida espécie fixadoras de nitrogênio deste gênero bacteriano, foi isolada de cafeeiros de diferentes regiões do México (SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001). Linhagens bacterianas tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, e *Pseudomonas* têm sido isoladas da rizosfera e também de raízes e partes aéreas do pinhão-mansão. Tais gêneros vêm sendo relatado de forma recorrente como fixadores de nitrogênio (AHEMAD; KIBRET, 2014; MOREIRA et al., 2010).

A FBN representa uma alternativa economicamente viável e ambientalmente sustentável diante dos fertilizantes químicos (AHEMAD; KIBRET, 2014; LACAVA; AZEVEDO, 2013; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001). A utilização dessas bactérias fixadoras de N pode representar uma grande estratégia para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e pode suprir parcialmente as necessidades de N requeridas por diversas culturas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor e a poluição ambiental (MOREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2018a).

1.6.3. Produção de ácido indol – acético (AIA)

Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham funções na regulação do crescimento em plantas

(DAWWAM et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2009).

As auxinas, do grego “crescer”, são uma classe de fitohormônios capazes de afetar o crescimento vegetal e, podem ser produzidos por plantas em ápices foliares, meristemas, frutos e sementes em desenvolvimento,(KÕIVID et al., 2019; QIN et al., 2015; TAIZ; ZEIGER, 2009), bactérias e fungos (BATISTA et al., 2018; ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014) .

A síntese do fitohormônio auxina (ácido indol-3-acético/ácido indol acético / IAA) por bactérias é conhecida há muito tempo. Elas são capazes de produzir tais metabólitos secundários, que possuem substâncias capazes de promover o desenvolvimento das plantas (BRADER et al., 2014; CASTRO et al., 2018a; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

A principal auxina encontrada em baixas concentrações nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA (SHARMA et al., [s.d.]) (SHARMA et al., 2003). O principal efeito das auxinas é a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). Entretanto, altas concentrações de hormônios podem causar a inibição da alongação celular afetando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A produção microbiana de ácido indol acético (AIA), é em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biosintéticas (PATTEN; GLICK, 1996). O L-triptofano (LTrp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e micro-organismos, e que a enzima chamada ipdC (indol-3-piruvato descarboxilase) é a enzima-chave para a biossíntese destes hormônios (GRAÇAS et al., 2015; LEBUHN; HARTMANN, 1993).

A habilidade de sintetizar auxinas é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas (BATISTA, 2012; ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015; KOCHAR; UPADHYAY; SRIVASTAVA, 2011; SANTOS et al., 2018). Diversos gêneros de bactérias associadas às plantas produtoras de AIA e relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal têm sido descritas pertencentes aos seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* podendo promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (AHEMAD; KIBRET, 2014; BATISTA, 2012; CHEN et al., 2017; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016; LACAVA; AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

1.6.4. Controle biológico microbiano

O aumento da produção de alimentos enfrenta muitos desafios sobre o sistema agrícola atual, já que essas necessidades alimentares devem ser atendidas a partir dos mesmos recursos atuais como terra, água, etc.(SAEEDI SARAVI; SHOKRZADEH, 2012). Um dos principais problemas enfrentados na agricultura são os prejuízos ocasionados por pragas e doenças. Em especial, as doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos são um fator limitante na produção agrícola, sendo responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes, cerca de 85% das doenças das plantas são causadas por fungos. Essas doenças propiciam queda de produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores (BUENO; FISCHER, 2006; ZAMBOLIM, 2016)

A utilização de fungicidas é o principal meio de controle das doenças, ocasionando melhorias significativas na produtividade e qualidade das culturas agrícolas nas últimas décadas, porém o uso excessivo e indevido de agroquímicos tem gerado problemas ao meio ambiente e a saúde pública (PAL; GARDENER, 2006). Entre os efeitos do uso indiscriminado desses produtos, destaca-se a toxicidade aguda e crônica, a contaminação de material e produtos de colheita, dos solos, da água, do ar, além da fauna, da flora e do homem. Segundo o Ministério da Saúde (MS), estima-se que, anualmente 400 mil pessoas são intoxicadas por agrotóxicos no Brasil, com cerca de 4 mil mortes por ano (LIMA BOHNER; ARAÚJO; NISHIJIMA, 2013).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para prevenir, mitigar ou controlar as doenças das plantas. Nesse sentido, a busca por novas práticas de proteção vegetal surge como alternativa aos agroquímicos, entre elas estão a prática de controle biológico (ARAÚJO et al., 2014; AZEVEDO et al., 2000; SAITO et al., 2009) .

É neste cenário que a utilização de micro-organismos para controle biológico passa a ser apontada como uma alternativa viável para sistemas de produção agrícola ecológica e economicamente sustentáveis (COMPANT et al., 2005; GAMEZ et al., 2019).

Os micro-organismos endofíticos colonizam um nicho ecológico que pode ser semelhante àquele ocupado por fitopatógenos. Isto permite que esses micro-organismos sejam usados como agentes de controle biológico de doenças atuando diretamente sobre o patógeno no interior da planta hospedeira, por antagonismo, e/ou por competição por nutrientes (ARAÚJO et al., 2014; AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; HALLMANN et al., 1997; LACAVA; MELO; PEREIRA, 2018)

Os micro-organismos endofíticos também são considerados reservatórios de novos metabólitos secundários e oferecem um potencial para a exploração médica, industrial e agrícola (STROBEL; DAISY, 2003).

Essa forma de controle natural e biológico de pragas e doenças que afetam plantas cultivadas ganhou muita atenção nas últimas décadas como uma forma de reduzir o uso de agrotóxicos na agricultura. O biocontrole tem sido frequentemente utilizado em países tropicais, como o Brasil, e é apoiada pelo desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada (LACAVA et al. 2018; LACAVA & AZEVEDO, 2014; AZEVEDO et al. 2000).

Neste contexto, os micro-organismos endofíticos tropicais têm atraído uma atenção especial para desenvolver suas funções para o controle de doenças de insetos pragas e de plantas (LACAVA; AZEVEDO, 2014). O uso de micro-organismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento tem sido considerada uma potencial alternativa viável para sistemas de produção agrícolas ecológica e economicamente sustentáveis (COMPANT et al., 2005; OUBAHA et al., 2019; SOARES et al., 2010).

Geralmente, bactérias e fungos endofíticos desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta ao meio em que ocorrem. Embora, possam ser confundidos com patógenos latentes, estudos têm demonstrado que, em muitos casos, existe uma importante interação simbiótica com o hospedeiro, a qual envolve a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitorreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal. Concomitantemente, os endófitos encontram na planta um habitat com nutrientes e com menor competição com outros micro-organismos (AZEVEDO et al., 2000; LACAVA; AZEVEDO, 2014; PEIXOTO NETO ET AL., 2003; SILVA et al., 2018b).

A capacidade de sobreviver no interior do vegetal é uma vantagem para os micro-organismos endofíticos, já que não estão expostos às adversidades ambientais e encontram pouca ou nenhuma competição. Essa condição os tornam candidatos a testes para controle biológico (AZEVEDO et al., 2000; MISAGHI, 1990; SILVA et al., 2018b).

Com o aumento de informações a respeito da interação planta-endófitos, o estudo de micro-organismos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeras doenças e pragas tem recebido uma atenção especial (SILVA et al., 2018b; ZHAO; XU; LAI, 2018).

Muitos processos biológicos que ocorrem na fisiologia, bioquímica e microbiologia, tem potencial para dar as condições biotecnológicas no controle de doenças agrícolas (PINOTTI; SANTOS, 2013; SANTOYO et al., 2016).

A ação de micro-organismos endofíticos com potencial de biocontrole pode ser direta

ou indireta. A ação direta consiste na interação entre o agente de biocontrole e o agente fitopatogênico, tal como a inibição do agente fitopatogênico. O biocontrole pode ser classificado em quatro categorias: (1) antibiose, (2) competição por espaço e nutrientes, (3) parasitismo, e (4) de indução de resistência sistêmica (CHENNIAPPAN et al., 2019; LACAVALA et al. 2018; HANDELSMAN; STABB, 1996).

A ação indireta de biocontrole pode ser considerada como a ocupação de espaço por um endófito no interior de uma planta hospedeira que impede que um fitopatógeno se estabeleça (GRIFFIN, 2014).

O biocontrole por antibiose ocorre por meio da produção de antibióticos por estes micro-organismos endófitos, mas também se aplica a qualquer composto metabolizado capaz de matar, inibir o crescimento ou a reprodução de micro-organismos fitopatogênicos. Um exemplo deste mecanismo é a produção de enzimas que degradam a parede celular destes fitopatógenos (GRIFFIN, 2014; ZHAO; XU; LAI, 2018).

O mecanismo mais importante de controle biológico de doenças é por meio da indução de resistência sistêmica (IRS). Neste tipo de controle, a penetração ativa do micro-organismo endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal. O aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira são exemplos de alterações morfológicas e fisiológicas que podem ocorrer (PEIXOTO NETO ET AL., 2003; SILVA et al., 2018b).

Diferentes linhagens de bactérias endofíticas, pertencentes a diferentes filos do domínio *Bacteria*, apresentam atividade antagonista contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole e manejo integrado de doenças e pragas agrícolas (ASSUMPÇÃO et al., 2009; BERG et al., 2005; HARON et al., 2019; LEONARDO INIGUEZ et al., 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004).

Várias espécies de *Bacillus* são descritas como antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (BATISTA JUNIOR et al., 2002; FANTINEL et al., 2018; VIEIRA et al., 2016).

O gênero *Bacillus* mesmo não sendo superior em relação à sua atividade biocontroladora quando comparado com outros gêneros bacterianos, tem grande vantagem em relação aos outros, devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a agroquímicos, fertilizantes e ao tempo de

estocagem, permitindo, portanto, sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de folhas na forma de sprays (BACKMAN; WILSON; MURPHY, 1997; DORIGHELLO, 2017). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (BATISTA et al., 2018; DORIGHELLO, 2017).

Diferentes linhagens de bactérias endofíticas apresentam atividade antagonista contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole e manejo integrado de doenças e pragas agrícolas (ASSUMPÇÃO et al., 2009; PELZER et al., 2011b; SUBRAMANIAM; ARUMUGAM; RAJENDRAN, 2016).

Estudos com o objetivo de avaliar a atividade biológica de micro-organismos endofíticos, a fim de se obter novos compostos bioativos vêm sendo conduzidos e resultados muito promissores têm sido alcançados; principalmente com potencial para o biocontrole de micro-organismos fitopatogênicos (EL-DIN HASSAN, 2017; LACAVA; AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; SILVA et al., 2012a).

1.6.5. Fungos fitopatogênicos

Micro-organismos, tais como fungos, bactérias e vírus são responsáveis por ocasionarem doenças em plantas. (PERNEZNY et al., 2014). Os micro-organismos fitopatogênicos normalmente interagem com o hospedeiro, invadindo seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizar a planta, retiram desta todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (BATISTA et al., 2007).

Fungos fitopatogênicos, em especial, são responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes. Cerca de 85% das doenças das plantas são causadas por fungos, e ocasionam sérias doenças e, dependendo do fitopatógeno, ocasionam lesões nos órgãos de reserva (frutos, sementes, etc.), no caule, nas raízes, no sistema vascular (xilema), tombamento de plântulas ou plantas bem desenvolvidas e podem levar as plantas a morte (PERNEZNY et al., 2017).

Essas doenças geram queda de produção e prejuízos financeiros para os produtores (BUENO; FISCHER, 2006), além de estarem associadas à indução do apodrecimento de frutas e verduras pós-colheita, o que diminui o conteúdo nutricional e a utilização destes alimentos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014).

Os fungos fitopatogênicos são identificados, em sua maioria, pelos sintomas que

provocam e pelos sinais presentes no hospedeiro, que são facilmente observados em campo, tais como manchas foliares, podridões, ramos secos, exsudações, entre outros (BATISTA et al., 2007; LUCINI; PUTZKE, 2015).

Na cultura do café, as doenças provocadas por fungos representam o maior empecilho à uma produção estável em altos níveis de produtividade e qualidade. Os patógenos da parte aérea das plantas e da rizosfera exercem um papel de destaque para a sanidade da cultura, uma vez que espécies do gênero *Fusarium* podem agir como patógenos do sistema radicular ou vascular, mas ocorrem também na forma de endofíticos, sem causar alterações visíveis na planta hospedeira (MESQUITA et al., 2016; MIRANDA, 2007).

A associação de fitopatógenos com sementes pode afetar, de forma severa, a qualidade fisiológica e sanitária dessas. Muitos desses fungos afetam a germinação das sementes e podem ser transmitidos à progênie resultante, podendo se estabelecer no campo de cultivo e causar redução na qualidade e produtividade das culturas (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2014; MESQUITA et al., 2016).

Um grande número de patógenos fúngicos associados ao cafeeiro, causando sérias perdas econômicas nas principais regiões produtoras de café no país, tem sido relatados (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; MESQUITA et al., 2016; MIRANDA, 2007; ZAMBOLIM, 2016).

A ferrugem (*Hemileia vastatrix*), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), a mancha-de-phoma (*Phoma* sp) e a mancha-de-ascochyta (*Ascochyta coffeae*) destacam-se como as mais presentes nos cafezais. Estimativas de perdas, em função da intensidade da ferrugem e da cercosporiose, são registradas em 35% e 40%, na ausência de medidas de controle (ZAMBOLIM, 2016). Em outros relatos, estimativas referentes à mancha-de-phoma, variam de 15% a 43% da produção, em condições favoráveis à doença.

1.7. Doenças do cafeeiro

1.7.1. Mancha manteigosa

A mancha manteigosa é uma doença fúngica causada pelo agente *Colletotrichum gloeosporioides* e foi constatada pela primeira vez no Brasil em cafezais do Sul de Minas. Os sintomas dessa doença são percebidos nas folhas do cafeeiro, na forma de pequenas manchas

arredondadas, de cor verde clara, com aspecto oleoso, distribuídas uniformemente sobre o limbo foliar. Nos frutos e ramos atacados notam-se lesões deprimidas e necróticas, de cor marrom clara, de bordos irregulares e tamanho de 2 a 3 milímetros.(PEREIRA et al., 2005)

A doença causa desfolha e seca apical dos ramos, chegando a provocar a morte descendente das plantas atacadas.(MESQUITA et al., 2016)

1.7.2. Fusariose

A fusariose, também conhecida por murcha vascular, é uma doença que ataca o cafeeiro, causada pelo fungo *Fusarium spp.* Até recentemente considerada como de importância secundária, ultimamente vem adquirindo maior relevância, com prejuízos principalmente em viveiros. (ZAMBOLIM, 2016)

O fungo é mais facilmente encontrado em solos (ou manchas de solo) com acidez mais elevada. Pode também ser transmitido por sementes contaminadas ou ser encontrado em substratos em viveiros. Mudanças aparentemente saudáveis, sem sintomas evidentes, podem estar contaminadas, sendo que os sintomas poderão aparecer, posteriormente, na lavoura.(PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; ZAMBOLIM, 2016)

No viveiro, a infecção pode ocorrer nas mudas, desde a fase de emergência, na forma de manchas escuras no hipocótilo, podendo evoluir para a extremidade do “palito”, o qual toma aspecto de um palito de fósforo queimado, com morte da plântula. Quando a infecção ocorre em uma fase posterior, os sintomas se apresentam sob a forma de lesões necróticas, claras ou escuras, que circundam o caule, a partir do nível do solo, e evoluem em direção ao ápice, retardando o crescimento, podendo levar as mudas à morte. Nesse caso, é necessária a eliminação daquelas com sintomas da doença ou até mesmo de todo o viveiro, se a ocorrência for generalizada, uma vez que não há um tratamento curativo eficaz. (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009)

A característica principal é o murchamento seguido da morte do terço superior do cafeeiro, permanecendo ainda verde a parte inferior. Além da seca do ponteiro, pode ocorrer o engrossamento do caule na região do colo e morte de plantas. (MESQUITA et al., 2016).

Figura 4 - Cafeeiro acometido por fusariose com murchamento do terço superior da planta.



Fonte: www.cafepoint.com.br.

1.8. Potencial biotecnológico: Produção de enzimas microbianas

As enzimas podem ser encontradas tanto em células de tecidos animais, vegetais e microbianas. Nestas, tornam-se uma opção atrativa, devido a ampla disponibilidade, baixo custo de produção, condições suaves de síntese, ampla especificidade pelo substrato, diferentes características físico-químicas e suscetibilidade de manipulação genética (LIU; KOKARE, 2017). Apresentam um elevado interesse biotecnológico como processamento de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis e produtos farmacêuticos, terapia médica e biologia molecular (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006b; NIGAM, 2013).

As enzimas são em sua maioria proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas de forma seletiva como parte do processo essencial da vida, tais como digestão, respiração, metabolismo e manutenção de tecidos. Em outras palavras, são catalisadores biológicos altamente específicos sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico (NELSON; COX, 2014).

Os micro-organismos endofíticos são considerados um reservatório para novos metabólitos secundários, apresentando grande potencial para a exploração médica, industrial e agrícola, (LACAVA; AZEVEDO, 2013; STROBEL; DAISY, 2003). As enzimas de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, médica e agrícola, devido à facilidade de produção em larga escala. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido e não estão sujeitas às limitações de produção ou de

suprimento (HOUFANI et al., 2019; LIU; KOKARE, 2017). Além disso, estas enzimas também têm elevado interesse biotecnológico, tais como processamento de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis e produtos farmacêuticos, terapia médica e biologia molecular (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006b; FACCHIN et al., 2013; LIU; KOKARE, 2017).

Os micro-organismos transportam nutrientes, como compostos de baixa massa molecular, por meio da membrana plasmática. Para tal, eles secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulases e proteases, importantes para diversos processos com promissoras aplicações industriais. Enzimas de micro-organismos endofíticos já foram estudadas, incluindo algumas com potencial aplicação na indústria, como as amilases, proteases e outros (ARAÚJO; MARTINS, 2018; FLORES-FERNÁNDEZ et al., 2019; HOUFANI et al., 2019; LIU; KOKARE, 2017).

A utilização de enzimas tais como amilases, lípases, proteases e celulases é bastante ampla nas indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, têxtil e no tratamento de resíduos (MEHDIPOUR-MOGHADDAM et al., 2010). Logo, os estudos com enzimas vêm crescendo e moléculas com maior eficiência têm sido obtidas principalmente a partir de micro-organismos e sugerem que as bactérias endofíticas poderão ser utilizadas, como produtoras de enzimas degradativas, para controlar certas doenças de plantas ou decompor produtos úteis (CASTRO et al., 2014; FACCHIN, 2013; HOUFANI et al., 2019; LIU; KOKARE, 2017).

Como exemplo nas células vegetais, o amido é um polissacarídeo de reserva energética e muitos micro-organismos produzem amilases, que degradam esse polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares (ARAÚJO; MARTINS, 2018). Sua aplicação industrial pode servir como aditivos em detergentes, na sacarificação de amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Assim, a busca de micro-organismos amilolíticos se justifica pelo amplo espectro de utilização de amilases em várias áreas industriais.

As lipases e esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de micro-organismos (EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2013; FACCHIN et al., 2013). As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com potencial para aplicações biotecnológicas (CASTRO et al., 2014).

As principais aplicações envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas. Espécies de *Bacillus* e uma variedade de gêneros tais como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, têm se destacado na produção de lipases (LIU; KOKARE, 2017; LUZ et al., 2016; PAMPHILE et al., 2017; PÉREZ et al., 2019).

As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas e participam em inúmeros processos fisiológicos com várias aplicações nas indústrias de detergente e de alimentos. Com intuito de diminuir a quantidade de poluentes relacionados ao tratamento de couro, a utilização de proteases se apresenta como uma saída “ambiental” na substituição da utilização de compostos tóxicos e poluentes. As proteases originadas de micro-organismos têm gerado maior interesse pelas indústrias, uma vez que, seu processamento pode ser realizado em grande escala no laboratório (NIGAM, 2013; PAMPHILE et al., 2017).

Considerando que o sucesso da descoberta de novos produtos consiste, principalmente, em obter e descrever novos micro-organismos torna-se imprescindível sua busca em ambientes e condições ainda pouco explorados (SHIOMI et al., 2006).

Vários trabalhos descrevem bactérias endofíticas com potencial biotecnológico para a produção de enzimas isoladas de abacate (PRASAD; DAGAR, 2014); arroz (MEHDIPOUR-MOGHADDAM et al., 2010); guaraná (BATISTA et al., 2018); jacarandá (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006b); manga (KANNAN; DAMODARAN; UMAMAHESWARI, 2015); mangue (CASTRO et al., 2014); morango (DIAS et al., 2009); plantas medicinais (EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2013; JALGAONWALA; MAHAJAN, 2011); soja (ASSUMPÇÃO et al., 2009); tomate (MINOTTO et al., 2014a). Dentre as enzimas líticas produzidas por micro-organismos endofíticos, destacam-se as quitinases, as β -1,3-glucanases, as celulases, lipases e proteases que são capazes de degradar constituintes das paredes de fungos fitopatogênicos (STROBEL; DAISY, 2003).

1.9. Estudo da diversidade genética bacteriana

A diversidade das comunidades bacterianas presentes nos diferentes ecossistemas, bem como as associadas a plantas é praticamente desconhecida, e, portanto, merece atenção e incentivo no que se refere aos estudos de biodiversidade, importância ecológica e aplicação

tecnológica (CERQUEIRA et al., 2019; RYAN et al., 2008).

Os micro-organismos são as formas de vida mais antigas, diversas e abundantes sobre a Terra, compreendendo larga porção da diversidade genética presente em diferentes ecossistemas. Apesar da alta diversidade, seu impacto sobre os processos ecológicos ainda é pouco entendido (CASTRO et al., 2014).

Eles possuem uma grande variabilidade genética que ocorreu durante a sua evolução, o que lhes confere a capacidade de adaptação a diversos ambientes. Porém, algumas regiões do seu genoma foram conservadas, permitindo seu estudo taxonômico por meio de técnicas moleculares (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018; SEGHERS et al., 2004).

O sequenciamento de genes *housekeeping* é utilizado em estudos populacionais e de identificação. Essa ferramenta é utilizada pois esses genes são altamente conservados e possuem diferentes domínios, alguns conservados e outros variáveis. Ao comparar as espécies, as regiões conservadas são utilizadas como molde para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores, o que torna possível a amplificação da região por PCR. Já as regiões variáveis permitem a distinguir filogeneticamente os micro-organismos (BARKEN; HAAGENSEN; TOLKER-NIELSEN, 2007; CORREA-GALEOTE; BEDMAR; ARONE, 2018; JANDA; ABBOTT, 2007; WALLACE; MAY, 2018). Assim, pode-se proceder a identificação de micro-organismos ao nível de gênero e possivelmente ao nível de espécie (CHÈNEBY et al., 2000).

Baseados na sequência dos genes ribossomais, Woese et al., (1990), sugeriram uma nova classificação dos seres vivos, até então classificados em cinco reinos (WHITTAKER, 1969; WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990). Em procariotos, o gene mais analisado é o 16S rDNA fundamental para o estudo molecular de bactérias e arqueias, onde é considerado como cronômetro evolutivo (CORREA-GALEOTE et al., 2016; MEHNAZ; MALIK, 2016; OAKLEY et al., 2014; PEREIRA et al., 2006). Este gene apresenta poucas variações nas diferentes espécies ao longo dos seus quase 1,4 Kb. É geneticamente estável e apresenta um tamanho suficiente para análises filogenéticas (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018; SEGHERS et al., 2004).

O sequenciamento do gene 16S rDNA pode permitir a identificação de micro-organismos ao nível de gênero e também ao nível de espécie, e ainda possibilita fazer correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHÈNEBY et al., 2000; SAXENA et al., 2016).

O rDNA bacteriano é objeto de grande número de estudos e apresenta diversas aplicações em genética, evolução e filogenia. Os genes ribossomais são considerados

cronômetros evolutivos (ASSUMPCÃO et al., 2009; WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990), uma vez que se compararmos suas sequências em diferentes organismos é possível fazer inferências filogenéticas entre os mesmos. A presença desses genes em todos os seres vivos e sua conservação, do ponto de vista evolutivo, torna isto possível. Em contrapartida apresentam regiões com variações de nucleotídeos nas diferentes espécies, o que permite comparações mesmo entre organismos filogeneticamente distantes (BRÍGIDO et al., 2019; NETO et al., 2017).

1.9.1. Caracterização proteômica

1.9.1.1. Identificação de bactérias por MALDI-TOFI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Fligh*)

A técnica de espectrometria de massa e análise pelo *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Fligh* (MALDI-TOF) está sendo utilizada para identificação bacteriana principalmente para amostras clínicas, devido a rapidez da identificação e baixo custo da análise, o que vem motivando diversos grupos de pesquisas no Brasil e exterior a testar esta técnica para identificar isolados bacterianos que não tenham uma origem clínica (MANIKANDAN; HUA; WU, 2014).

A Espectrometria de Massa (MS) é uma metodologia capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa. Basicamente, o espectrômetro de massa é um equipamento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (ANGELETTI, 2017a; PEREIRA et al., 2015). Uma das fontes de ionização empregadas em MS é a *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI), que ioniza as moléculas de forma branda, preservando a estrutura polipeptídica, e transfere as moléculas a serem analisadas para a fase gasosa (ANGELETTI, 2017a; CAMERON et al., 2018).

Basicamente, a amostra é colocada juntamente com uma matriz, sobre uma placa de metal e seca ao ar. A matriz e a amostra do analito co-cristalizadas são então colocadas no interior do equipamento e bombardeadas com laser. A matriz absorve os ftons e os transfere à amostra, o que leva à vaporização e ionização da amostra.

Geralmente as moléculas são ionizadas com uma única carga. Como os analisadores separam as moléculas pela razão massa/carga, espectros relativamente simples são gerados

devido à ionização branda pelo MALDI-TOF, que produz menor fragmentação dessas biomoléculas em comparação com outras técnicas de ionização. Assim, o espectrômetro de massa primeiro ioniza, então separa os produtos e finalmente detecta os íons associados com o analito produzindo um espectro de massas. (ANGELETTI, 2017a; KEYS et al., 2004; MANIKANDAN; HUA; WU, 2014).

Além disso, o espectro obtido é bastante reprodutível, o que aliado à simplicidade e rapidez da metodologia, tem contribuído para tornar o MALDI-TOF MS popular entre os microbiologistas (ANGELETTI, 2017b; ISABEL et al., 2013; PAIM et al., 2013).

O desenvolvimento de técnicas, como a MALDI-MS (*matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry*) e ESI MS (*electrospray ionization mass spectrometry*), permitiu a análise e caracterização de proteínas, por meio de sua ionização (ANGELETTI, 2017a; BOURASSA; BUTLER-WU, 2015).

Uma nova técnica de espectrometria de massas possibilitou a sua utilização na identificação bacteriana, a espectrometria de massas de dessorção/ionização por laser assistida por matriz tempo-de-voo (MALDI-TOF MS). Esta técnica é caracterizada pela análise de todas as proteínas de uma determinada amostra, as quais são “jogadas”, em uma forma ionizada, dentro de uma câmara que avalia o tempo de voo de cada proteína de acordo com a sua massa e carga. O sistema é acoplado com um banco de dados com o perfil proteico de uma grande quantidade de bactérias, assim ele compara os dados obtidos das amostras analisadas e os dados do banco, e identifica as amostras (JORDANA-LLUCH; MARTRÓ CATALÀ; AUSINA RUIZ, 2012).

A técnica baseada em perfis de proteínas por MALDI-TOF MS (Matriz assistida de laser de dessorção/ionização de tempo de voo em espectrometria de massa) tem se consolidado como ferramenta valiosa para a identificação e classificação de microorganismos. Esta técnica se baseia no fato de que espécies distintas apresentam variações no seu perfil de proteínas, as quais podem ser detectadas pela análise dos perfis protéicos obtidos (BOURASSA; BUTLER-WU, 2015; DE RESPINIS et al., 2010).

A espectrometria de massas tipo MALDI-TOF vem sendo crescentemente utilizada para a identificação de microorganismos ao nível de gênero, espécie e estirpe (CARBONNELLE et al., 2011; GAUDREAU et al., 2018; MURRAY, 2010).

Tem sido aplicada para a análise de células bacterianas íntegras, bem como de extratos preparados a partir das colônias bacterianas (BÖHME et al., 2011).

Os biomarcadores bacterianos mais frequentemente analisados pelo MALDI-TOF são proteínas, embora existam relatos de análises de DNA e RNA. Cada molécula detectada é

caracterizada de acordo com a massa molecular (m) e a carga (z), a razão massa/carga (m/z) e a intensidade relativa de sinal (ANGELETTI, 2017a; CARBONNELLE et al., 2011; ELBEHIRY et al., 2016).

O espectro detectado é único para cada microorganismo analisado, com vários picos que correspondem as proteínas mais abundantes como as proteínas ribossomais e “*heat shock*” (ELBEHIRY et al., 2016; SAUER et al., 2008; SAUER; KLIEM, 2010). Os espectros têm sido amplamente estudados, a fim de estabelecer padrões para diferentes espécies e possibilitar a identificação bacteriana (BÖHME et al., 2011).

O MALDI-TOF está sendo apontado como um potencial substituto para as metodologias atualmente utilizadas na rotina laboratorial (BIZZINI; GREUB, 2010; CARRILLO; DURÁN, 2019; DEL CHIERICO et al., 2014).

Esta técnica permite que a identificação bacteriana seja realizada em poucos minutos, ao contrário das técnicas de microbiologia clássica, baseadas na cultura de microorganismos, que podem requerer vários dias para a obtenção do resultado. Também apresenta vantagens em relação aos métodos moleculares, como a simplicidade do preparo da amostra, menor custo e a rapidez na obtenção do resultado. Além disso o MALDI-TOF é extremamente sensível, podendo detectar um sinal gerado de uma amostra que contém cerca de 10^4 a 10^7 células bacterianas (SAUER et al., 2008).

Assim a tecnologia de MALDI-TOF tem o potencial para se tornar o método de escolha em microbiologia clínica e ambiental, fornecendo resultados precisos e rápidos (ANGELETTI, 2017a; BÖHME et al., 2011; CARRILLO; DURÁN, 2019). O tempo de análise é inferior a 5 minutos por amostra, para ensaios com células íntegras. Além disso, a metodologia pode ser automatizada (DONOHUE et al., 2006; MAUGERI et al., 2019; WEILE; KNABBE, 2009) é custo-eficiente (WEILE; KNABBE, 2009) sendo que cada análise pode custar cerca de um quarto do valor das metodologias convencionais (BIZZINI; GREUB, 2010) e o preparo da amostra é simples (DONOHUE et al., 2006).

1.10. Rizobactérias

Por definição, a rizosfera é a zona de contato entre o solo e as raízes das plantas, sendo um importante nicho microbiológico, onde podem ser encontrados fungos, bactérias, nematoides, protozoários, algas, vírus, artrópodes e archaea. Esta zona representa uma região rica em nutrientes devido a liberação de exsudados e outros compostos das raízes para o solo

(BATISTA, 2012; GRAÇAS et al., 2015; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Assim, o termo "rizosfera" foi conceituado pelo cientista alemão Lorenz Hiltner em 1904. Hiltner ficou convencido de que exsudados liberados das raízes de diferentes plantas sustentam o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas. Sua definição da "rizosfera" no ano de 1904 centrou-se na ideia de que a nutrição das plantas é consideravelmente influenciada pela composição microbiana da rizosfera (COSTA; MELLONI, 2019; HARTMANN; ROTHBALLER; SCHMID, 2008; LOZANO et al., 2019).

Além de fornecer o suporte mecânico e facilitar a absorção de água e nutrientes, as raízes das plantas também sintetizam, acumulam e segregam uma diversidade de compostos, que são utilizados pelos micro-organismos a fim de se multiplicarem, colonizando o ambiente, tal processo é conhecido como rizodeposição (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Esses micro-organismos também podem oferecer substâncias de interesse da planta, essa relação benéfica propicia uma alta densidade de micro-organismos ao redor das raízes. (MENDES et al., 2017). A rizodeposição de vários exsudatos modifica as propriedades químicas e físicas do solo, favorecendo a abundância e atividade rizosférica, formando um habitat microbiano do solo mais ativo (AHEMAD; KIBRET, 2014; BATISTA JUNIOR et al., 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A composição das comunidades microbianas que colonizam a rizosfera são influenciadas principalmente pelas espécies e pelo estágio de desenvolvimento das plantas, bem como pela estrutura do solo (BASTIDA et al., 2019; BROECKLING et al., 2008; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dentre os micro-organismos localizados na rizosfera, as bactérias são as que possuem mais abundância, ocupando cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes. O número de bactérias que habitam a rizosfera gira em torno de 10^9 células g^{-1} de solo, e nesta fração de solo podem ser encontrados de 10 a 1000 vezes mais micro-organismos do que no solo não rizosférico (GRAY; SMITH, 2005; PREECE et al., 2019)

As interações planta-microrganismo, podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, neutras ou prejudiciais à planta (GRAY; SMITH, 2005). Das diversas rizobactérias existentes, destacam-se as denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento das Plantas (RPCP) ou "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)". Este termo foi proposto pela primeira vez por Kloepper e Schroth (1978) para descrever bactérias de vida livre no solo capazes de colonizar as raízes influenciando a fisiologia do crescimento das plantas, podendo oferecer muitos benefícios às plantas (KLOEPPER; SCHROTH, 1981).

As maneiras pelas quais as RPCP podem favorecer o crescimento e desenvolvimento da planta, coincidem com as estratégias utilizadas pelas bactérias endofíticas, como: fixação biológica do nitrogênio, síntese de sideróforos, produção de hormônios reguladores de crescimento vegetal como o ácido indol acético (AIA) e pela solubilização de fosfato (COSTA; MELLONI, 2019; GUPTA et al., 2015; POSADA et al., 2007). Essas bactérias também podem conferir resistência a diversos fitopatógenos por meio da competição de nutrientes, indução de resistência sistêmica, produção de compostos antimicrobianos ou por produção de enzimas e outros metabólicos que interferem no desenvolvimento dos patógenos (COSTA; MELLONI, 2019; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). Esses micro-organismos também apresentam enorme potencial como fonte de obtenção das enzimas com interesse biotecnológico (LUZ et al., 2016; SILVA et al., 2018a).

Independentemente dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, as RPCP devem colonizar a rizosfera em volta das raízes, o rizoplano (superfície da raiz) ou a raiz (dentro dos tecidos radiculares). A colonização da bactéria na rizosfera é essencial para o estabelecimento e o desenvolvimento das comunidades microbianas associadas às raízes (FARINA, 2012).

A rizosfera é um ambiente altamente competitivo para que os micro-organismos ocupem espaços e obtenham nutrientes (DUARTE et al., 2014; RAIJ, 2011). Portanto, esses organismos, potencialmente benéficos ou patogênicos, que são altamente competitivos na colonização de tecidos vegetais e na obtenção de nutrientes, irão colonizar este microambiente e, possivelmente, ter um efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOARES et al., 2010).

Os primeiros estudos comprovando os efeitos benéficos das RPCP para a agricultura já haviam sido comprovados em 1958 na antiga União Soviética, quando foi observado um incremento de 10 a 20% na produtividade de algumas culturas, por meio da inoculação de bactérias não simbiotes (BROWN, 1974; GRAÇAS et al., 2015).

De acordo com Gray e Smith (2005) podemos classificar as RPCP das seguintes maneiras:

- iPGPR - bactérias que habitam o interior das células vegetais e produzem nódulos, estruturas especializadas na fixação de nitrogênio em leguminosas. As espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos em solos que pertencem a essa categoria, tais como *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*.

- ePGPR - Bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, não produzindo nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas. Podem ser incluídas nesta categoria as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Burkholderia*.

O estudo da diversidade dos grupos de micro-organismos que colonizam a rizosfera, pode beneficiar de forma sustentável a agricultura por meio de práticas ecológicas de sustentação da fertilidade do solo, possibilitando a redução do uso de agroquímicos, os quais têm causado numerosos problemas ambientais nas últimas décadas, além de ser uma alternativa em potencial no controle de pragas e doenças e consequentemente reduzindo custos ao produtor (CORREA-GALEOTE et al., 2016; GRAÇAS et al., 2015; SINGH et al., 2015).

O desenvolvimento de sistemas sustentáveis e a implantação desse conceito na agricultura garantem a diversidade microbiana e com ela a sanidade do solo. RPCP têm sido isoladas, multiplicadas, formuladas e utilizadas como prática agrônômica rotineira em alguns países, incluindo o Brasil, favorecendo o desenvolvimento e a produtividade das plantas (BATISTA, 2012; LUZ et al., 2016; SINGH et al., 2015).

1.11. Metagenômica

A metagenômica é descrita como a análise funcional e de sequências de genomas coletivos contidos em uma amostra (HANDELSMAN, 2004; WOOD; SALZBERG, 2014). Assim, o conjunto de genomas de uma determinada amostra ambiental é denominada metagenoma. Essa análise utiliza técnicas clássicas de biologia molecular (purificação de DNA, clonagem e transformação) e de microbiologia (caracterização fisiológica) e a combinação desses dois campos frente a vasta diversidade desconhecida, tornam ilimitadas as possibilidades para a prospecção biotecnológica (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

As comunidades microbianas contêm uma complexidade incomparável, o que as torna difíceis para descrever e comparar. Caracterizá-las contribui para o entendimento de processos ecológicos que direcionam interações microrganismo e seus hospedeiros, bem como a biorremediação e a biogeoquímica. Além disso, uma estimativa da riqueza de espécies de um ambiente é um indicativo da plenitude do perfil de uma comunidade. Há dificuldade em estimar a diversidade de uma comunidade microbiana, devido à estrutura desta que

raramente se encaixa a uma distribuição bem definida (NIELSEN et al., 2014; ZHOU et al., 2019).

O solo é considerado um dos mais complexos e desafiantes ambientes para os microbiologistas e contém a maior diversidade microbiana do planeta. A maioria dos micro-organismos presentes no solo ainda não está caracterizada e representam um reservatório enorme de diversidade genética e metabólica ainda não muito explorado (MENECHINE, 2016). Devido à imensa heterogeneidade física, química e biológica, o solo é considerado o ambiente microbiano mais diverso no mundo (GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011; JACOBSEN et al., 2019). Os genomas destas espécies, principalmente as não-cultiváveis, codificam um reservatório inexplorado de novas enzimas e importantes metabólitos (PARIKH; JAMES, 2012).

1.11.1. Estratégia para acessar a diversidade de micro-organismos do solo

O solo é essencial para o desenvolvimento do ser humano e outros organismos no planeta. É a partir dele que ocorre a produção de nutrientes, que por sua vez são extremamente importantes para sobrevivência de qualquer ser vivo. Logo, a qualidade do solo é essencial na agricultura a fim de que haja a produção de alimentos de boa qualidade e para a manutenção das mais variadas espécies.

Porém, o conceito de qualidade do solo é amplo, uma vez que as atividades de manejo executadas pelo homem influenciam diretamente este ambiente (MENECHINE, 2016; RAMOS et al., 2015; SOUZA; GUIMARÃES; FAVARATO, 2015).

O solo consiste num sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por microhabitats que apresenta diferentes características químicas, físicas e biológicas altamente interdependentes (VALARINI et al., 2011).

Além dos benefícios nutricionais fornecidos ao solo por meio de adubação mineral e orgânica é importante ressaltar a importância dos micro-organismos, que, do ponto de vista agrônomo, eles auxiliam na manutenção do equilíbrio, controle de micro-organismos patogênicos (GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011; JACOBSEN et al., 2019).

O solo geralmente conta com uma elevada diversidade de arqueias, bactérias e fungos que auxiliam nos processos de ciclagem de nutrientes e os mesmos possuem grande potencial como indicadores da qualidade do solo por estarem intimamente associados aos processos ecológicos (FIGUEIREDO, 2015; MENECHINE, 2016; VAL-MORAES et al., 2011).

A utilização de medidas de diversidade ou o cálculo de um indicativo de diversidade envolve uma informação refinada contida em dados de análise de comunidade e é representada por um valor numérico que reflete o número e abundância relativa de grupos taxonômicos em uma única comunidade microbiana (BENT; FORNEY, 2008; MCKINLEY, 2019; MENDES et al., 2015).

A microbiologia passou por uma transformação que mudou a visão dos microbiologistas de como estudar certas peculiaridades dos micro-organismos. O fato de que muitos dos micro-organismos não podiam ser cultivados em laboratório, fomentou o estudo de micro-organismos não cultiváveis. A mudança culminou com o desenvolvimento de várias técnicas, incluindo a análise genética de um conjunto de micro-organismos uma vez que o cultivo e isolamento de micro-organismos pelos métodos tradicionais permite o cultivo de somente 0,1 a 1,0% da microbiota do solo (BUERMANS; DEN DUNNEN, 2014; HANDELSMAN, 2004; MEYER et al., 2019).

O DNA total da comunidade microbiana do solo pode ser acessado utilizando-se da metagenômica, que é uma poderosa ferramenta para explorar a ecologia e perfil metabólico do complexo ambiente das comunidades microbianas, bem como identificar novas biomoléculas pelo uso de bibliotecas construídas oriundas de ácidos nucleicos isolados (HEATHER; CHAIN, 2016; MENDES et al., 2015).

É válido lembrar que a construção de bibliotecas metagenômicas inicia-se pelo isolamento de DNA de alta qualidade que seja adequado para clonagem e represente a diversidade microbiana presente na amostra original. Dessa forma, as etapas para a construção de bibliotecas metagenômicas incluem: (i) isolamento de DNA do solo; (ii) ligação do DNA em vetor específico; (iii) clonagem do DNA e inserção do vetor em célula hospedeira e (iv) construção da biblioteca metagenômica (PEIXOTO, 2013).

Sendo assim, a diversidade microbiana em ambientes como o solo, sedimentos ou água pode ser acessada pela análise de genes considerados “relógios moleculares”, como os RNAs ribossômicos *16S rRNA*, *18S rRNA* e os espaçadores transcritos internos (*ITS*), devido a esses apresentarem regiões conservadas que podem ser utilizadas na comparação e classificação taxonômica dos micro-organismos. Desde a clonagem e sequenciamento, o processo é relativamente rápido e considerado uma poderosa ferramenta para entendimento da dinâmica e diversidade das comunidades microbianas dos mais diversificados ambientes (CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016; PASSOS, 2014).

1.11.2. Marcadores moleculares utilizados na identificação de micro-organismos

Em 1987, Woese discorreu sobre a classificação filogenética baseada em características morfológicas para plantas e animais ser relativamente mais fácil visto a riqueza em detalhes morfológicos complexos que esses organismos apresentam em relação às bactérias, que possuem características mais simples. A classificação de organismos com base nos caracteres morfológicos se torna complexa e passível de erros tendo em vista as “armadilhas” que a técnica pode resultar. Como alternativa a essas “armadilhas”, o uso de genes do *RNA* ribossômico (*rRNA*) como marcadores moleculares foi considerado mais vantajoso, visto a sua elevada regularidade funcional entre micro-organismos, e por permitir que durante a classificação filogenética ocorra a identificação do táxon mais elevado.

O gene *16S rRNA* (ou *16S rDNA*) presente em procariotos, pode ser utilizado na identificação de bactérias em análises utilizando sequenciamento de DNA, seja ele proveniente de isolados ou metagenoma (HANDELSMAN, 2004; MEYER et al., 2019; PASSOS, 2014). Este gene possui aproximadamente 1.500 pares de bases (pb) e apresenta 9 regiões conservadas 140 intercaladas com 9 regiões variáveis, onde o comprimento de cada região varia de organismo para organismo. Essa estrutura pode ser sequenciada utilizando métodos de Sanger ou Pirosequenciamento (HEATHER; CHAIN, 2016; PEIXOTO, 2013).

1.12. Análises metagenômicas

Análise metagenômica de amostras ambientais têm sido proposta por ser a mais acurada técnica para descrição de comunidades microbianas presentes em um habitat (MENDES et al., 2015). O solo representa a maior fonte de diversidade microbiana em todo o planeta, sendo essa biodiversidade oculta e representativa de um grande recurso inexplorado na obtenção de produtos naturais com potencial para aplicação na agricultura e outras áreas que envolvem a biotecnologia (FIGUEIREDO, 2015; HEATHER; CHAIN, 2016; NESME et al., 2016).

Os métodos de análise molecular da comunidade microbiana contribuem para o entendimento da biodiversidade microbiana e nos permite caracterizar padrões espaciais e temporais de diversidade, bem como respostas a mudanças nas condições ambientais, perturbações e tratamentos (GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011; MENECHINE, 2016). Isto pode ter um papel fundamental em áreas de interesse agrônômico, o que torna

crucial o acesso e a preservação da diversidade dos micro-organismos do solo, por conterem um grande conjunto de genes desconhecidos que podem codificar novas enzimas e proteínas (MEYER et al., 2019; THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

Dessa forma, a metagenoma elucida genomas de micro-organismos incultiváveis com o objetivo de melhorar a compreensão a cerca da ecologia microbiana global e direcionar as pesquisas visando o aumento na descoberta de novas enzimas e biomoléculas (GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011; MENDES et al., 2015; MENECHINE, 2016; VALVERDE; GULLO; PE, 2016).

A tecnologia metagenômica vinculada aos genes constitutivos alcança uma nova dimensão na caracterização da complexidade que se forma a partir da interação (ou sinergismo) existente entre as diferentes comunidades microbianas, o que desperta cada vez mais o interesse dos cientistas quanto à caracterização e interpretação das ações desempenhadas pelos micro-organismos nos mais variados ambientes, como o solo.

A identificação de micro-organismos presentes na rizosfera das diferentes culturas agrícolas permite realizar pesquisas que avaliam a biodiversidade genética bacteriana desses ambientes. Tais estudos podem promover avanços consideráveis, como a busca por enzimas envolvidas no processo de obtenção de biocombustíveis, por exemplo.

Nesse sentido, a caracterização da microbiota bacteriana rizosférica relacionada ao café é de extrema importância e ainda é desconhecida, possuindo um enorme potencial agrícola e tecnológico.

CAPÍTULO 2

**ISOLAMENTO, DIVERSIDADE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADA
A *Coffea arabica* L. DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO.**

RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo o isolamento, caracterização bioquímica, identificação e análise da diversidade genética da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada a cultura de *Coffea arabica* L., provenientes de cultivo convencional e orgânico, com potencial biotecnológico e agrícola para promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas. Dos 342 isolados bacterianos endofíticos avaliados para fatores de crescimento *in vitro*, 64,33% solubilizaram fosfato inorgânico, 34,21% apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio atmosférico e 25,15% produziram mais que 50 µg.mL⁻¹ de ácido indol acético. O potencial para promoção de crescimento vegetal indireto pode ser analisado por meio do teste de antagonismo e foi realizado para 100 isolados endofíticos, os quais apresentaram atividade antagônica com potencial para biocontrole dos seguintes fungos fitopatogênicos: *Colletotrichum* sp. (20%), *Fusarium oxysporum* (26%) e *F. solani* (30%). Os testes de atividade enzimática foram realizados para 100 isolados endofíticos. Estes testes *in vitro* revelaram que 11% dos isolados endofíticos testados apresentaram atividade amilolítica, 3% celulolítica, 3% esterolítica, 3% lipolítica, 12% pectinolítica, 11% pectinolítica e 1% proteolítica. Realizou-se a identificação por meio da análise proteica das células bacterianas por *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) de 59 isolados endofíticos. Os principais gêneros identificados foram: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Kosakonia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Cronobacter*, *Lysinibacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Microbacterium* e *Bacillus*. Também foram identificados 40 isolados por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA pertencentes aos gêneros *Kosakonia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*. A comparação da diversidade filogenética indica que a comunidade bacteriana endofítica cultivável do café proveniente da área de cultivo orgânico é mais diversa quando comparada com esta mesma comunidade isolada do café proveniente da área de cultivo convencional.

Palavras-chaves: endofíticos, diversidade genética bacteriana, promoção de crescimento vegetal, atividade enzimática, *Coffea arabica* L.

ABSTRACT

The objective of the present study was the isolation, biochemical characterization, identification and analysis of the genetic diversity of the endophytic bacterial community associated with *Coffea arabica* L., from conventional and organic cultivation, with biotechnological and agricultural potential to promote plant growth and production of enzymes. Of the 342 endophytic bacterial isolates evaluated for in vitro growth factors, 64.33% solubilized inorganic phosphate, 34.21% presented positive results for biological fixation of atmospheric nitrogen and 25.15% produced more than 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of acid indole acetic acid. The potential for indirect plant growth promotion can be analyzed by means of the antagonism test and was performed for 100 endophytic isolates, which presented antagonistic activity with potential for biocontrol of the following phytopathogenic fungi: *Colletotrichum* sp. (20%), *Fusarium oxysporum* (26%) and *F. solani* (30%). Enzymatic activity tests were performed for 100 endophytic isolates. These in vitro tests revealed that 11% of the endophytic isolates tested showed amylolytic activity, 3% cellulolytic, 3% sterolytic, 3% lipolytic, 12% pectinolytic, 11% pectinolytic and 1% proteolytic. Identification was performed by bacterial cell protein analysis by Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time-Of-Flight (MALDI-TOF) of 59 endophytic isolates. The main genera identified were: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Kosakonia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Cronobacter*, *Lysinibacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Microbacterium* and *Bacillus*. Also identified were 40 isolates by partial sequencing of the 16S rDNA gene belonging to the genus *Kosakonia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Pseudomonas* and *Rhizobium*. Comparison of phylogenetic diversity indicates that the endophytic bacterial community of coffee grown in the area under organic cultivation is more diverse when compared to this same isolated community of coffee from the conventional cultivation area.

Keywords: endophytic, bacterial genetic diversity, plant growth promotion, enzymatic activity, *Coffea arabica* L.

2.1. Introdução

O café (*Coffea* sp.) pertence à família *Rubiaceae*, que tem cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. Trata-se do gênero mais importante, em termos econômicos principalmente devido à espécie *Coffea arabica* L. (MARTINS, 2012).

Micro-organismos endofíticos são aquelas que habitam o interior de plantas sem causar danos aparentes produzindo ou não estruturas externas (HALLMANN et al., 1997). Já se conhecem produtos de importância agrícola e biotecnológica produzidos por estes micro-organismos tais como toxinas, antibióticos, fatores de crescimento, fármacos e enzimas (LACAVAL; AZEVEDO, 2013; QUECINE et al., 2012; QUECINE; BATISTA; LACAVAL, 2014; STROBEL; DAISY, 2003; ZHAO; XU; LAI, 2018).

Bactérias endofíticas podem conferir vantagens para a planta hospedeira por meio da promoção de crescimento vegetal e controle biológico (MARCINKEVICIUS et al., 2019; PEIXOTO NETO ET AL., 2003; SANTOS et al., 2018). O efeito de promoção de crescimento vegetal atribuído às bactérias endofíticas pode ocorrer por meio da fixação biológica de nitrogênio (HALLMANN et al., 1997; ZHAO; XU; LAI, 2018), solubilização de fosfato (SUBRAMANIAM; ARUMUGAM; RAJENDRAN, 2016; VERMA; GANGE, 2014) e produção de fitohormônios (ácido inol-acético, citocinas, giberilinas, ácido abscísico, etileno) (BOGAS et al., 2016; DAWWAM et al., 2013).

Vários outros efeitos benéficos relacionados à promoção de crescimento vegetal, tais como modificação da morfologia das raízes, ajustamento osmótico e aumento da eficiência de minerais, têm sido atribuídos a essas bactérias. Por ocuparem o mesmo nicho que fitopatógenos, bactérias endofíticas também apresentam potencial como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; LACAVAL; AZEVEDO, 2013; OUBAHA et al., 2019).

Este controle biológico pode ocorrer pela introdução desses endófitos como antagonistas aos fitopatógenos no ambiente onde eles interagem, podendo resultar em controle efetivo de doenças sem efeitos indesejados dos defensivos agrícolas (FANTINEL et al., 2018; JACKSON; SKILLMAN; VANDERMEER, 2012; LACAVAL; AZEVEDO, 2014; VEGA et al., 2008). Muitas bactérias endofíticas inibem fitopatógenos por meio de competição por nutrientes, indução de resistência sistêmica, parasitismo direto e ainda por meio da produção de diversos compostos químicos, antibióticos, bioinseticidas voláteis e enzimas líticas (LACAVAL; AZEVEDO, 2013; QUADT-HALLMANN; KLOEPFER; BENHAMOU, 1997a; QUECINE; BATISTA; LACAVAL, 2014; STROBEL; DAISY, 2003).

A bioprospecção de isolados bacterianos quanto à produção de enzimas também é de grande interesse tecnológico (PAMPHILE et al., 2017). As enzimas são o segundo produto microbiano de maior interesse, depois dos antibióticos, por possuírem menor custo quando comparados a produtos similares de origem vegetal ou animal, além de terem uma facilidade na produção em fermentadores industriais, possuírem ampla diversidade de características físico-químicas, susceptibilidade de manipulação genética e ser um recurso renovável (HOUFANI et al., 2019; LIU; KOKARE, 2017; SILVA et al., 2016).

A utilização de bactérias endofíticas para promoção de crescimento vegetal e inibição de fitopatógenos já é descrita como eficiente para outras culturas (CASTRO et al., 2018a; LACAVAL; AZEVEDO, 2013; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997a; QUECINE; BATISTA; LACAVAL, 2014; STROBEL; DAISY, 2003) e pode apresentar resultados favoráveis para a cultura do café.

Nesse sentido, o isolamento e a caracterização da microbiota endofítica bacteriana relacionada ao café pode contribuir para o desenvolvimento de técnicas que otimizam sua produção em função da promoção de crescimento vegetal. Além disso, deve-se considerar a importância da exploração de plantas de clima tropical, como o café, como reservatórios de bactérias com potencial agrícola e tecnológico.

2.2. Objetivos

O objetivo geral desse capítulo foi estudar a diversidade genética de bactérias endofíticas cultiváveis da cultura de café (*Coffea* sp.) e avaliar o potencial biotecnológico e agrícola para a promoção de crescimento e produção de enzimas. Para alcançar o objetivo geral; os objetivos específicos desenvolvidos foram listados a seguir.

2.2.1. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral deste capítulo, os objetivos específicos foram:

- a) Isolamento da comunidade bacteriana endofítica cultivável a partir de amostras de raiz, caule, folhas e frutos de *Coffea arabica* L. provenientes de cultivo convencional e orgânico;

- b) Avaliação *in vitro* do potencial dos isolados bacterianos endofíticos obtidos para: solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA);
- c) Avaliação *in vitro* do potencial antagônico dos isolados endofíticos em relação a fungos fitopatogênicos da cultura do café;
- d) Avaliação *in vitro* da produção das enzimas celulase, amilase, protease, lipase e esterase pelos isolados endofíticos;
- e) Identificação e avaliação da diversidade genética das bactérias endofíticas cultiváveis associada ao café por meio do sequenciamento parcial do *gene 16S* rRNA;
- f) Identificação e avaliação da diversidade genética dos isolados bacterianos endofíticos por meio da técnica de MALDI-TOF e verificação da correlação desta técnica de identificação com a técnica molecular (*gene 16S* rRNA) empregada para confirmação das espécies.

2.3. Material e métodos

2.3.1. Coleta de Material

As amostras vegetais de raiz, caule, folhas e frutos de café (*Coffea arabica* L.) foram coletadas em maio de 2016. As provenientes do cultivo convencional foram obtidas na Fazenda Monte Alto, em Dourado, Estado de São Paulo; latitude 22°42'30"S, longitude 47°30'00"W e altitude de 546 m. O local possui solo de textura arenosa em todo o perfil. Apresentam 85% ou mais de soma de fração de areia fina e areia grossa ao longo de pelo menos dois metros a partir da superfície. (EMBRAPA, 1999).

O clima é do tipo temperado úmido com inverno seco e verão quente (Cwa), segundo a classificação de Köppen e Geiger, precipitação média anual de 1.328 mm e temperatura média anual de 20° C (CEPAGRI, 2019).

Já, as amostras provenientes do cultivo orgânico, foram obtidas no Sítio Nova Aliança em Ribeirão Corrente, Estado de São Paulo; latitude 20°27'25"S, longitude 47°35'24" e altitude de 855 m. O solo é classificado como Nitossolo de cores vermelhas e vermelho-escuras (EMBRAPA, 1999). Textura argilosa e muito argilosa; estrutura em blocos fortemente desenvolvidos, derivados de rochas básicas e ultrabásicas, com diferenciação de

horizontes pouco notável.

O clima é do tipo temperado úmido e verão temperado (Cwa), segundo a classificação de Köppen e Geiger, precipitação média anual de 1.544 mm e temperatura média anual de 20,6° C (CEPAGRI, 2019).

Os locais de estudo foram selecionados com base em suas diferenças de manejo do plantio convencional e orgânico. Nas áreas amostradas de cultivo convencional e orgânico foi coletado o material vegetal de 10 plantas sadias selecionadas de forma aleatória. As amostras foram conservadas em sacos plásticos para o transporte até o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - LaMiB (UFSCar) em São Carlos - SP.

Todos os procedimentos de coleta e acondicionamento e transporte das amostras foram realizados conforme propostos por ARAÚJO et al. (2014).

2.3.2. Obtenção, purificação e armazenamento das linhagens bacterianas

As amostras de raiz, caule, folhas e frutos foram submetidas à desinfecção superficial (ARAÚJO et al., 2014) e cortadas assepticamente em pequenos fragmentos que, posteriormente, foram macerados em 10 mL de tampão PBS e incubados a 28° C sob agitação a 180 rpm por 1 hora. Procedeu-se as diluições seriadas apropriadas e 100 uL do extrato foi semeado em placas de Petri contendo meio sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA) (KASVI, Itália), suplementado com Benomil (50 µg.mL⁻¹), para evitar possível crescimento fúngico. A semeadura foi feita em duplicata.

As placas foram incubadas por até 15 dias a 28°C, para verificação de colônias bacterianas isoladas. Realizou-se a contagem padrão em placas e amostras aleatórias dos isolados bacterianos foram purificadas por meio da técnica de estrias de esgotamento em placas contendo o meio TSA e incubadas a 28° C por 24 - 48 h. As colônias isoladas e purificadas foram novamente repicadas em *Tryptic Soy Broth* (TSB) (KASVI, Itália) e incubadas a 28° C por 24 - 48 h.

Após a verificação do crescimento bacteriano por meio da turvação do meio, foram preparados microtubos em triplicata contendo a cultura bacteriana e glicerol na proporção 1:1 que foram encaminhadas para o armazenamento em freezer a -80°C.

As linhagens obtidas receberam códigos para facilitar a apresentação dos dados. Todos receberam as siglas RA, RM, FO ou FR; referente a parte da planta de onde a bactéria foi isolada: raiz, ramo, folha e fruto, respectivamente; seguida da letra “C” ou “O” referente ao

tipo de manejo do qual a planta foi obtida: convencional ou orgânico, respectivamente. Posteriormente, os números sequenciais para distinguir as diferentes linhagens.

Todos os experimentos foram iniciados posteriormente com culturas bacterianas frescas crescidas previamente em meio TSA incubado a 28°C por 24 – 48h para nova avaliação de viabilidade e pureza.

2.3.3. Seleção de bactérias endofíticas com potencial agrícola e biotecnológico

2.3.3.1. Ensaios de promoção de crescimento vegetal *in vitro*

As linhagens foram avaliadas quanto à solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de ácido indol acético (AIA).

2.3.3.1.1. Solubilização de Fosfato (SF)

Para avaliar a solubilização de fosfato pelas bactérias foi utilizada a técnica descrita por Verma, Ladha & Tripathi (2001).

Assim, 342 isolados bacterianos, sendo 168 provenientes do cultivo convencional e 174 provenientes do cultivo orgânico; foram inoculados, em quadruplicata, em meio de cultura sólido contendo: 10 g.L⁻¹ de glicose; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1g.L⁻¹ de NaCl; 1g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ de CaHPO₄; 15 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,2. Foram incubados a 28°C por 120 horas (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

A presença de halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Para fins semi-quantitativos, as colônias das bactérias que apresentaram a habilidade de solubilizar fosfato inorgânico foram suspensas em água destilada esterilizada e eluídas na mesma densidade óptica (D.O), sendo 550nm = 0,1. Dessa solução, foram inoculados 10 µL na placa contendo o meio de cultura sólido específico, incubadas a 28°C por 120 horas. Foram medidos os diâmetros dos halos claros formados ao redor de cada colônia (Dh), com auxílio de um paquímetro, e os diâmetros das colônias correspondentes (Dc).

Com os dados, pôde-se calcular a razão: (Dh)/(Dc). De modo que linhagens que solubilizam mais fosfato, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores Índices de

Solubilização de Fosfato (ISF) (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976). acordo com Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada como baixa ($ISF < 2$), média ($2 < ISF < 3$) e alta ($ISF > 3$). (FILHO; VIDOR, 2001).

2.3.3.1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

A capacidade dos 342 isolados em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. O meio de cultura NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo a seguinte composição em $g.L^{-1}$: ácido málico, 5; K_2HPO_4 , 0,5; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2; NaCl, 0,1; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,8 (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

Foram utilizados tubos de ensaio de 13 x 100 mm, contendo 4 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, onde as linhagens foram inoculadas com alça de platina, a partir de culturas crescidas em meio NFb semi-sólido, usando-se três repetições para cada isolado (ARAÚJO et al., 2014).

A incubação foi realizada por 96 horas a 28°C. Após esse período foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos. Esse procedimento foi realizado mais uma vez. A reinoculação sucessiva das linhagens é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica das linhagens (CATTELAN, 1999). Como controle positivo foi utilizado a linhagem bacteriana do gênero *Burkholderia* sp. (BATISTA et al., 2018).

2.3.3.1.3. Produção de ácido indolacético (AIA)

Para a detecção e quantificação da produção de AIA pelos 342 isolados, foi utilizado o método originalmente proposto por Bric et al., (1991), adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003). As colônias foram resuspensas em água destilada esterilizada e eluídas na mesma densidade óptica (D.O), sendo $550nm = 0,1$. Dessa solução, foram inoculados 100 μL em 3 ml de meio de cultura TSB 10% suplementado com L-triptofano (5 mM), e incubadas no escuro a 28°C por 72 horas sob agitação a 180 rpm. Após este período coletou-se 2 mL da suspensão bacteriana, centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 g e 900 μL do sobrenadante foi

coletado e colocado em cubeta de 1,5mL e adicionado 400µL do Reagente de *Salkowski* (2 mL de FeCl₃ (0,5mol.L⁻¹) e 98 mL de HClO₄ (35%)). Após 30 minutos de incubação a 28°C foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm de absorbância. Como controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultura TSB 10% com L⁻¹ triptofano (5mM) acrescido do Reagente de Salkowski.

As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 1, 5, 25, 50, 75; 100; 125; 150; 175 e 200 µg.mL⁻¹. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas. Os testes foram realizados em triplicata.

2.3.3.2. Antagonismo a fungos fitopatogênicos

Para analisar as linhagens bacterianas quanto a atividade antagônica a fungos fitopatogênicos foram realizados testes de antagonismo *in vitro* pelo método da cultura pareada (ASSUMPÇÃO et al., 2009; SILVA, 2015). Os fungos fitopatogênicos utilizados nos ensaios foram: *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, que foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Carolina Quecine do Departamento de Genética, ESALQ/USP.

Primeiramente foi realizada uma seleção massal, onde os isolados bacterianos foram repicados em forma de estrias em quatro pontos equidistantes nas extremidades das placas contendo o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (KASVI, Itália). A seguir, discos de meio PDA, com as estruturas dos fungos fitopatogênicos medindo 0,5 cm de diâmetro foram depositados no centro de cada placa conforme apresentado na Figura 7.

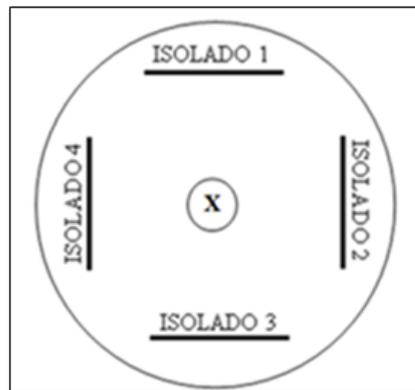
As placas foram incubadas a 28°C por até 120 horas. Uma placa contendo apenas um disco com micélio do fitopatógeno no centro serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição (momento em que o fungo atingiu as extremidades da placa), realizada por meio de análise visual e em apenas uma repetição por isolado.

2.3.2.1. Pareamento direto “*in vitro*”

Para a realização deste ensaio, discos de 0,5 cm de diâmetro cortados de placas de Petri contendo os fungos fitopatogênicos previamente cultivados em meio PDA foram colocados em uma das extremidades de outra placa de Petri e, na outra extremidade (Figura 6), os isolados bacterianos endofíticos selecionados na primeira etapa foram inoculados com o

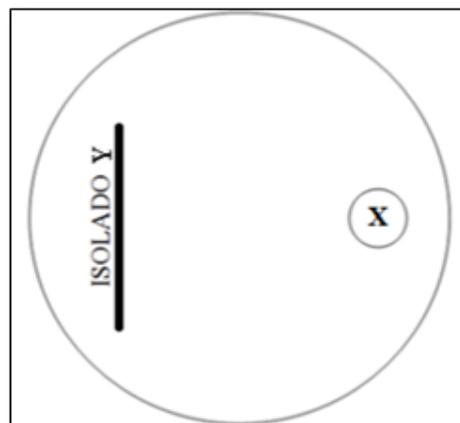
auxílio de um palito descartável e esterilizado. O procedimento foi realizado conforme o método de pareamento (MARIANO, 1993).

Figura 5 - Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo in vitro das bactérias endofíticas associadas ao café, em relação a fungo fitopatogênico. Isolado 1, 2, 3, e 4 representam as linhagens bacterianas.



A presença de um halo de inibição no crescimento do fungo indica que o isolado apresenta atividade antagônica. A avaliação do experimento foi realizada quando a placa contendo apenas o disco fúngico (controle) apresentou o crescimento de uma extremidade a outra da placa de Petri. As placas foram incubadas por 3 a 7 dias a de 28°C. O teste foi realizado em triplicata.

Figura 6 - Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a técnica de pareamento direto in vitro para avaliação do potencial antagônico dos isolados endofíticos associados ao café, em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado "Y" representa o isolado bacteriano selecionado na etapa anterior (Figura5) e o disco com letra "X" na outra extremidade da placa Petri representa o fungo testado.



2.3.4. Ensaios enzimáticos: Potencial biotecnológico

Foram feitas análises qualitativas da atividade enzimática dos isolados bacterianos (ARAÚJO et al., 2014; CASTRO et al., 2014). Inicialmente, os isolados foram crescidos em meio TSB e em seguida semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura específicos para cada enzima. Após o crescimento microbiano, foi observada a presença ou ausência de determinada atividade enzimática, por meio de formação de halo em torno da colônia.

Os isolados bacterianos foram analisados quanto a sua capacidade de produzir as enzimas amilases; celulases; lipases, esterases; proteases e pectinases (pectato liases e poligalacturonase) (ARAÚJO et al., 2014). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.4.1. Atividade amilolítica

Os isolados foram cultivados em meio mínimo M9 contendo 200 mL de solução estoque (64g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl ; 5g.L^{-1} de NH_4Cl); 2mL de MgSO_4 1M; 0,1mL de CaCl_2 1M, 10g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel. Foram incubados a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de solução de Iodo e então lavados imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.3.4.2. Atividade celulolítica

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200 mL de solução estoque (64g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl ; 5g.L^{-1} de NH_4Cl); 2mL de MgSO_4 1M; 0,1mL de CaCl_2 1M, 10g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de carboximetilcelulose (CMC). Foram incubadas a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL do corante Vermelho Congo, depois de 15 minutos as placas foram lavadas com NaCl 5M (TEATHER; WOOD, 1982). A presença de um halo amarelado ou incolor em torno da colônia após a adição de NaCl indicou a secreção de celulase.

2.3.4.3. Atividade lipolítica e esterolítica

As bactérias foram cultivadas em meio de Lipase/Esterase contendo: 10g.L^{-1} de Peptona; 5g.L^{-1} de NaCl; $0,1\text{g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 15g.L^{-1} de ágar, pH 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo formado por cristais ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de lipases (SIERRA, 1957).

A metodologia utilizada para a avaliação da produção de esterase foi a mesma utilizada para a lipase, porém após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado.

A formação de um halo claro ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de esterases.

2.3.4.4. Atividade pectinolítica

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200 mL de solução estoque (64g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl; 5g.L^{-1} de NH_4Cl); 2mL de MgSO_4 1M; $0,1\text{mL}^{-1}$ de CaCl_2 1M, 10g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de ágar, pH 5,0 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de pectina (v/v) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de lugol e em seguida efetuou-se a lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de pectinases.

O pH desse meio pode ser modificado para caracterização de duas diferentes pectinases: o meio com pH 8,0 é utilizado para caracterização de pectato liase e o meio com pH 5,0 para poligalacturonase.

2.3.4.5. Atividade proteolítica

As bactérias foram cultivadas em meio Protease contendo: 5g.L^{-1} de triptona; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura; 1g.L^{-1} de glicose; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl e 15g.L^{-1} de Agar, pH 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100 mL de leite desnatado.

As bactérias foram incubadas a 28°C durante 48 horas e a formação de um halo ao redor da colônia indicou a secreção de proteases.

2.3.5. Identificação molecular dos isolados bacterianos

2.3.5.1. Extração de DNA bacteriano

Os isolados foram cultivados em TSB a 28°C por 24 – 48 horas sob agitação constante a 150 rpm. A cultura bacteriana foi então centrifugada por 10 minutos a 10.000 g e o precipitado obtido homogeneizado em 400 µL de tampão salino (NaCl 0,4M, Tris-HCl 10mM pH=8,0 e EDTA 2Mm pH=8,0), 40 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 20% e 8 µL de proteinase K (20 mg.ml⁻¹). Em seguida, a suspensão foi homogeneizada e incubada a 55°C *overnight*. O DNA foi purificado pelo método de tampão salino (ALJANABI; MARTINEZ, 1997).

A avaliação da integridade e qualidade do DNA bem como a sua quantificação foi realizada por meio de gel de eletroforese em gel de agarose (1,0 % p/v) a (3 volts.cm⁻¹) em tampão TAE 1X e corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (1,0 mg.mL⁻¹) (BIOTIUM) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (KASVI, Itália).

2.3.5.2. Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR

A amplificação do gene 16S rDNA dos isolados foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com volume final de 15 µL, com 1 µL de DNA-molde (20ng), 0,2µM dos *primers* V3F(5'CCA_gACTCCTACGGGAGGCAG-3') e V6R(5'ACATtTCACaACACGAGCTGACGA-3')(CHAKRAVORTY et al., 2007); 0,2µM de cada dNTP; 3,75 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA polimerase (CELLCO, Alemanha) e Tampão10X.

A PCR foi realizada em termociclador (EPPENDORF) programado para desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A amplificação do fragmento de aproximadamente 750pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose gel de agarose (1,0 % p/v) a (3 volts.cm⁻¹) em tampão TAE 1X e corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (1,0 mg.mL⁻¹) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (KASVI, Itália).

2.3.5.3. Purificação do DNA, sequenciamento, edição e análise das sequências

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), conforme as especificações do fabricante. Em seguida foram quantificados e encaminhados para sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo.

As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA foram utilizadas para identificação das linhagens bacterianas nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do *Blastn*. Foram consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

A identificação das linhagens bacterianas foi baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade. As sequências obtidas a partir do sequenciamento foram utilizadas para identificação dos isolados. Esta análise realizada pelo software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), onde as sequências foram comparadas à sequências tipo com base nos resultados observados no BLASTn. As sequências determinadas foram alinhadas e editadas usando o programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011) com o agrupamento pelo método “Neighbor-Joining” (SAITOU; NEI, 1987), usando-se “p-distance” para nucleotídeos com a opção “the pairwise gap deletion” e usando bootstrap com 10.000 repetições.

2.3.6. Análise proteica das células bacterianas por MALDI-TOF

Os isolados bacterianos também foram identificados usando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™).

As células foram cultivadas em placas de Petri com meio de cultura específico conforme feito no isolamento e foram incubadas a 28°C durante 18h e, em seguida, aproximadamente $3,0 \times 10^7$ células de cada linhagem foram transferidas assepticamente para microtubos.

Posteriormente, foram adicionados 6 µL de solução orgânica (água/acetonitrilo/ácido trifluoroacético, 50: 47,5: 2,5) a cada microtubo, contendo os isolados bacterianos. Os microtubos foram submetidos a agitação durante 1 min e depois transferiu-se 1 µL da suspensão resultante para a placa alvo MALDI de 96 poços (BRUKER DALTONICS,

Alemanha). Quando a fase líquida foi quase totalmente evaporada, adicionou-se 1 µL de solução matricial (solução saturada de ácido aciano-4-hidroxi-cinâmico (CHCA) em 50% de acetonitrilo/2,5% de ácido trifluoroacético) e a solução foi misturada suavemente (OLIVEIRA et al., 2015).

Uma colônia de *Escherichia coli* K12 foi obtida da Coleção de Cultura Pública Micoteca da Universidade do Minho (MUM, www.micoteca.deb.uminho.pt) e utilizada para extração das proteínas como padrão para o MALDI-TOF para a calibração externa do MS. As células de *E. coli* K12 foram cultivadas em ágar Luria-Bertani (LB, 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) a 37°C durante 18h.

Cada amostra MALDI-TOF foi realizada em triplicata para avaliar a reprodutibilidade. As amostras foram então analisadas em um espectrômetro MALDI-TOF microflex LT (BRUKER DALTONICS, Alemanha), utilizando o sistema automático MALDI Biotyper 3.0. Para a identificação microbiana MALDI-TOF, a seguinte referência da Coleção Cultura de Microbiologia Agrícola (CCMAUFLA, <http://www.ccma.dbi.ufla.br>) foram utilizadas: CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*, Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, CCMA 0054 *Bacillus subtilis*, CCMA 0085 *Bacillus subtilis*.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Isolamento de bactérias endofíticas associadas ao cafeeiro

A partir do isolamento das bactérias endofíticas das raízes, ramos e folhas e frutos dos cafeeiros provenientes de cultivo convencional e orgânico; foi possível estimar a abundância bacteriana em cada parte da planta por meio da contagem de células viáveis expressas em Unidades Formadoras de Colônia por grama de tecido vegetal (UFC.g⁻¹ de tecido vegetal). A ausência de micro-organismos nas placas controle indicou eficácia na desinfecção superficial das raízes, ramos, folhas e frutos.

As contagens obtidas nas diferentes partes das plantas provenientes do manejo convencional e orgânico estão registradas na Tabela 1.

As partes das plantas provenientes do cultivo convencional apresentaram maior frequência de isolamento (FI) de bactérias endofíticas quando comparadas às provenientes do cultivo orgânico. As raízes das plantas do cultivo convencional apresentaram maior abundância de bactérias se comparados às demais partes das plantas, enquanto no cultivo

orgânico, os ramos apresentaram maior abundância de bactérias endofíticas associadas. As médias foram comparadas pelo teste T de Student a 5% de significância e não houve diferença significativa entre as áreas de cultivo convencional e orgânico.

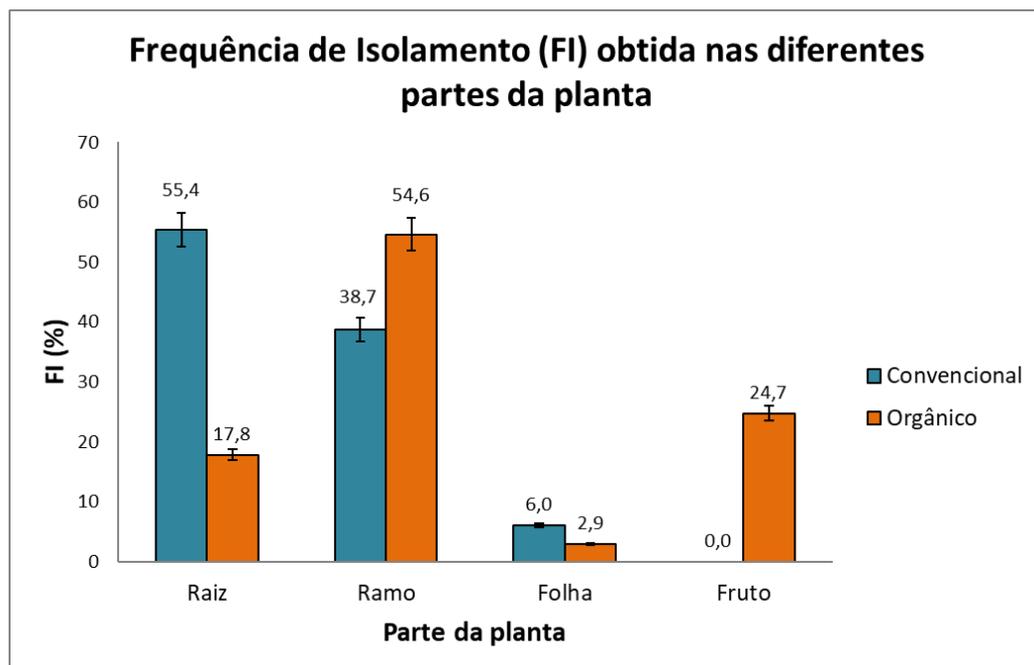
Tabela 1. Abundância bacteriana das diferentes partes dos cafeeiros proveniente de área de manejo convencional e orgânico.

Parte da planta	Convencional	Orgânico
	UFC.g ⁻¹ de tecido	UFC.g ⁻¹ de tecido
Raiz	1,9 x 10 ⁴	3,7 x 10 ²
Ramo	1,2 x 10 ⁴	5,9 x 10 ²
Folha	6,2 x 10 ³	1,2 x 10

Não foi possível o isolamento de bactérias endofíticas dos frutos de café provenientes do cultivo convencional devido à ocorrência de larvas de mosca-da-fruta, porém nos frutos provenientes do cultivo orgânico foi possível obter 43 isolados bacterianos.

Das bactérias isoladas, foram selecionadas 342, sendo 168 do café convencional e 174 do café orgânico (Figura 7).

Figura 7 - Frequência de isolamento (FI) de bactérias endofíticas obtidas de diferentes partes do cafeeiro provenientes do manejo convencional e orgânico. Não foi possível o isolamento de bactérias endofíticas dos frutos de café provenientes do cultivo convencional devido à ocorrência de larvas de mosca-da-fruta no período de isolamento.



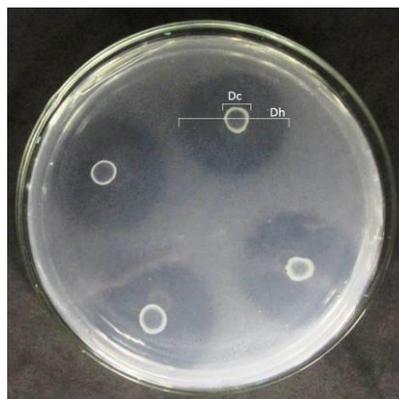
2.4.2. Caracterização bioquímica *in vitro* de bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento vegetal

Diante de um grande número de isolados endofíticos obtidos, o presente estudo foi baseado em técnicas *in vitro* para a seleção de linhagens promissoras para promoção de crescimento e atividade enzimática. (BATISTA, 2012; BATISTA et al., 2018; BESERRA JÚNIOR et al., 2006; BOTTA et al., 2013; CASTRO et al., 2014, 2018a; SILVA, 2015).

2.4.2.1. Solubilização de fosfato (SF)

Do total de 342 linhagens bacterianas que foram avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio contendo CaHPO_4 ; 220 apresentaram resultado positivo indicado pela presença halo em torno da colônia (Figura 8) com Índice de Solubilização de Fosfato (ISF) médio ou alto, o que representa 64,33% do total de isolados testados. Destes, 124 são provenientes do café de cultivo convencional e 96 são do café proveniente do cultivo orgânico, representando 73,81% e 55,17% do isolados de café convencional e orgânico respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Figura 8 - Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolado bacteriano positivo inoculado em quadruplicada com o isolado.



Fonte: Arquivo pessoal

Os micro-organismos endofíticos possuem papel importante no ciclo natural do fósforo. Um dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal pelas bactérias endofíticas pode ser realizado por meio da disponibilização do fósforo insolúvel presentes nos solos tornando-os solúveis e disponibilizando-o às plantas (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), podemos organizar os

isolados com resultados positivos para solubilização de fosfato em três classes: Isolados com baixo potencial de solubilização ($ISF < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 < ISF < 3$) e com alto potencial de solubilização ($ISF > 3$).

Graças ao potencial desses micro-organismos, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. Entre os gêneros bacterianos que são conhecidos por terem esta capacidade, estão: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (GRAÇAS et al., 2015; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

Assim, há interesse para seu uso como um biofertilizante para maximizar o aproveitamento do fósforo existente no solo ou adicionado como fertilizante. (DUARTE et al., 2014; PARNELL et al., 2016; SOUZA; GUIMARÃES; FAVARATO, 2015).

Em estudo realizado por Silva et al. (2012), o potencial de 217 cepas de bactérias endofíticas de café foi avaliado quanto a promoção de crescimento em mudas de cafeeiro. Destas, seis cepas bacterianas foram capazes de promover crescimento vegetal, sendo que duas delas apresentaram a capacidade de solubilização de fosfato (SILVA et al., 2012b).

Machado (2015) avaliou linhagens bacterianas endofíticas, isoladas da cultura de pinhão-mansão, pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Citrobacter* e essas linhagens mostraram um alto índice de solubilização de fosfato. Os mesmos gêneros também foram reportados por Andrade (2012) que relata seis diferentes espécies de *Bacillus* sp. capazes de solubilizar fosfato de cálcio com índices de solubilização variando de 0,42 a 2,28. Em uma análise do potencial de solubilização de fosfato em bactérias endofíticas isoladas de morango, Dias et al. (2009) também relataram linhagens de *Bacillus subtilis* e de *B. megaterium*, capazes de solubilizar fosfato.

Quatro linhagens do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* isoladas de raízes e colmos de cana-de-açúcar também solubilizaram fosfato em testes *in vitro* e, quando avaliadas em experimento de campo, afetaram positivamente o desenvolvimento vegetal com um aumento da germinação (55%), número de colmos (20%), altura (18%), circunferência e peso de colmos (8 e 51%, respectivamente), produtividade (39%) e a porcentagem de açúcares disponíveis (6%), quando comparados ao controle (CHAUHAN et al., 2015).

A importância das bactérias solubilizadoras de fosfato não está apenas no fato de contribuir para o crescimento das plantas, mas também para reduzir a necessidade ou maximizar o uso de fertilizantes manufaturados (BATISTA et al., 2018; CASTRO et al., 2018a; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

Tabela 2. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal in vitro para os isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico.

Isolados	Promoção de Crescimento Vegetal			Antagonismo a fungos fitopatogênicos		
	FBN ^a	ISF ^b	AIA ^c ug.ml ⁻¹	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Fusarium solani</i>
CRM 136	+	3,83	33,08	-	-	+
CRM 137	+	4,14	23,76	-	+	-
CRM 138	+	3,86	23,39	-	-	-
CRM 139	+	4,08	18,18	-	+	+
CRM 140	+	2,99	25,00	-	-	-
CRM 141	+	4,73	27,33	-	-	+
CRM 145	+	4,81	24,63	-	-	+
CRM 148	+	3,25	5,70	-	-	-
CRM 149	+	3,47	98,28	-	+	-
CRM 150	+	3,25	29,18	-	+	-
CRM 156	+	2,90	13,46	-	-	-
CRM 158	+	2,78	24,66	-	+	-
CRM 160	+	3,52	56,36	-	-	-
CRM 162	-	-	320,06	-	-	-
CRM 165	+	5,89	37,16	-	-	+
CRM 172	+	4,33	11,49	-	-	-
CRM 173	+	4,85	10,47	-	+	+
CRM 176	+	5,51	7,67	-	-	-
CRM 177	+	4,64	11,08	-	-	-
CRM 180	+	5,63	18,87	-	-	-
CRM 183	+	3,42	29,84	+	+	+
CRM 184	+	3,21	40,13	+	+	+
CRM 189	+	2,10	42,35	+	+	+
CRM 194	+	2,92	30,67	-	+	-
CRM 200	+	4,00	27,75	-	+	+
CRM 202	+	4,74	9,11	-	-	-
CFO 299	+	2,69	11,01	-	-	-
CFO 301	+	2,72	33,78	-	-	-
CRA 203	+	5,16	28,23	+	+	+
CRA 204	+	3,36	196,90	-	+	-
CRA 205	+	3,53	142,66	+	+	-
CRA 206	+	3,96	9,47	+	+	+
CRA 207	+	3,26	-	-	-	-
CRA 208	+	3,85	38,18	-	-	-
CRA 214	+	3,59	14,17	-	-	-
CRA 219	+	4,68	12,08	-	-	-
CRA 221	+	5,13	3,42	-	-	-

Tabela 2. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro* para os isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico. (cont.)

Isolados	Promoção de Crescimento Vegetal			Antagonismo a fungos fitopatogênicos		
	FBN ^a	ISF ^b	AIA ^c ug.ml ⁻¹	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Fusarium solani</i>
CRA 232	+	3,63	253,39	-	+	-
CRA 234	+	4,22	57,89	-	-	-
CRA 241	+	2,65	297,09	-	+	-
CRA 247	-	2,06	209,35	-	-	-
CRA 249	-	2,39	400,74	-	-	-
CRA 250	+	2,25	491,06	-	-	-
CRA 251	+	2,68	400,74	-	+	+
CRA 286	+	2,54	466,04	-	-	-
CRA 297	+	2,87	10,79	-	-	-
CRA 298	+	2,58	129,30	-	-	-
CRA 301	+	3,51	306,63	-	-	-
CRA 302	+	3,33	11,23	-	-	-
CRA 305	+	2,86	4,95	-	-	-
ORA217	-	3,60	69,2	-	-	-
ORM234	-	5,68	90,7	-	-	-
ORM252	+	4,58	33,3	-	-	+
ORM257	+	3,89	79,9	-	-	-
ORM258	+	NA	64,2	+	-	-
ORM260	+	NA	121,9	-	-	+
ORM261	+	3,46	41,2	-	-	+
ORM262	+	4,38	49,2	-	-	-
ORM264	+	5,31	9,0	+	+	-
ORM265	+	4,17	46,8	-	-	-
ORM284	-	NA	84,0	-	-	-
ORM301	-	3,07	137,9	-	-	-
ORM311	-	4,29	107,3	+	+	+
ORM314	+	4,14	34,4	+	-	+
ORM315	+	4,53	108,0	+	-	+
ORM320	+	3,84	12,4	+	-	+
ORM325	+	4,00	53,8	-	-	+
ORM326	+	4,09	58,5	-	-	+
ORA339	+	3,93	26,6	+	-	-
ORA152	+	4,83	35,1	-	-	-
ORA154	+	6,72	35,3	+	+	+
OFR162	+	1,99	64,9	+	-	-
OFR163	-	2,06	107,7	+	+	+
OFR164	+	3,93	46,0	+	-	-
OFR170	+	3,80	67,9	-	-	-

Tabela 2. Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro* para os isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico. (cont.)

Isolados	Promoção de Crescimento Vegetal			Antagonismo a fungos fitopatogênicos		
	FBN ^a	ISF ^b	AIA ^c ug.ml ⁻¹	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Fusarium solani</i>
OFR171	+	4,00	16,8	-	+	-
OFR173	+	1,96	66,2	-	-	-
OFR174	-	3,74	63,5	-	-	-
OFR175	+	3,39	138,0	-	-	-
OFR176	+	4,27	77,7	-	-	+
OFR177	+	3,15	359,6	-	-	+
OFR179	-	3,07	67,5	-	-	-
OFR180	+	3,66	46,9	-	+	-
OFR181	+	2,83	49,0	-	+	-
OFR182	+	2,78	59,4	-	-	-
OFR182A	+	2,19	34,8	-	-	-
OFR183	+	3,72	40,4	-	-	+
OFR185	+	3,54	26,7	-	-	+
OFR187	+	3,47	48,9	-	-	+
OFR188	+	3,74	20,9	-	-	+
OFR191	+	3,17	37,2	+	-	+
OFR192	+	3,43	35,4	+	-	-
OFR193	+	2,48	28,6	-	-	-
OFR194	+	2,73	43,8	-	-	-
OFR195	+	2,87	182,8	-	-	+
OFR196	+	2,59	36,6	+	-	+
OFR197	-	1,98	184,6	-	-	+
OFR202	+	3,03	140,4	-	-	+
OFR204	+	2,49	17,9	-	-	-
OFO340	+	2,99	33,6	-	-	-

a Fixação Biológica de Nitrogênio;

b Índice de Solubilização de Fosfato

c Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

2.4.2.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Um total de 117 isolados bacterianos endofíticos (34,21% do total) foram capazes de fixar nitrogênio. Destas, 50 são provenientes do café de cultivo convencional e 67 são do café proveniente do cultivo orgânico, representando 29,76% e 38,51% do isolados de café convencional e orgânico, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

A disponibilidade de nitrogênio em formas assimiláveis aos organismos vivos é um dos fatores mais limitantes no planeta, tornando a fixação biológica de nitrogênio o segundo

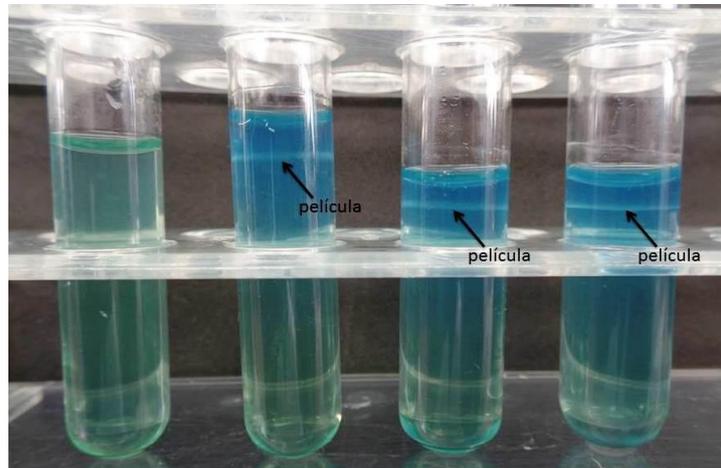
processo biológico mais importante depois da fotossíntese (LACAVA; AZEVEDO, 2013; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). Alguns gêneros bacterianos são capazes de capturar o nitrogênio atmosférico (N_2) e transformá-lo em N assimilável pelas plantas. Na agricultura, a FBN é explorada e se encontra comercialmente disponível para muitas culturas, como a soja, o feijão e o milho, na forma de inoculantes. Estima-se uma economia mundial de US\$ 6 bilhões anuais pela exploração da FBN em substituição à adubação nitrogenada mineral (MAPA, 2010).

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é uma alternativa tecnológica para aumentar a produtividade agropecuária e minimizar a emissão dos Gases de Efeito Estufa (GEE), contribuindo para atenuar os efeitos das mudanças climáticas. Este processo tecnológico foi incluído no Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas visando à Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura, como parte do compromisso internacional assumido pelo Brasil, em 2009, de reduzir suas emissões de Gases de Efeito Estufa entre 36,1% e 38,9% até 2020 o que significa uma redução que gira em torno de 1 bilhão de toneladas de dióxido de carbono, principal gás de efeito estufa na atmosfera (MAPA, 2010; ZAMBUDIO; FERREIRA, 2012).

A capacidade de um isolado bacteriano crescer e formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio por duas inoculações sucessivas sugere a fixação biológica de nitrogênio por esse isolado bacteriano (Figura 9). A formação desta película é uma estratégia desenvolvida pelos micro-organismos para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa a sua tensão (BRASIL, 2005); permitindo assim, uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência; proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio (ARAÚJO et al., 2014; PELZER et al., 2011b; SILVEIRA, 2008).

Bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de solo, raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola (KASCHUK; HUNGRIA, 2017), como é o caso de cepas do gênero *Gluconacetobacter* que por meio da técnica de imunocaptura foram isoladas de amostras de solo cultivado com café (MOREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2006). A *Burkholderia vietnamiensis*, que é a única conhecida espécie fixadoras de nitrogênio deste gênero bacteriano, foi isolada de cafeeiros de diferentes regiões do México (SANTOS et al., 2001). Linhagens bacterianas tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, e *Pseudomonas* têm sido isoladas da rizosfera e também de raízes e partes aéreas do pinhão-mansão. Tais gêneros vêm sendo relatado de forma recorrente como fixadores de nitrogênio (AHEMAD; KIBRET, 2014; MOREIRA et al., 2010; XIE; YOKOTA, 2005).

Figura 9 - Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFb semi-sólido inoculado com o isolado endofítico.



Fonte: Arquivo pessoal.

Em estudos realizados por Machado (2015) com bactérias endofíticas associadas ao pinhão-mansó foram encontradas dez linhagens de *Bacillus* sp. com habilidade de fixar nitrogênio *in vitro*. Já Madhaiyan *et al.*, (2012), relataram a capacidade de uma linhagem de *Enterobacter arachidis* (R4-368) isolada endofiticamente do pinhão-mansó, em colonizar os tecidos radiculares e promover o crescimento de mudas de pinhão-mansó (MADHAIYAN *et al.*, 2013). Szilagyi-Zecchin *et al.*, (2014), avaliaram sete isolados bacterianos endofíticos associados ao milho, onde todos os isolados apresentaram resultado positivo para a formação de película em meio NFb semisólido, sendo um dos gêneros *Enterobacter* e seis do gênero *Bacillus* (SZILAGYI-ZECCHIN *et al.*, 2014).

2.4.2.3. Produção de ácido indol acético (AIA)

Dos 342 isolados bacterianos endofíticos avaliados para a produção de AIA, 86 (25,15% do total) apresentaram resultados acima de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores de produção de AIA entre os isolados selecionados atingiram até $491,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As quantidades obtidas neste estudo foram comparadas com os resultados obtidos por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dos isolados selecionados, 50 são provenientes do café de cultivo convencional e 36 são do café proveniente do cultivo orgânico, representando 29,76% e 20,69% do isolados de café convencional e orgânico, respectivamente. A coloração rosa-

avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Bactérias endofíticas são capazes de produzir metabólitos secundários, que possuem substâncias capazes de promover o desenvolvimento das plantas. Dentre estes metabólitos secundários, destaca-se a produção de fitohormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas (BRADER et al., 2014; CASTRO; SANTOS; STIPP, 2012; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

As auxinas, do grego “crescer”, são uma classe de fitohormônios capazes de afetar o crescimento vegetal e, podem ser produzidos por plantas em ápices foliares, meristemas, frutos e sementes em desenvolvimento, (TAIZ; ZEIGER, 2009), bactérias (BAREA; NAVARRO; MONTOYA, 1976) e fungos (DVORNIKOVA; SKRIABIN; SUVOROV, 1970).

A principal auxina encontrada em baixas concentrações nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA. O principal efeito das auxinas é a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). Entretanto, altas concentrações de hormônios podem causar a inibição da elongação celular afetando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas (BROEK et al., 1999).

Silva et al. (2012), avaliou o potencial de 217 cepas de bactérias endofíticas de café, das quais, seis foram capazes de promover crescimento vegetal e duas delas apresentaram a capacidade de sintetizar AIA, mas a análise apresentada por esses autores não foi quantitativa.

Os valores obtidos no presente estudo são muito superiores aos relatados por Jha, Annapurna e Saraf (2012) em estudos avaliando o potencial de promoção de crescimento bactérias associadas ao pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Além disso, Batista et al. (2018) avaliando o potencial para promoção de crescimento de rizobactérias do guaraná foi demonstrada a capacidade de dois isolados rizobacterianos associadas ao guaraná, sendo uma linhagem de *Bacillus* sp. (produzindo $67,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e uma linhagem de *Burkholderia* sp. (produzindo $175\mu\text{g.mL}^{-1}$) capazes de promover o crescimento do milho. Em um trabalho desenvolvido com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e *Arabidopsis thaliana*, foi observado que *B. megaterium* promoveu um maior desenvolvimento nas plantas (LÓPEZ-VALDEZ et al., 2011). Etesami, Alikhani e Hosseini (2015) relataram que as PGPRs que residem em rizosfera, rizoplano e nichos endofíticos podem produzir AIA e apoiar o crescimento das plantas (ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015).

A habilidade de sintetizar auxinas é amplamente distribuída entre bactérias associadas

a plantas (BATISTA, 2012; BATISTA et al., 2018; ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015; KOCHAR; UPADHYAY; SRIVASTAVA, 2011; SINGH, 2018). A produção microbiana de ácido indol acético (AIA), principal é em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biossintéticas (EL-DIN HASSAN, 2017; PATTEN; GLICK, 1996; SINGH, 2018).

Sugere-se também que mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são aptas a produzir o ácido indol acético (AIA) devido a presença de triptofano presentes dos exsudatos liberados pelas raízes, estimulando a síntese de auxina na rizosfera (BOGAS et al., 2016; GRAÇAS et al., 2015).

Nesse contexto, diversos gêneros de bactérias associadas às plantas produtoras de AIA isoladas endofiticamente e relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal têm sido descritas pertencentes aos seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Xanthomonas* podendo promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (CASTILLO et al., 2015; CASTRO et al., 2018a; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014).

A capacidade das bactérias em sintetizar AIA em meios de cultura pode ser afetada por vários fatores como a concentração de triptofano disponível, pH e fontes de nutrientes. Bactérias da mesma espécie podem apresentar uma concentração ótima de triptofano para estimular a produção de AIA (BAR; OKON, 1993; PATIL et al., 2011).

A resposta das plantas ao AIA liberado por bactérias pode variar de efeitos benéficos a deletérios, dependendo de sua concentração. Quando em baixas concentrações o ácido indol acético pode estimular o crescimento e, quando em concentrações muito alta pode inibir o desenvolvimento da raiz. No entanto, não existe uma faixa de concentração benéfica ou tóxica comum a todas as espécies vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.4.3. Atividade antagônica a fungos fitopatogênicos

Para verificação da atividade antagônica a fungos fitopatogênicos, foram selecionadas 100 isolados bacterianos endofíticos, sendo 50 oriundos do café convencional e 50 do café orgânico. O critério de seleção foi ISF médio, positivo para FBN e as maiores taxas de produção de AIA.

Dos 100 isolados testados contra os fungos fitopatogênicos, 20 apresentaram alguma

atividade antagônica contra o fungo *Colletotrichum* sp., 26 contra *Fusarium oxysporium* e 35 contra *F. solani*, conforme demonstrado na Tabela 2.

As porcentagens totais de isolados bacterianos endofíticos com potencial antagônico testados contra as três espécies de fungos fitopatogênicos são apresentados na Figura 10.

O aumento da produção de alimentos enfrenta muitos desafios sobre o sistema agrícola atual, já que essas necessidades alimentares devem ser atendidas a partir dos mesmos recursos atuais como terra, água, etc. (SAEEDI SARAVI; SHOKRZADEH, 2012).

Um dos principais problemas enfrentados na agricultura são os prejuízos ocasionados por pragas e doenças. Em especial, as doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos são um fator limitante na produção agrícola, sendo responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes, cerca de 85% das doenças das plantas são causadas por fungos. Essas doenças propiciam queda de produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores (BUENO; FISCHER, 2006).

A utilização de fungicidas é o principal meio de controle das doenças, ocasionando melhorias significativas na produtividade e qualidade das culturas agrícolas nas últimas décadas, porém o uso excessivo e indevido de agroquímicos tem gerado problemas ao meio ambiente e a saúde pública (PAL; GARDENER, 2006). Entre os efeitos do uso indiscriminado desses produtos, destaca-se a toxicidade aguda e crônica, a contaminação de material e produtos de colheita, dos solos, da água, do ar, além da fauna, da flora e do homem. Segundo o Ministério da Saúde (MS), estima-se que, anualmente 400 mil pessoas são intoxicadas por agrotóxicos no Brasil, com cerca de 4 mil mortes por ano (LIMA BOHNER; ARAÚJO; NISHIJIMA, 2013).

Diferentes abordagens podem ser utilizadas para prevenir, mitigar ou controlar as doenças das plantas. Nesse sentido, a busca por novas práticas de proteção vegetal surge como alternativa aos agroquímicos, entre elas estão a prática de controle biológico (AZEVEDO et al., 2000; LACAVAL; AZEVEDO, 2014; SAITO et al., 2009).

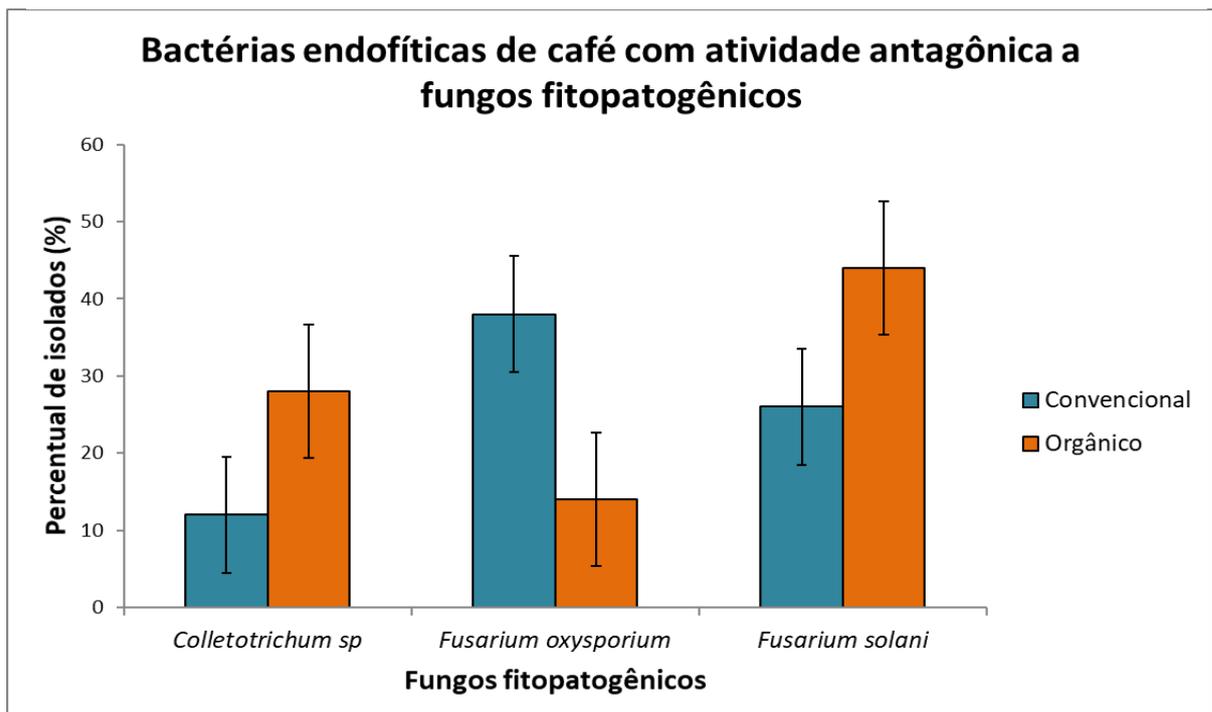
Existem na literatura vários exemplos de estudos de biocontrole utilizando bactérias rizosféricas e endofíticas com potencial antagônico contra fungos fitopatogênicos. Shiomi et al. (2006), selecionou isolados de bactérias endofíticas de folhas e ramos de cafeeiro com potencial para o controle biológico da ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Alguns isolados foram eficientes em controlar a ferrugem do cafeeiro, embora outros tenham aumentado a severidade da doença (SHIOMI et al., 2006).

Potencial antagônico foi demonstrado em quatorze isolados bacterianos endofíticos do pinhão-mansão quando inibiram ao menos dois dos fungos fitopatogênicos *Alternaria*

alternata, *Ceratocystes paraxoxa*, *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides* (MACHADO, 2015). Duas linhagens endofíticas de *Bacillus* isoladas de raízes (H15) e colmos (H14) de uma variedade indiana de cana-de-açúcar apresentaram atividade antifúngica contra *Colletotrichum falcatum* (CHAUHAN; BAGYARAJ; SHARMA, 2013). Adicionalmente, foi mostrado que *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas cepacia* foram utilizados para controlar a podridão radicular causada pela *F. verticillioides* na Argentina (CAVAGLIERI et al., 2005). *Bacillus amyloliquefaciens* pode reduzir o teor de fumonisina em grãos de colheita durante três estações avaliadas (PEREIRA et al., 2011). Em estudo realizado por He et al., (2009), há o relato da capacidade antagônica de bactérias do gênero *Phyllobacterium* sp. contra o fitopatógeno *A. alternata* (HE et al., 2009).

O gênero *Bacillus* mesmo não sendo superior em relação à sua atividade biocontroladora quando comparado com outros gêneros bacterianos, tem grande vantagem em relação aos outros, devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a agroquímicos, fertilizantes e ao tempo de estocagem, permitindo, portanto, sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de folhas na forma de sprays (BACKMAN; WILSON; MURPHY, 1997; BARRATT et al., 2018; BATISTA et al., 2018).

Figura 10 - Atividade antagônica *in vitro* dos isolados bacterianos endofíticos aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* sp. *Fusarium oxysporium* e *F. solani*.



Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (BÓKA et al., 2019; SHODA, 2000). Várias espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (BATISTA et al., 2018; BÓKA et al., 2019; CHENNIAPPAN et al., 2019).

Diferentes linhagens de bactérias endofíticas apresentam atividade antagonista contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole e manejo integrado de doenças agrícolas (DIAS et al., 2009; LEONARDO INIGUEZ et al., 2005; OUBAHA et al., 2019; RATH; MITCHELL; GOLD, 2018; SCHULZ; BOYLE, 2005; SESSITSCH; REITER; BERG, 2004).

Estudos com o intuito de avaliar a atividade biológica de micro-organismos endofíticos, a fim de se obter novos compostos bioativos vêm sendo conduzidos e resultados muito promissores têm sido alcançados; principalmente com potencial para o biocontrole de micro-organismos fitopatogênicos (CHANG et al., 2016; FELIPHE, 2015; FUCHS; KRAUSS, 2018; KUMAR et al., 2013; LACAVA; AZEVEDO, 2013, 2014; LOPES, 2008; RATH; MITCHELL; GOLD, 2018).

2.4.4. Atividade enzimática

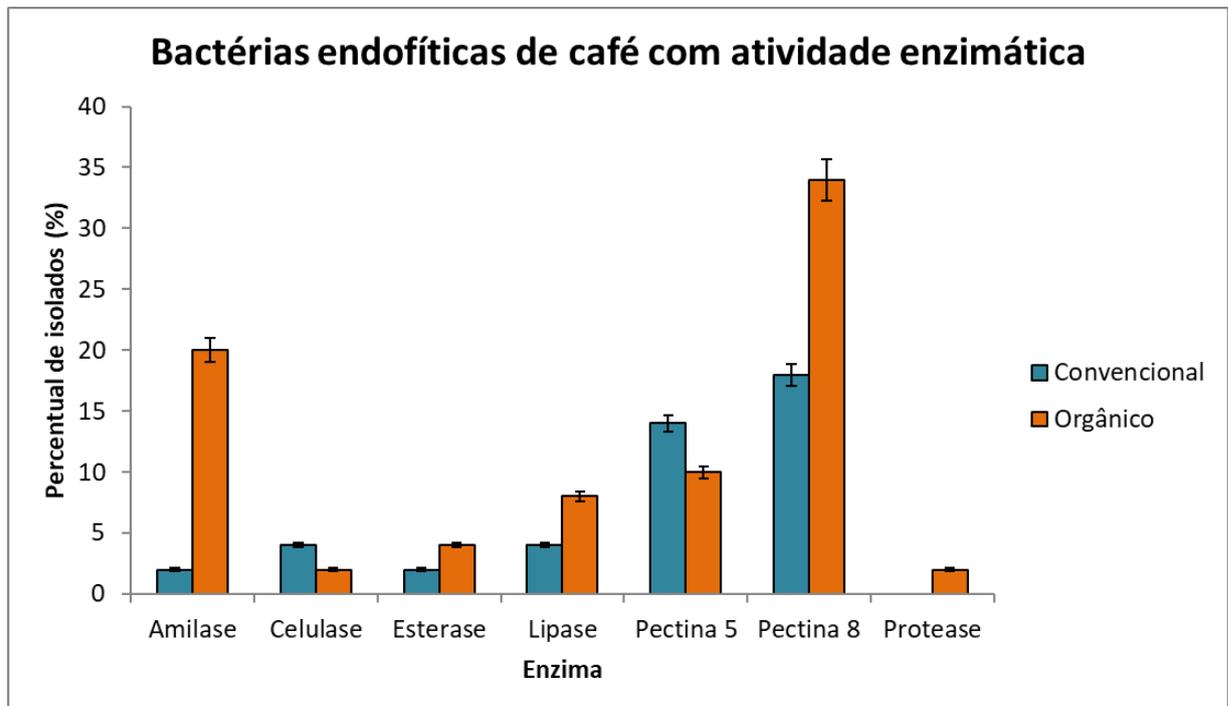
As mesmas linhagens bacterianas selecionadas previamente para o antagonismo aos fungos fitopatogênicos também foram analisadas quanto atividade enzimática (item 2.4.3). Dos 100 isolados bacterianos endofíticos avaliados, 11 apresentaram atividade amilolítica, 3 atividade celulolítica, 3 atividade esterolítica, 3 atividade lipolítica. Para atividade proteolítica 12 isolados apresentaram atividade da poligalacturonase, 26 para atividade de pectatoliase e um isolado apresentou atividade proteolítica. As porcentagens considerando o tipo de manejo do qual o isolado é proveniente estão apresentadas na Figura 11.

As enzimas são, em sua maioria proteínas, produzidas por todos os organismos vivos, atuando como catalisadoras de reações químicas de forma seletiva como parte do processo essencial da vida, tais como digestão, respiração, metabolismo e manutenção de tecidos. Em outras palavras, são catalisadores biológicos altamente específicos sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico (NELSON; COX, 2014).

Os micro-organismos endofíticos são considerados um reservatório para novos metabolitos secundários, apresentando grande potencial para a exploração médica, industrial e

agrícola, (LACAVA; AZEVEDO, 2013; PAMPHILE et al., 2017; STROBEL; DAISY, 2003).

Figura 11- Atividade enzimática dos isolados bacterianos endofíticos oriundos de manejo convencional e orgânico da cultura do café.



As enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, no entanto as enzimas de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, médica e agrícola, devido à facilidade de produção em larga escala. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento (FACCHIN, 2013; LUZ et al., 2016; NIGAM, 2013).

Na verdade, as enzimas de origem microbiana têm elevado interesse biotecnológico, tais como processamento de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis e produtos farmacêuticos, terapia médica e biologia molecular (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006b; MINOTTO et al., 2014a; PAMPHILE et al., 2017).

Em pesquisa semelhante, Bonatelli (2012), analisou bactérias endofíticas isoladas de folhas da cultura do guaraná para atividade enzimática e verificou um total de 13,4% dos isolados produzindo amilases, 14,8% celulases, 19,9% lípases, 20,8% esterases, 22,7% pectinases e 44% proteases. A mesma autora verificou que celulase, amilase, lípase, esterase, pectinase e protease foram produzidas por várias bactérias tanto provenientes de plantas

sintomáticas (com sintomas de antracnose) como assintomáticas (aparentemente sadias) com diferenças estatisticamente significantes para amilase, lípase, e poligalacturanase para as assintomáticas em relação às sintomáticas o que poderia indicar que elas exerçam um papel no controle da antracnose em plantas sadias (BONATELLI, 2012).

Prasad e Dagar (2014), relatam a capacidade de isolados do abacate e de uvas pretas em produzir catalase, lipase e esterase.

Vários trabalhos relatam atividades enzimáticas com diferentes isolados bacterianos com maior destaque para enzimas proteolíticas que tem grande utilidade nas indústrias de detergentes ou similares (CASTRO et al., 2014; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; ANDRADE, 2010; KALAIYARASI et al., 2017).

As enzimas esterase e lípase tem a atenção de indústrias principalmente para aplicações como: tratamento de óleos e gorduras, produção de detergentes, processamento de alimentos, síntese de produtos químicos e farmacêuticos, fabricação de papel e produção de cosméticos (EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2013; FLORES-FERNÁNDEZ et al., 2019; MINOTTO et al., 2014b; PAMPHILE et al., 2017).

Bactérias endofíticas são descritas com potencial biotecnológico para a produção de enzimas e isoladas de diferentes plantas hospedeiras: abacate (PRASAD; DAGAR, 2014); arroz (MEHDIPOUR-MOGHADDAM et al., 2010); guaraná (BONATELLI, 2012); jacarandá (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006b); manga (KANNAN; DAMODARAN; UMAMAHESWARI, 2015); mangaue (CASTRO et al., 2014); morango (DIAS et al., 2009); plantas medicinais (JALGAONWALA; MAHAJAN, 2011); soja (ASSUMPCÃO et al., 2009) e tomate (MINOTTO et al., 2014a).

Khianngam et al. (2013) isolaram e selecionaram bactérias endofíticas de plantas de mangaue na Tailândia para a presença de enzimas hidrolíticas. Uma linhagem de *Bacillus safensis*, que foi isolada do fruto de *Rhizophora mucronata*, foi capaz de produzir proteases, lipases, amilases (KHIANNGAM et al., 2013). Mais de 50% dos isolados bacterianos endofíticos isolados de três espécies de mangaue que ocorrem no estado de São Paulo avaliados por Castro et al. (2014) produziram endoglucanase.

As celulasas são comercialmente produzidas por várias indústrias mundialmente e são amplamente utilizadas em alimentos, rações para animais, fermentação, agricultura, pasta e papel e aplicações têxteis (FACCHIN et al., 2013).

Dentre as enzimas líticas produzidas por micro-organismos endofíticos, destacam-se as quitinases, as β -1,3-glucanases, as celulasas, lipases e proteases que são capazes de degradar constituintes das paredes de fungos fitopatogênicos (DIAS, 2011; PÉREZ et al.,

2019; SILVA et al., 2016; STROBEL; DAISY, 2003).

Isto revela que estes micro-organismos são uma fonte com potencial para a aplicação biotecnológica em diferentes áreas, tais como: produção de detergentes, papel, fármacos, têxtil e indústria de couro; onde a utilização de enzimas é de fundamental importância (CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006b; FACCHIN et al., 2013; NIGAM, 2013).

2.4.5. Identificação dos isolados bacterianos endofíticos

2.4.5.1. Análise proteica das células bacterianas por MALDI-TOF

Dos 100 isolados endofíticos analisados quanto ao antagonismo aos fungos fitopatogênicos e a atividade enzimática, 59 foram submetidos à análise proteica das células bacterianas por MALDI-TOF e foram identificados, sendo 30 linhagens provenientes do café de cultivo convencional e 29 linhagens provenientes do cultivo orgânico.

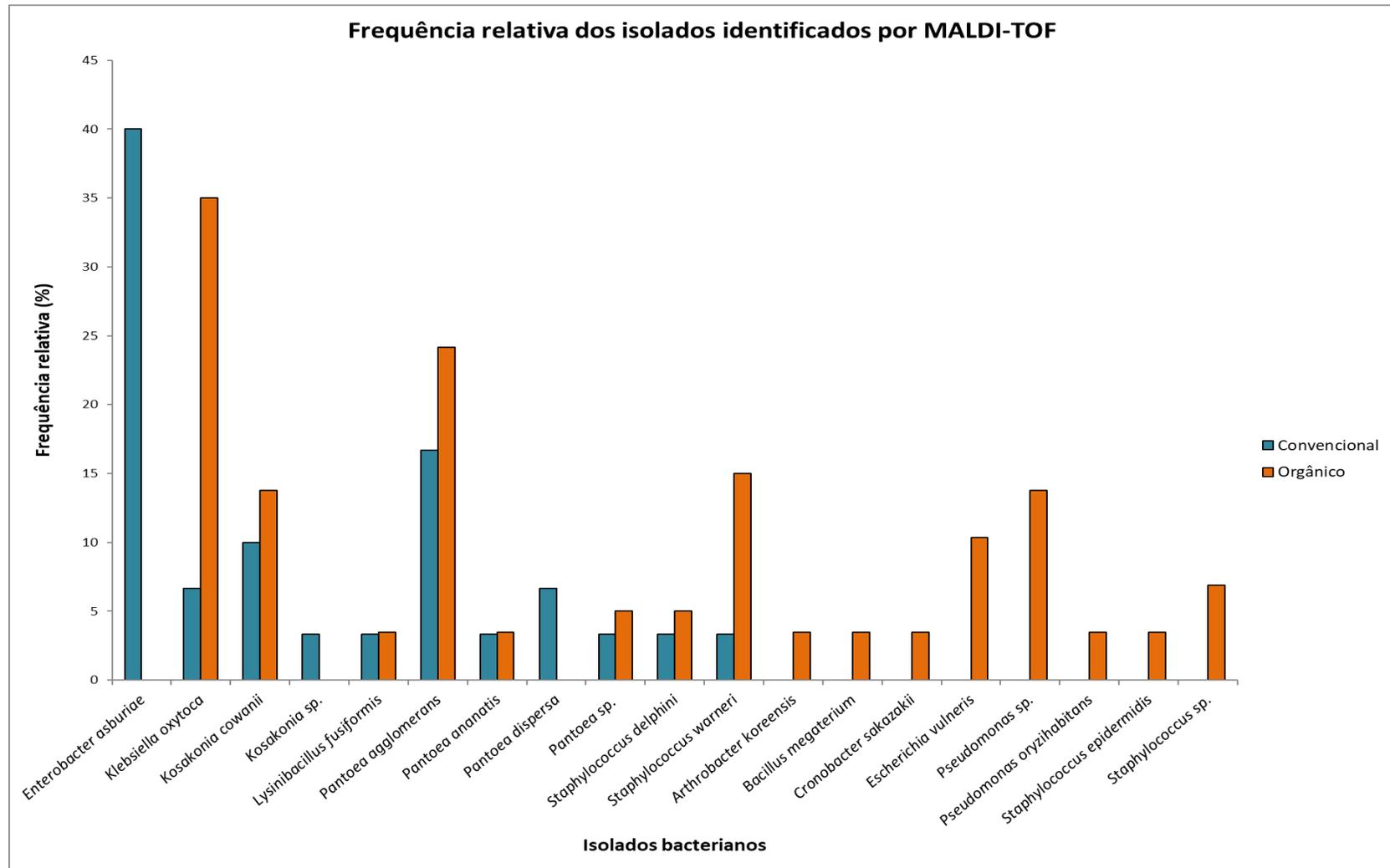
Na Tabela 3 são apresentados os isolados bacterianos e suas respectivas identificações e *scores* obtidos pelo sistema automático MALDI Biotyper 3.0. Para esta identificação microbiana MALDI-TOF, a seguinte referência da Coleção Cultura de Microbiologia Agrícola (CCMAUFLA, <http://www.ccma.dbi.ufla.br>) foram utilizados: CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*, Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, CCMA 0054 *Bacillus subtilis*, CCMA 0085 *Bacillus subtilis*.

A partir dos 30 isolados provenientes do cultivo convencional (Figura 14) que foram analisados e identificados, a *Enterobacter asburiae* foi a espécie bacteriana mais frequente. Já no cultivo orgânico, dos 29 isolados analisados e identificados, foi a *Klebsiella oxytoca* a mais frequente.

Tabela 3. Identificação por MALDI-TOF dos isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico.

Isolado	Identificação	Score	Isolado	Identificação	Score	Isolado	Identificação	Score
CFO 295	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.159	CRA 292	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.201	OFR182	<i>Escherichia vulneris</i>	2.026
CFO 299	<i>Pantoea dispersa</i>	2.295	CRA 298	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.097	OFR183	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1.761
CFO 301	<i>Pantoea dispersa</i>	2.309	CRA 301	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.191	OFR187	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.780
CRA 202	<i>Kosakonia sp.</i>	1.870	CRA 303	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.206	OFR191	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.875
CRA 204	<i>Pantoea sp.</i>	1.463	CRM 139	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.993	OFR192	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.965
CRA 205	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.972	CRM 157	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.734	OFR193	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.055
CRA 215	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.907	CRM 162	<i>Staphylococcus delphini</i>	1.341	OFR194	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.001
CRA 221	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.865	CRM 184	<i>Pantoea ananatis</i>	2.138	OFR195	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.090
CRA 225	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.225	CRM 189	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.241	OFR196	<i>Escherichia vulneris</i>	2.109
CRA 232	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.718	CRM 192	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.815	OFR197	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.086
CRA 238	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.244	OFR 164	<i>Bacillus megaterium</i>	1.894	OFR204	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.048
CRA 240	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.241	OFR170	<i>Staphylococcus sp.</i>	1.915	OFO340	<i>Arthrobacter koreensis</i>	2.046
CRA 241	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.234	OFR171	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	2.124	ORA 217	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.033
CRA 244	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.178	OFR173	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.549	ORM257	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1.865
CRA 247	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.155	OFR174	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.659	ORM 261	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.045
CRA 249	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.147	OFR175	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.639	ORM262	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.846
CRA 250	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.101	OFR176	<i>Pseudomonas sp.</i>	1.457	ORM265	<i>Pantoea sp.</i>	1.919
CRA 251	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.195	OFR177	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.779	ORM284	<i>Pantoea ananatis</i>	2.016
CRA 252	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.124	OFR180	<i>Kosakonia cowanii</i>	1.773	ORM326	<i>Staphylococcus sp.</i>	1.861
CRA 286	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.364	OFR181	<i>Escherichia vulneris</i>	2.022			

Figura 12 - Frequência de bactérias endofíticas de café proveniente de cultivo convencional e orgânico identificados por MALDI-TOF.



2.4.5.2. Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

Dos 100 isolados endofíticos analisados quanto ao antagonismo aos fungos fitopatogênicos e a atividade enzimática, 40 foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, sendo 20 linhagens provenientes do café de cultivo convencional e 20 linhagens provenientes do cultivo orgânico. As sequências obtidas do gene 16S rDNA foram comparadas com sequências do *GenBank* através do programa *BLASTn* (NCBI – www.ncbi.nih.gov). O critério de seleção para o sequenciamento foi baseado na morfologia das bactérias, buscando abranger os diferentes aspectos fenotípicos apresentados pelas linhagens, o potencial para promoção de crescimento vegetal *in vitro* por meio da solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA), antagonismo aos fungos fitopatogênicos e atividade enzimática. Na Tabela 4 são apresentadas as linhagens bacterianas endofíticas e suas respectivas identificações por similaridade ao gene 16S rDNA em 95% utilizando fragmentos de 750pb.

A partir dos 20 isolados provenientes do cultivo convencional que foram identificados, a *Kosakonia cowanii* foi a espécie bacteriana mais frequente (Tabela 5). Já no cultivo orgânico, dos 20 isolados analisados e identificados, foram as espécies *Lysinibacillus mangiferihumi*, a *Pantoea brenneri* e a *P. deleyi* as mais frequentes.

Portanto, a análise das árvores filogenéticas contendo os isolados identificados provenientes do café convencional e orgânico (Figuras 14 e 15) indica que a comunidade bacteriana endofítica do café proveniente da área de cultivo orgânico apresenta maior diversidade bacteriana.

Oliveira *et al.* (2014) realizaram comparações entre comunidades endofíticas de fungos em de folhas de *Coffea arabica* em sistemas de cultivo orgânico e convencional no Nordeste do Brasil e observou 50,61% de similaridade, com seis espécies ocorrendo de forma única em café orgânico e cinco em café convencional. *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phyllosticta capitalensis* foram os fungos mais comuns em sistemas convencionais e orgânicos, respectivamente (OLIVEIRA, 2014). Xia *et al.* (2015) estudaram a diversidade e especificidade de endófitos bacterianos cultiváveis em quatro hortaliças, milho, tomate, melão e pimenta, cultivados sob condições orgânicas ou convencionais práticas.

No presente estudo, bactérias endofíticas foram isoladas de brotos, raízes e tecidos de sementes, e as sequências foram identificadas. A abundância de espécies bacterianas endofíticas e diversidade foram significativamente maior nas cultivares provenientes do

manejo orgânico comparados aos provenientes de manejo convencional. Isso indica que as práticas de manejo orgânico podem aumentar a ocorrência e a diversidade de bactérias endofíticas (BONGIORNO et al., 2016).

De 100 isolados endofíticos analisados quanto ao potencial de promoção do crescimento de plantas, 40 isolados foram identificados utilizando a sequência parcial do gene 16S rDNA. A maioria dos isolados foi identificada em nível de espécie como mostrado na Tabela 4.

A abundância relativa de espécies e gêneros de bactérias endofíticas de café de cultivo convencional e orgânico são mostradas na Tabela 5 e na Figura 13.

Todos os gêneros e espécies bacterianas endofíticas identificadas oriundas de cafeeiros com manejo convencional pertencem ao filo Proteobacteria. Enquanto os isolados de café do cultivo orgânico pertencem a dois filos: Proteobacteria e Firmicutes. A espécie *Kosakonia cowanii* foi a mais abundante (20,00%) no cultivo convencional, enquanto no cultivo orgânico, *Lysinibacillus mangiferihumi*, *Pantoea brenneri* e *Pantoea deleyi* apresentaram abundância relativa semelhante (15,00%) sendo as mais abundantes.

Este resultado difere do obtido por Vega et al. (2005). Entre os 87 isolados cultiváveis identificados, houve predomínio de *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* (VEGA et al., 2005).

Tabela 4. Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico.

Isolado	Identificação	Similaridade	Nº de acesso	Isolado	Identificação	Similaridade	Nº de acesso
CRM 139	<i>Kosakonia cowanii</i>	99%	NR_025566.1	OFR 164	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97%	NR_114715.1
CRM 157	<i>Erwinia billingiae</i>	99%	NR_118431.1	OFR175	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	100%	NR_118146.1
CRM 162	<i>Erwinia billingiae</i>	99%	NR_118431.1	OFR195	<i>Pantoea brenneri</i>	99%	NR_116748.1
CRM 184	<i>Pantoea ananatis</i>	99%	NR_026045.1	OFR197	<i>Pantoea brenneri</i>	99%	NR_116748.1
CRM 189	<i>Pantoea allii</i>	99%	NR_115258.1	ORA216	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	NR_113957.1
CRM 192	<i>Kosakonia cowanii</i>	99%	NR_025566.1	OFR170	<i>Staphylococcus cohnii</i>	99%	NR_037046.1
CFO 299	<i>Pantoea sp.</i>	100%	MG846111.1	OFR171	<i>Kurthia gibsonii</i>	99%	NR_118298.1
CRA 202	<i>Kosakonia cowanii</i>	98%	MG871201.1	OFR173	<i>Pseudomonas straminea</i>	97%	NR_113859.1
CRA 204	<i>Enterobacter sp.</i>	99%	KP145012.1	OFR174	<i>Pseudomonas straminea</i>	99%	NR_113859.1
CRA 205	<i>Enterobacter sp.</i>	99%	KP145012.1	OFR176	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	97%	NR_118146.1
CRA 221	<i>Kosakonia cowanii</i>	99%	MF525501.1	OFR177	<i>Pantoea anthophila</i>	99%	NR_116749.1
CRA 225	<i>Klebsiella sp.</i>	99%	MG549847.1	OFR180	<i>Kosakonia cowanii</i>	99%	NR_025566.1
CFO 295	<i>Klebsiella michiganensis</i>	99%	NR_118335.1	OFR193	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	99%	NR_118146.1
CRA 240	<i>Pantoea rwandensis</i>	99%	NR_118121.1	OFR194	<i>Pantoea brenneri</i>	95%	NR_116748.1
CRA 241	<i>Enterobacter tabaci</i>	96%	NR_146667.2	ORM265	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	NR_113957.1
CRA 244	<i>Klebsiella michiganensis</i>	99%	NR_118335.1	ORM284	<i>Rhizobium alkalisoli</i>	97%	NR_116162.1
CRA 247	<i>Enterobacter tabaci</i>	99%	NR_146667.2	ORM326	<i>Klebsiella michiganensis</i>	99%	NR_118335.1
CRA 250	<i>Enterobacter tabaci</i>	99%	NR_146667.2	OFO340	<i>Enterobacter bugandensis</i>	99%	NR_148649.1
CRA 298	<i>Pantoea brenneri</i>	97%	NR_116748.1	ORM262	<i>Pantoea deleyi</i>	99%	NR_116114.1
CRA 303	<i>Pantoea eucalypti</i>	99%	NR_116112.1	ORM257	<i>Pantoea deleyi</i>	97%	NR_116114.1

Tabela 5. Abundância relativa dos grupos bacterianos associados ao café proveniente do cultivo convencional e orgânico.

CULTIVO CONVENCIONAL		CULTIVO ORGÂNICO	
Grupo bacteriano	Abundância relativa (%)	Grupo bacteriano	Abundância relativa (%)
<i>Kosakonia cowanii</i>	20,00	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	15,00
<i>Enterobacter tabaci</i>	15,00	<i>Pantoea brenneri</i>	15,00
<i>Enterobacter sp.</i>	10,00	<i>Pantoea deleyi</i>	15,00
<i>Erwinia billingiae</i>	10,00	<i>Pseudomonas straminea</i>	10,00
<i>Klebsiella sp.</i>	5,00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10,00
<i>Klebsiella michiganensis</i>	5,00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,00
<i>Pantoea allii</i>	5,00	<i>Klebsiella michiganensis</i>	5,00
<i>Pantoea ananatis</i>	5,00	<i>Pantoea anthophila</i>	5,00
<i>Pantoea brenneri</i>	5,00	<i>Rhizobium alkalisoli</i>	5,00
<i>Pantoea eucalypti</i>	5,00	<i>Staphylococcus cohnii</i>	5,00
<i>Pantoea rwandensis</i>	5,00	<i>Enterobacter bugandensis</i>	5,00
<i>Pantoea sp.</i>	5,00	<i>Kosakonia cowanii</i>	5,00
		<i>Kurthia gibsonii</i>	5,00

Figura 13 - Frequência de bactérias endofíticas de café proveniente de cultivo convencional e orgânico identificados por sequenciamento do gene 16S rDNA.

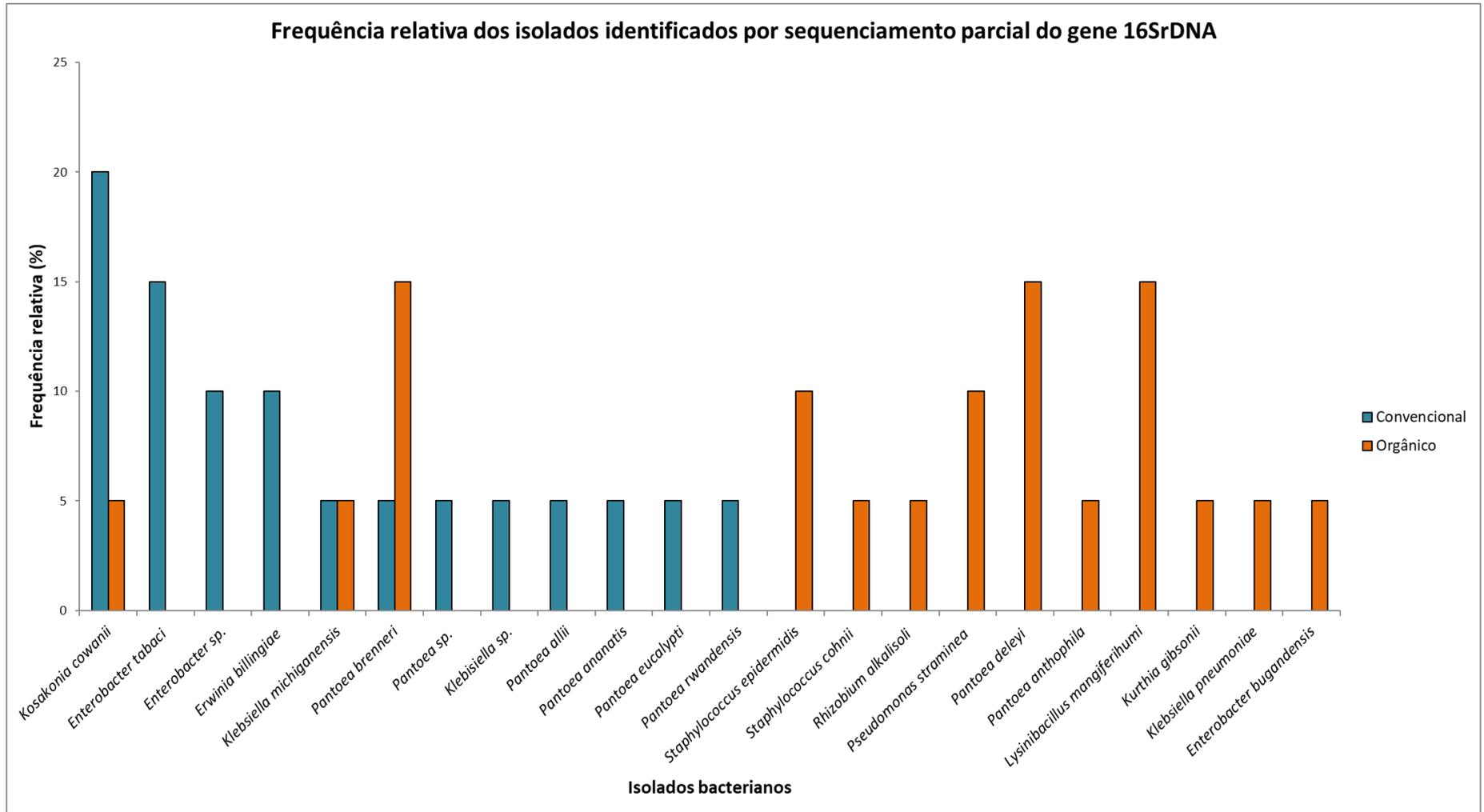


Figura 14 - Árvore filogenética dos genes 16S rRNA de comunidades bacterianas endofíticas presentes no café proveniente do cultivo convencional com bactérias obtidas no GenBank; construída por método de agrupamento “Neighbor-joining” usando “p-distance” para nucleotídeos e 1.000 repetições.

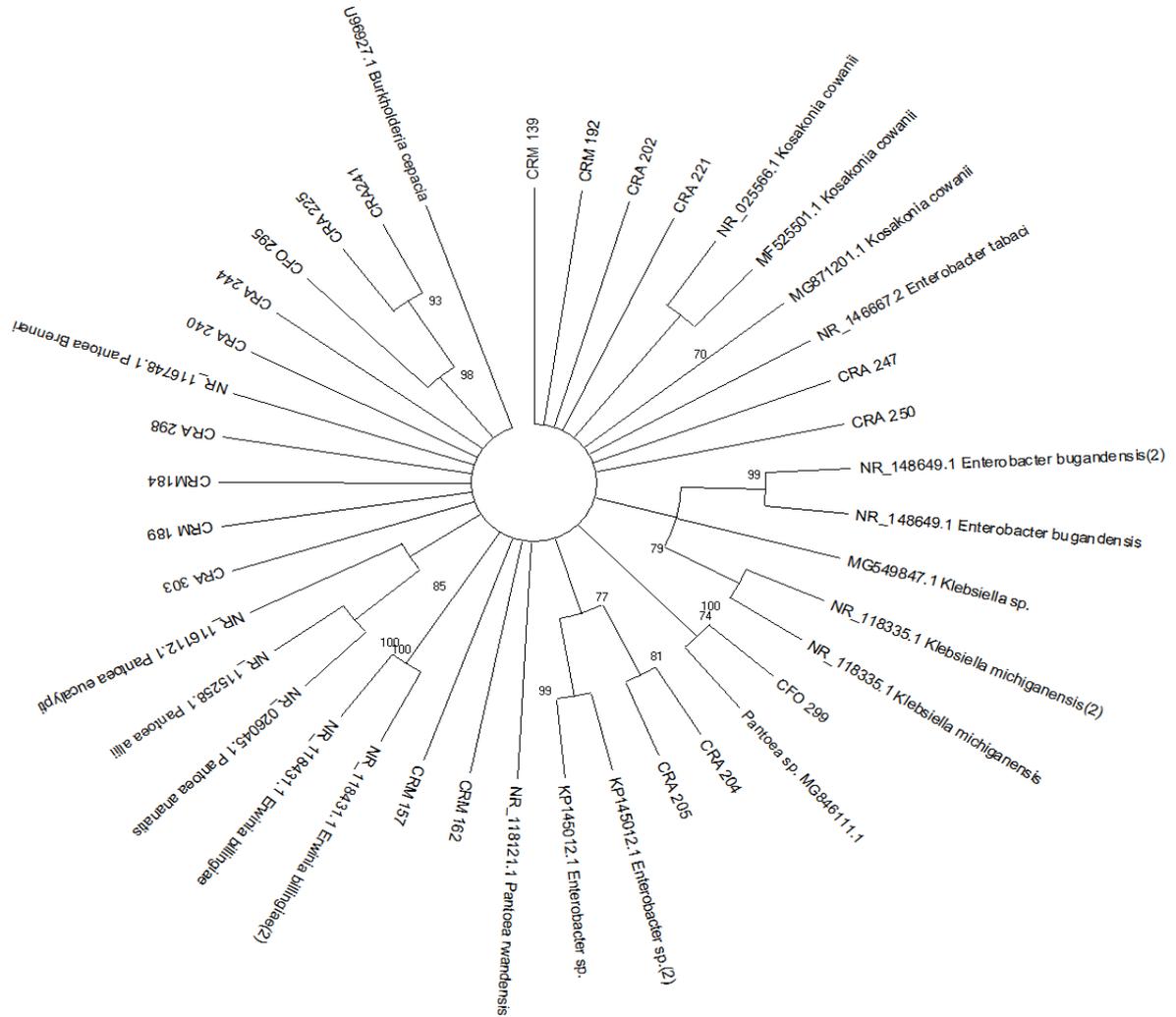


Figura 15 - Árvore filogenética dos genes 16S rRNA de comunidades bacterianas endofíticas presentes no café proveniente do cultivo orgânico com bactérias obtidas no GenBank; construída por método de agrupamento “Neighbor-joining” usando “p-distance” para nucleotídeos e 1.000 repetições.



O gênero bacteriano *Kosakonia* sp, reclassificado em *Enterobacter* (BRADY et al., 2013), embora compreenda muitos patógenos específicos de plantas, animais e humanos, tem sido descrito que esses gêneros causam efeitos benéficos a várias espécies plantas (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; GAIERO et al., 2013; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Esta mesma espécie foi isolada do feijão-do-marama (*Tylosema esculentum*) na Namíbia e foi caracterizada como produtora de ácido indol-acético e sideróforos e confirma o potencial de promoção de crescimento vegetal dessa bactéria que também tem sido relatada

no café convencional (CHIMWAMUROMBE; GRÖNEMEYER; REINHOLD-HUREK, 2016).

A *Lysinibacillus mangiferihumi* é uma bactéria Gram-positiva, designada por M-GX18T. Foi isolado do solo rizosférico de manga (Província de Guangxi, China). O isolado produziu compostos voláteis nematicidas com atividades contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (KÄMPFER; MARTIN; GLAESER, 2013).

Nenhum estudo foi encontrado em que esta bactéria foi isolada endofiticamente. Portanto, o presente estudo pode ser o primeiro a relatar a associação dessa bactéria com o café orgânico.

Espécies endofíticas de *Klebsiella* sp. já foram isoladas de *Coffea arabica* L. originárias da Colômbia, como *Klebsiella planticola*, *K. pneumoniae* e *K. trevisanii* (VEGA et al., 2005). Santos (2008) também isolou *K. oxytoca* de *C. arábica* (SANTOS, 2008). A *Klebsiella pneumoniae* também foi encontrada como endofítica (CHELIUS; TRIPLETT, 2000) e, quando inoculada na rizosfera de *Arabidopsis*, alfafa e no trigo, apresentou altos níveis de colonização e capacidade de promover o crescimento (DONG; INIGUEZ; TRIPLETT, 2003). Esse resultado corrobora os isolados de *K. michiganensis* e *K. pneumoniae* reportados no café orgânico do presente estudo.

Embora o gênero *Staphylococcus* não seja frequentemente observado em estudos de isolamento de micro-organismos endofíticos e não tenha confirmado seu caráter endofítico (LODEWYCKX et al., 2002; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997a); o isolamento e identificação por análise de ácidos graxos de bactérias endofíticas de algodão e milho (MCINROY; KLOEPPER, 1995) mostraram a ocorrência de 39 isolados representando a espécie *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. warneri*.

Posteriormente, em um estudo da diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café, a ocorrência de *Staphylococcus epidermidis* foi observada em uma proporção de 8,00% das sequências analisadas (SANTOS, 2008).

Além disso, estudos avaliando a resposta da comunidade de bactérias endofíticas à infecção por *Erwinia carotovora* em batata mostraram a presença de clones de 16S rDNA com alta identidade com sequências de *S. warneri* e *S. xylosus* (REITER et al., 2002).

Em outro estudo que investigou a diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar e cerejas, também foram encontradas sequências de *Staphylococcus epidermidis* (BÖHME et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Esses estudos corroboram a presença de *S. epidermidis* e *S. cohnii* em café orgânico encontrados no presente estudo.

A microbiota endofítica presente no café ainda não foi extensivamente investigada e apenas alguns estudos relacionados a esta cultura foram publicados (SILVA et al., 2008; VEGA et al., 2005; VILELA et al., 2010); incluindo estudo de prospecção de promotores de crescimento vegetal e agentes de biocontrole (SILVA et al., 2012a); estudo sobre a diversidade microbiana endofítica em frutos de café do sudeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2013); estudo da comunidade microbiana bem como seus metabólitos e mecanismos de fermentação e sua influência no sabor do café (HAILE; KANG, 2019; WANG et al., 2019a; ZHANG et al., 2019b).

Pantoea agglomerans, detectado em folhas de café de plantas adultas e sementes de café, foi relatado em sementes de arroz (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), milho (RIGGS et al., 2001), batatas (KRECHEL et al., 2002), citrus (ARAÚJO et al., 2001), trevo vermelho (STURZ et al., 1997) e ervilhas (ELVIRA-RECUENCO; VAN VUURDE, 2000) e também tem sido usado para o controle de *Penicillium digitatum* e *P. italicum* em citros (POPPE et al., 2002). *P. agglomerans* também foi relatado como um fixador de N₂ no intestino de cupins (POTRIKUS; BREZNAK, 1977).

Assim, é provável que a maioria dos micro-organismos endofíticos do cafeeiro pertencentes a este gênero podem estar envolvidos nos mecanismos biocontrole e fixação biológica de nitrogênio.

Apesar dos esforços anteriores para isolar e caracterizar os endófitos presentes no cafeeiro para melhor entender sua ecologia e fisiologia, uma descrição filogenética da microbiota presente na planta está longe de ser completa. Nosso estudo, além de estudar a diversidade de bactérias endofíticas com potencial para promover o crescimento das plantas; buscou verificar a ocorrência desses micro-organismos em cafeeiros oriundos do cultivo convencional e orgânico.

Embora entendamos as limitações do nosso estudo, reforçamos que este é um esforço para melhor caracterizar a microbiota em cafeeiros e entender a possível ecologia neste sistema. Assim, generalizações dos resultados observados aqui para outras configurações semelhantes devem ser cuidadosamente consideradas. (Vega et al. 2005; Silva et al. 2008, 2012; Vilela et al. 2010).

De fato, é provável que os ambientes agrícolas, assim como as técnicas de cultivo, exerçam uma grande influência na estrutura e riqueza do ambiente e também na comunidade endofítica da planta. Portanto, não é de surpreender que não tenhamos detectado membros que são comumente encontrados como endófitos em plantas de café, porque essas bactérias foram previamente selecionadas de seu potencial para promover o crescimento das plantas.

Em contrapartida, também foi possível identificar bactérias que não haviam sido mencionadas anteriormente como endofíticas de plantas de café, como é o caso de *Kosakonia cowanii* e *Lysinibacillus mangiferihumi* e que coincidentemente foram as bactérias que apresentaram maior abundância relativa em café convencional e orgânico, respectivamente.

CAPÍTULO 3

INOCULAÇÃO *IN VIVO* DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Coffea arabica* L. COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO

As bactérias endofíticas possuem uma íntima interação com as plantas e são capazes de promover o seu crescimento. A utilização dessas bactérias em algumas etapas da produção agrícola pode levar a aumento significativo da produtividade ou a redução de insumos; tais como adubos nitrogenados. Para a inoculação em plântulas de café foram selecionados dez isolados bacterianos endofíticos considerando a caracterização bioquímica “*in vitro*” realizada previamente em relação ao potencial de promoção de crescimento vegetal. Os tratamentos consistiram de um controle (C), com 8 repetições, onde as plântulas foram inoculadas quinzenalmente somente com o tampão PBS e 10 tratamentos (T1 a T10), com 8 repetições, que consistiram na inoculação quinzenal das plântulas com a suspensão bacteriana de CRM 162 – *Erwinia billingiae* (T1); CRM 202 – *Kosakonia cowanii* (T2); CRA 241 – *Enterobacter tabaci* (T3); CRA 250 – *Enterobacter tabaci* (T4); CRA 298 – *Pantoea brenneri* (T5) provenientes do café de cultivo convencional; e de OFR 175 – *Lysinibacillus mangiferihumi* (T6); OFR 176 – *Lysinibacillus mangiferihumi* (T7); OFR 164 – *Klebsiella pneumoniae* (T8); OFO 340 – *Enterobacter bugandensis* (T9); ORM 326 – *Klebsiella michiganensis* (T10). Após 180 dias da primeira inoculação, foram avaliadas as variáveis: altura da parte aérea (APA), comprimento do sistema radicular (CSR), diâmetro do caule (DC), peso seco da parte aérea (PSPA) e o peso seco do sistema radicular (PSSR) e foi possível observar que todos os tratamentos de plantas inoculadas com exceção do tratamento T3 provocaram a redução da (APA) em relação as plantas do grupo controle. Para CSR, todos os tratamentos diferiram significativamente do controle, apresentando um aumento do comprimento do sistema radicular de 77,76%, em média. Para as variáveis DC, PSPA, PSSR e análise de macro e micronutrientes no tecido foliar, foi possível observar que nenhum dos tratamentos diferiram significativamente do controle. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando $p \leq 0,05$. A análise de componentes principais demonstrou que CSR explicou 99% da variação total das características morfológicas observadas; ou seja, as linhagens bacterianas utilizadas foram capazes de promover crescimento das plântulas de café.

Palavras-chave: inoculação *in vivo*, bactérias endofíticas, promoção de crescimento, *Coffea arabica* L.

ABSTRACT

Endophytic bacteria have an intimate interaction with plants and are capable of promoting their growth. The use of these bacteria in some stages of agricultural production can lead to a significant increase of productivity or reduction of inputs; such as nitrogen fertilizers. For the inoculation in coffee seedlings, ten endophytic bacterial isolates were selected considering the biochemical characterization "in vitro" previously performed in relation to the potential of plant growth promotion. The treatments consisted of a control (C), with 8 replicates, where the seedlings were inoculated biweekly only with the PBS buffer and 10 treatments (T1 to T10), with 8 replications, which consisted of biweekly inoculation of the seedlings with the bacterial suspension of CRM 162 - *Erwinia bilingiae* (T1); CRM 202 - *Kosakonia cowanii* (T2); CRA 241 *Enterobacter tabaci* (T3); CRA 250 *Enterobacter tabaci* (T4); CRA 298 - *Pantoea brenneri* (T5) from conventionally grown coffee; and OFR 175 - *Lysinibacillus mangiferihumi* (T6); OFR 176-*Lysinibacillus mangiferihumi* (T7); OFR 164 - *Klebisiella pneumoniae* (T8); OFO 340 - *Enterobacter bugandensis* (T9); ORM 326 - *Klebisiella michiganensis* (T10). After 180 days of the first inoculation, the following variables were evaluated: Aerial eight (AH), root length (RL), stem diameter (SD), aerial dry weight (ADW) and dry weight of the root system (DWRS) and it was possible to observe that all treatments of plants inoculated with the exception of the T3 treatment caused the reduction of (AH) in relation to the plants of the control group. For RL, all treatments differed significantly from the control, showing an increase in root system length of 77.76%, on average. For the variables SD, ADW, DWRS, and analysis of macro and micronutrients in the leaf tissue, it was possible to observe that none of the treatments differed significantly from the control. All statistical analyzes were performed considering $p \leq 0.05$. Principal components analysis showed that CSR explained 99% of the total variation of observed morphological characteristics; that is, the bacterial strains used were able to promote growth of the coffee seedlings.

Key words: inoculation *in vivo*, endophytic bacteria, growth promotion, *Coffea arabica* L.

3.1. Introdução

Nos últimos anos, a demanda por tecnologias e alternativas para melhorar a produção agrícola de forma sustentável tornou-se primordial, principalmente a dependência de fertilizantes usados na produção de alimentos (OLIVEIRA et al., 2014).

Os métodos de cultivo das principais culturas agrícolas visam atingir a máxima produtividade. Para isso, tais métodos requerem, dentre outros insumos, a aplicação de grande quantidade de fertilizantes e agroquímicos, o que, conseqüentemente podem causar problemas à saúde humana e um desequilíbrio nos ecossistemas e biomas envolvidos. Além disso, causam, em especial, danos às comunidades de micro-organismos que habitam o solo. (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015).

O café, sendo a segunda maior *commodity* em termos de valor de mercado mundial, é potencialmente atrativo do ponto de vista comercial. A produção de café orgânico, por exemplo, oferece uma grande contribuição ao equilíbrio dos recursos naturais, uma vez que proporciona alternativas menos danosas à manutenção da fertilidade e da qualidade dos recursos naturais, além é claro, de agregar significativo valor aos produtos gerados a partir dele (JÚNIOR; JUNQUEIRA; SOARES, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado que bactérias possuem uma íntima interação com as plantas e são capazes de promover o seu crescimento, além de protegê-las contra fitopatógenos e pragas, promovendo maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico (WHIPPS, 2001; FIGUEIREDO et al., 2010; BULGARELLI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal aparece como uma alternativa viável na diminuição de custos com insumos agrícolas e no conseqüente aumento da produtividade (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; GLICK, 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

A utilização dessas bactérias pode significar aumento na germinação, rendimento de grãos, redução de doenças e melhoria do crescimento da planta em culturas como soja, feijão, algodão, milho, arroz, tomate, morango e café entre outras, o que torna o produto diferenciado e, conseqüentemente, eleva sua competitividade no mercado com custos reduzidos para o produtor. (ASSUMPÇÃO et al., 2009; HUNGRIA, 2011; PEREIRA et al., 2012; OSÓRIO FILHO et al., 2014; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2015).

Portanto, o presente capítulo visou avaliar o efeito de bactérias endofíticas de *Coffea arabica* L. previamente selecionadas, *in vitro*, sobre o crescimento de plântulas de café.

3.2. Objetivo Geral

Avaliar o potencial dos isolados bacterianos endofíticos cultiváveis de café quanto a capacidade de promoção de crescimento vegetal *in vivo* em plântulas de *Coffea arabica* L..

3.3. Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral deste capítulo, os objetivos específicos foram:

- a) Selecionar cinco isolados bacterianos endofíticos de *Coffea arabica* L. provenientes do cultivo convencional e cinco isolados bacterianos endofíticos de *C. arabica* L. provenientes do cultivo orgânico;
- b) Inocular os isolados bacterianos endofíticos de café em plântulas de *C. arabica* L. e avaliar os parâmetros indicadores de promoção de crescimento vegetal *in vivo*;
- c) Avaliar a concentração de macro e micronutrientes no tecido foliar das plântulas inoculadas.

3.4. Material e Métodos

3.4.1. Seleção das linhagens bacterianas

A partir de 342 isolados bacterianos endofíticos, dez foram selecionados para este trabalho, sendo cinco provenientes do cultivo convencional e cinco provenientes do cultivo orgânico. O critério de seleção destes para a inoculação *in vivo* foi baseado na morfologia das bactérias, buscando abranger os diferentes aspectos fenotípicos apresentados pelas linhagens. Além disso, o potencial para promoção de crescimento vegetal *in vitro* por meio da solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA), antagonismo aos fungos fitopatogênicos foram critério de seleção.

Os 10 isolados selecionadas e testadas em plântulas de café em casa de vegetação tiveram seu gene 16S rDNA sequenciado. O resultado do sequenciamento bem como os resultados do parâmetros de promoção de crescimento obtidos nos testes *in vitro* encontram-se dispostos na Tabela 6.

Os tratamentos utilizados no presente capítulo constaram de um controle (C), com 8 repetições, onde as plântulas foram inoculadas quinzenalmente somente com o tampão PBS e 10 tratamentos (T1 a T10), com 8 repetições, que consistiram na inoculação quinzenal das plântulas com a suspensão bacteriana de CRM 162 – *Erwinia billingiae* (T1); CRM 202 – *Kosakonia cowanii* (T2); CRA 241 – *Enterobacter tabaci* (T3); CRA 250 – *Enterobacter tabaci* (T4); CRA 298 – *Pantoea brenneri* (T5) provenientes do café de cultivo convencional; e de OFR 175 - *Lysinibacillus mangiferihumi* (T6); OFR 176 - *Lysinibacillus mangiferihumi* (T7); OFR 164 – *Klebsiella pneumoniae* (T8); OFO 340 – *Enterobacter bugandensis* (T9); ORM 326 - *Klebsiella michiganensis* (T10).

Tabela 6. Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos endofíticos associados ao café de cultivo convencional e orgânico e avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

Isolados	Identificação 16S	Promoção de Crescimento Vegetal <i>in vitro</i>		
		FBN ^a	ISF ^b	AIA ^c ug.ml ⁻¹
CRM 162	<i>Erwinia billingiae</i>	-	-	320,06
CRM 202	<i>Kosakonia cowanii</i>	+	4,74	9,11
CRA 241	<i>Enterobacter tabaci</i>	+	2,65	297,09
CRA 250	<i>Enterobacter tabaci</i>	+	2,25	491,06
CRA 298	<i>Pantoea brenneri</i>	+	2,58	129,30
OFR175	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	+	3,39	138,0
OFR176	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	+	4,27	77,7
OFR164	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	3,93	46,0
OFO340	<i>Enterobacter bugandensis</i>	+	2,99	33,6
ORM326	<i>Klebsiella michiganensis</i>	+	4,09	58,5

a Fixação Biológica de Nitrogênio;

b Índice de Solubilização de Fosfato

c Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

Os isolados foram cultivados separadamente, em meio caldo triptona de soja (TSB), a 28°C, até atingir a concentração de 1×10^9 UFC.ml⁻¹. Para o cálculo da viabilidade das células e determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC), as culturas crescidas são diluídas serialmente até a diluição de 10⁻⁸, plaqueadas nas diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ contadas pela técnica de microgota.

Após a incubação e contagem do crescimento, as células foram centrifugadas a 9000 ×

g durante 10 minutos e lavadas duas vezes com tampão fosfato, com pH 7,0 para remover resíduos do meio de cultura.

3.5. Inoculação de bactérias endofíticas com potencial para promoção de crescimento vegetal em plântulas de café (*Coffea arabica* L.)

Para avaliar a eficiência das bactérias em promover o crescimento de café (*Coffea arabica* L.) *in vivo*, foi realizado um experimento no Laboratório de Biotecnologia da Fundação Procafé em Varginha - MG entre fevereiro e outubro de 2018 (Figura 16).

Figura 16 - Casa de vegetação da Fundação Procafé em Varginha - MG.



Fonte: Arquivo pessoal

As plântulas de café utilizadas neste experimento foram obtidas por embriogênese somática indireta (Figura 17a) a partir de explantes foliares de cafeeiro e transferidas para tubetes contendo substrato de fibra de côco (Amafibra) (Figura 17b). Este substrato foi previamente adubado com Raizal (N - 9%, P₂O₅ - 45%, K₂O - 11%) - 6g/L de substrato e

Osmocote (N - 14%, P₂O₅ - 14%, K₂O -14%) - 6g/L de substrato, que é um fertilizante de lenta liberação (Figura 17) (CHONE et al., 2018; LOYOLA-VARGAS et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2004; VAN BOXTEL; BERTHOULY, 1996)..

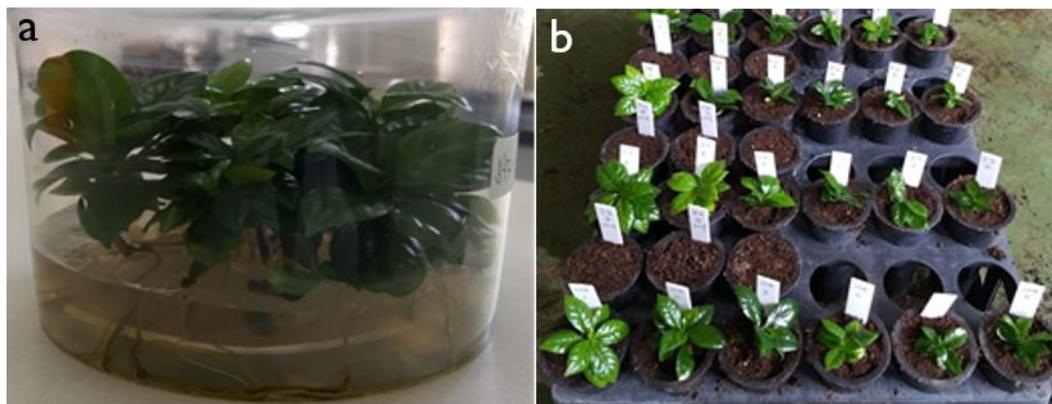
Alíquotas de 6 mL a partir das suspensões bacterianas (10⁹ UFC.mL⁻¹) foram inoculadas no substrato conforme cada tratamento. No total, nove plantas foram inoculadas para cada tratamento.

O controle consistiu em um conjunto de nove plantas que não foram inoculadas. Os tubetes foram dispostos ao acaso e mantidos em uma casa de vegetação a 26 ±2 °C e 80% de umidade relativa do ar e foram regadas diariamente.

As inoculações foram feitas quinzenalmente e totalizaram 12 procedimentos ao longo de 180 dias. Ao final desse período, as plantas foram retiradas dos tubetes.

Todo o substrato aderido às raízes foi removido utilizando água corrente e em seguida o sistema radicular foi separado da parte aérea.

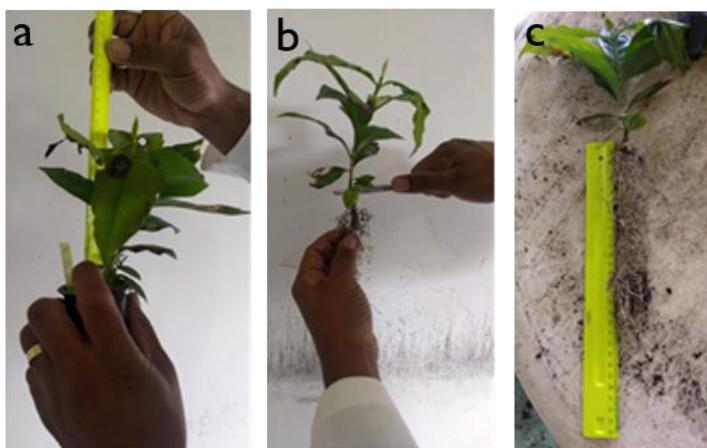
Figura 17 – a) Plântulas de café obtidas por embriogênese somática indireta de explantes foliares de cafeeiro; b) Plântulas de café em tubetes contendo substrato de fibra de côco adubado para serem inoculadas com as suspensões bacterianas.



Fonte: Arquivo pessoal

As medidas relativas ao crescimento das plantas como altura da parte aérea (APA), comprimento do sistema radicular (CSR) e diâmetro do caule (DC) foram obtidas utilizando paquímetro e régua milimetrada (Figura 18 a, b, c)(ANDRADE, 2017).

Figura 18 - Aferição das medidas das plantas após 180 dias: Altura da parte aérea (APA)(a); Diâmetro do caule (DC)(b); Comprimento do sistema radicular (CSR)(c).



Fonte: Arquivo pessoal

O sistema radicular e a parte aérea de cada planta foram colocados em sacos de papel para posterior secagem em estufa, com ventilação forçada, a 60°C, e pesadas periodicamente até atingirem peso constante.

Finalmente, foram obtidos o peso seco da parte aérea (PSPA) e o peso seco do sistema radicular (PSSR), com o auxílio de uma balança analítica.

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação das médias utilizando o software GraphPad Prism versão 7 (BATISTA, 2012).

A Análise de Componentes Principais também foi gerada pelo software SAS versão 9.1. Os resultados dos componentes 1 e 2 foram multiplicados pelos valores médios de cada característica para cada indivíduo e os valores resultantes foram usados para construção do gráfico biplot, utilizando o software Microsoft Excel (HONGYU et al., 2015).

Amostra representativa de folhas de cada foram separadas para determinação de seus respectivos teores de nutrientes. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Análise de Solos e Material Vegetal de Varginha, da Fundação PocaFé, onde foram determinados os valores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês, boro e zinco.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Kruskal – Wallis ($p \leq 0,05$) para comparação de médias utilizando o software GraphPad Prism versão 7 (BATISTA, 2012).

3.6. Resultados e Discussão

Após 180 dias de condução do experimento em casa de vegetação, as plantas de café foram coletadas para avaliação do efeito no seu crescimento quando inoculadas com as suspensões bacterianas das linhagens selecionadas no presente trabalho. Foram avaliadas as variáveis: altura da parte aérea (APA), comprimento do sistema radicular (CSR), diâmetro do caule (DC), peso seco da parte aérea (PSPA) e o peso seco do sistema radicular (PSSR).

Nas avaliações realizadas após 180 dias da primeira inoculação, observou-se que para a variável altura da parte aérea (APA), o tratamento T3 (CRA 241 – *Enterobacter tabaci*) não diferiu significativamente do controle a 5,00 % de significância, entretanto, os demais tratamentos diferiram significativamente do controle apresentando um decréscimo significativo da altura da parte aérea de 36,01 %, em média (Figura 19). Observou-se ainda que para a variável diâmetro do caule (DC), nenhum dos tratamentos diferiu significativamente do controle a 5,00 % de significância (Figura 20).

O menor decréscimo observado na variável (APA) foi no tratamento com CRM 202 – *Kosakonia cowanii* (T2) em que a média do decréscimo foi de 35,84 % quando comparado ao controle, enquanto o maior decréscimo (49,49 %) foi observado no tratamento com CRM 162 - *Erwinia bilingiae* (T1).

Figura 19 - Médias das alturas das partes aéreas (APA), em milímetros (mm), de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.

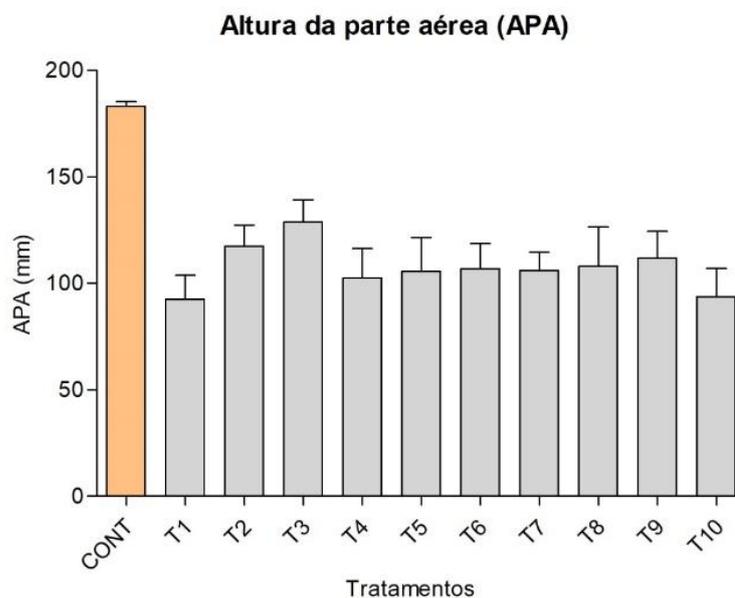
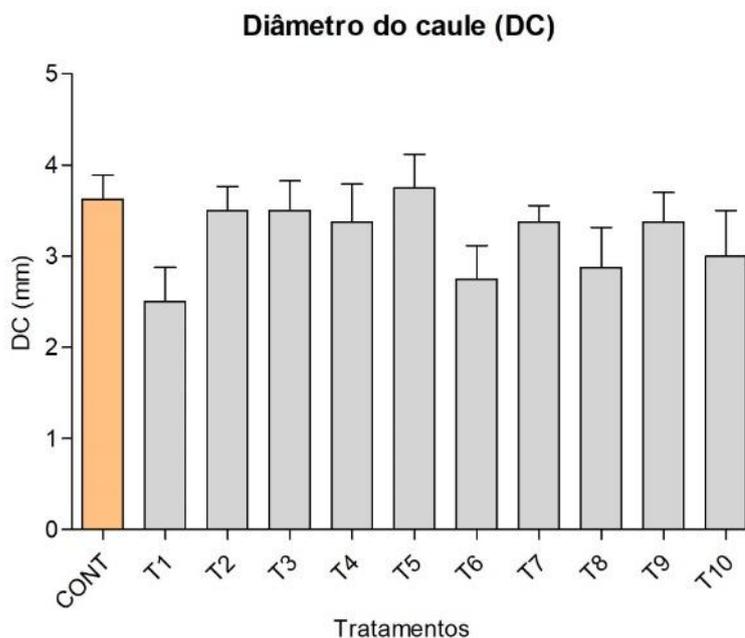


Figura 20 - Médias dos diâmetros dos caules (DC) em milímetros (mm) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.



Para a variável comprimento do sistema radicular (CSR), todos os tratamentos diferiram significativamente do controle a 5,00 % de significância, apresentando um aumento do comprimento do sistema radicular de 77,76 %, em média (Figura 21).

O maior incremento observado na variável (CSR) foi no tratamento com CRA 241 – *Enterobacter tabaci* (T3) (Figura 21) em que a média do incremento foi de 91,87% quando comparado ao controle, enquanto o menor incremento (67,50%) foi observado no tratamento com ORM 326 - *Klebsiella michiganensis* (T10) (Figura 21).

Observa-se um padrão de redução da altura do sistema aéreo e aumento do sistema radicular nas plantas de café inoculadas pelas bactérias endofíticas. Tal padrão sugere um *trade-off* no alocamento energético induzido pela interação bactéria-planta, de modo que o recurso foi direcionado à parte radicular em detrimento da parte aérea da planta (STEARNS, 1989).

Um *trade-off* refere-se a uma correlação negativa entre os efeitos do fitness de dois atributos em um organismo, que podem ser fisiológicos, morfológicos, comportamentais ou ecológicos de tal forma que ambos não podem ser otimizados ao mesmo tempo (TILMAN, 1990; ZHANG et al., 2017). Este conceito parece remontar à antiga lei da “Compensação do Crescimento”, proposta por Saint-Hilaire & Goethe e a idéia de que “a fim de poder despende de um lado, a natureza é forçada a economizar por outro” citada no livro “Origem

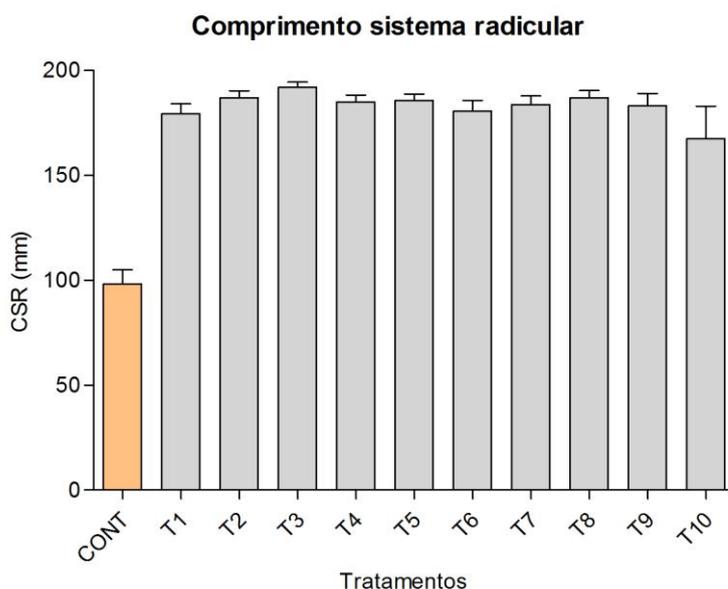
das espécies” (DARWIN, 2003).

Normalmente um organismo não pode ser simultaneamente bem adaptado a todas as condições ambientais, ou seja, há fatores ambientais que restringem o seu *fitness*. Dessa forma existem *trade-offs* entre as estratégias adaptativas que resulta em atributos adaptativos para diferentes condições que são inversamente correlacionados (TILMAN, 1990).

É essencial o entendimento desses atributos adaptativos que determinam a natureza dos *trade-offs*, já que podem levar a um entendimento mais profundo sobre a estrutura das comunidades bem como as relações ecológicas entre plantas e bactérias. (CERDA et al., 2017; KARASOV et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Embora existam muitos fatores de restrição ambiental e muitos *trade-offs*, particularmente para plantas alguns dos *trade-offs* mais importantes são: o acesso ao solo para colonização; a disponibilidade limitada de recursos no solo; a luz; a presença de herbívoros, fitopatógenos, competidores e outras fontes de perda e mortalidade. Assim, cada uma dessas restrições citadas, pode ser superada pelo alocamento energético em estruturas particulares ou funções fisiológicas, mas todos esses padrões necessariamente reduzem a alocação proporcional de outras estruturas ou funções, causando *trade-offs* (KARASOV et al., 2017; TILMAN, 1990; WEIH, 2003).

Figura 21 - Médias dos comprimentos dos sistemas radiculares (CSR) em milímetros (mm) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.



Ao analisar as variáveis peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco do sistema radicular (PSSR), foi possível observar que nenhum dos tratamentos diferiram

significativamente do controle não havendo incremento ou decréscimo significativo destas variáveis a 5,00% de significância (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Médias do peso seco da parte aérea (PSPA) em gramas (g) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.

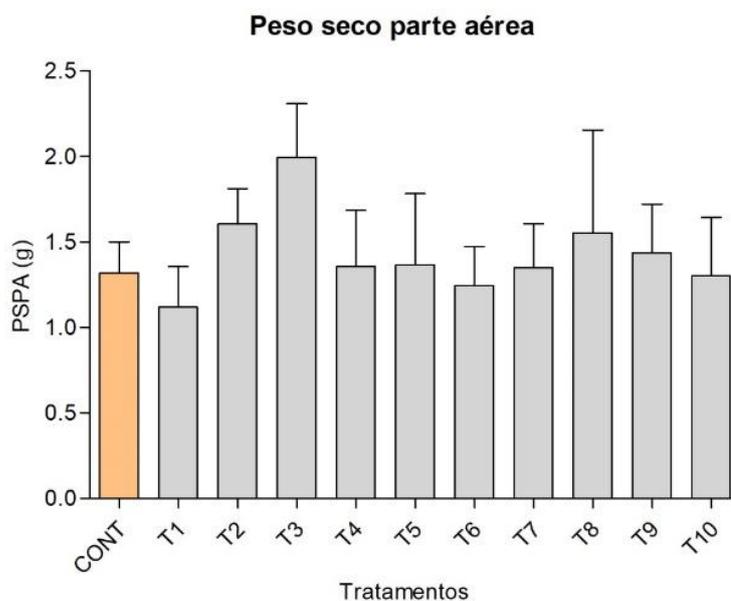
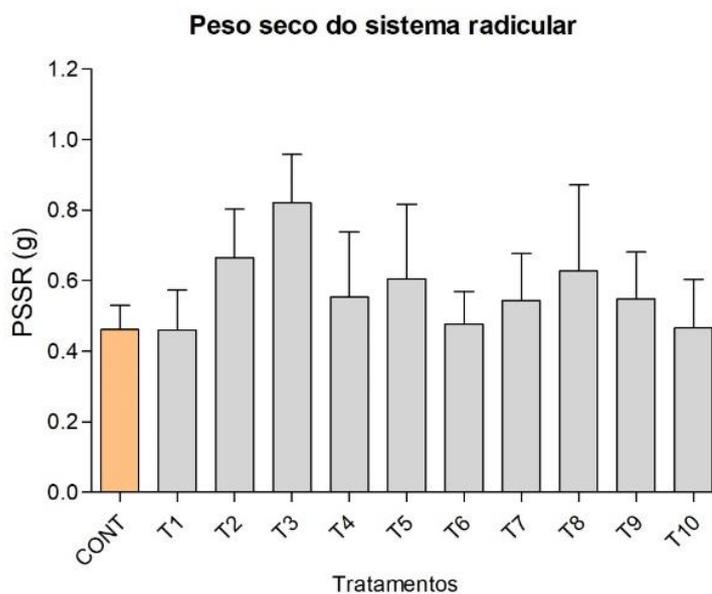


Figura 23 - Médias do peso seco do sistema radicular em gramas (g) de 8 plantas por tratamento (T1 a T10), aferidas aos 180 dias após a primeira inoculação de bactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.



É válido destacar que, para ambas as variáveis, o tratamento com CRA 241 – *Enterobacter tabaci* (T3) apresentou as maiores médias, representando um incremento de 51,18% e 78,05% e no peso seco da parte aérea (PSPA) e do peso seco do sistema radicular (PSSR), respectivamente. O tratamento (T1) com CRM 162 – *Erwinia bilingiae* foi o que menos contribuiu para o incremento dessas variáveis e apresentou médias que representaram um decréscimo de 15,26% e 0,27% no peso seco da parte aérea (PSPA) e do peso seco do sistema radicular (PSSR), respectivamente.

Na análise de componentes principais, conforme demonstrado na Tabela 7, é possível observar que os resultados dos autovalores referentes à caracterização morfológica das amostras revelaram que os dois primeiros componentes principais explicaram 99% da variação total das características morfológicas observadas.

Tabela 7. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão indicados.

Componentes	Autovalores	Diferença	Proporção	Proporção
				Acumulada
1	771.459.062	690.703.939	0.9048	0.9048
2	80.755.123	80.333.470	0.0947	0.9995
3	421.653	421.380	0.0005	10.000
4	0.0274	0.0274	0	10.000
5	0		0	10.000

Na Tabela 8 é possível observar os descritores que mais explicaram a variação observada segundo o componente principal. Os dados foram elevados ao quadrado para que os valores negativos se tornassem positivos.

Tabela 8. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais das plântulas de cafeeiros inoculadas.

Descritor	Componente1	Componente1 ²	Componente2	Componente2 ²
CSR	0,98773	0,97560	0,15468	0,02393
APA	-0,00004	0,00000	-0,00348	0,00001
DC	0,13352	0,01783	-0,81720	0,66782
PSSR	-0,03815	0,00146	0,37181	0,13824
PSPA	-0,07150	0,00511	0,41232	0,17000

Observando o valor de Componente1² que indica a importância de cada descritor para componente1, constatou que o descritor CSR (Comprimento do Sistema Radicular) foi responsável por 97,00% da variação observada.

Observando o valor de Componente2², constatou que o descritor DC (Diâmetro do caule), foi responsável por 66,00% da variação observada, seguido pelos descritores PSPA (Peso Seco da Parte Aérea) e PSSR (Peso Seco do Sistema Radicular), respectivamente com 17,00% e 13,00%.

Após a definição do melhor descritor (Comprimento do Sistema Radicular), os indivíduos foram analisados no teste de média de Tukey ($p \leq 0,05$). A análise de variância indicou diferenças significativas entre os indivíduos e que não houve diferenças entre as repetições; ou seja, as plantas apresentaram (CSR) entre 93,75 mm e 191,87 mm.

Dessa forma, dois grupos foram observados. O grupo “b” englobou o controle e o grupo “a” as plantas que foram tratadas com bactérias. O coeficiente de variação foi de 11,25.

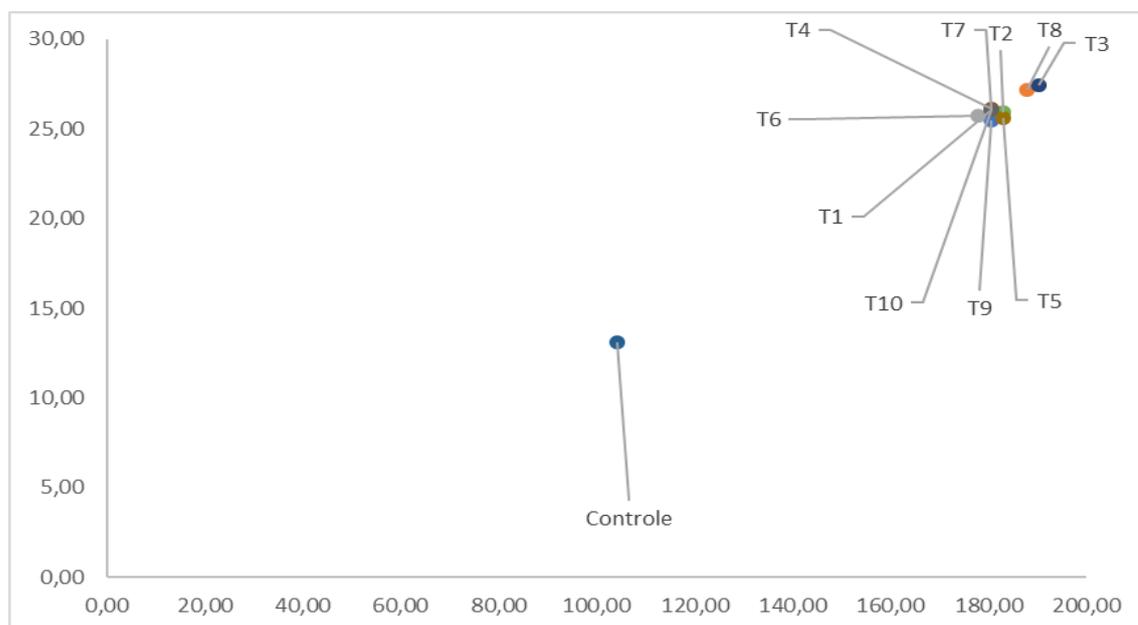
A partir dos componentes principais 1 e 2 multiplicados pelos valores médios de cada característica para cada indivíduo, foi possível construir o gráfico biplot (Figura 24). O controle se distribuiu na parte central do gráfico. As plantas tratadas com bactérias se distribuíram na parte superior direita do gráfico.

As linhagens de bactérias que foram testadas pertencem ao filo *Proteobacteria*. Este filo engloba importantes famílias bacterianas como é o caso da *Enterobacteriaceae*, da qual os gêneros *Erwinia*, *Kosakonia*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Klebsiella* fazem parte. Os tratamentos (T3 e T8) apresentaram melhores resultados e consistiam nas inoculações feitas com as bactérias CRA 241 – *Enterobacter tabaci* e OFR 164 – *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente.

As bactérias desses gêneros têm sido isoladas da rizosfera e também de raízes e partes aéreas de diversas plantas e tem sido relatados como importantes promotores de crescimento vegetal (AHEMAD; KIBRET, 2014; MOREIRA et al., 2010).

A capacidade de promover o crescimento vegetal está associada, principalmente, a habilidade dessas bactérias em solubilizar fosfato, realizar a fixação biológica do nitrogênio, produzir ácido indol acético, serem antagonistas a fungos fitopatogênicos (ARAÚJO et al., 2014; GUPTA et al., 2015; SANTOYO et al., 2016; SEBASTIANES; AZEVEDO; LACAVA, 2017).

Figura 24 - Gráfico biplot resultante da segunda estação de cruzamento, obtido por meio da análise de componentes principais considerando os 5 descritores para os Componentes 1 e 2.



O gênero *Enterobacter* foi proposto pela primeira vez por Hormaeche e Edwards em 1960 e a abrange nove espécies e duas subespécies. Os membros desse gênero são Gram-negativos, apresentam motilidade e são positivas para o teste de Voges-Proskauer. São amplamente distribuídas na natureza e foram isolados de várias fontes, incluindo humanos, animais, amostras clínicas, plantas e ambientes naturais (DUAN et al., 2015).

Madhaiyan et al. (2013) isolaram bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio de tecidos vegetais de três acessos de germoplasma de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) com base em sua capacidade de crescer em meio isento de nitrogênio. Uma das linhagens de *Enterobacter* sp. que, ao ser inoculadas em plântulas de pinhão-mansão promoveu significativamente o crescimento de biomassa e produção de sementes (MADHAIYAN et al., 2013).

Em outro estudo, a atividade inibitória de 276 bactérias endofíticas, isoladas dos nódulos radiculares de soja (*Glycine max* L.), contra o fungo patogênico *Phytophthora sojae* foi avaliada. Seis linhagens com mais de 63% de atividade inibitória foram posteriormente identificadas como pertencentes a cinco gêneros, dentre eles o *Enterobacter* (ZHAO; XU; LAI, 2018).

Um total de seis bactérias endofíticas de raízes de milho também foram identificadas como *Enterobacter* sp, por sequenciamento do gene 16S rRNA. Quatro linhagens de *Enterobacter* foram positivas quanto à capacidade de fixação de nitrogênio. De fato, uma

linhagem de *Enterobacter* sp. aumentou o volume radicular em 44% e a germinação das sementes em 47%. Isso indica que esse gênero é um bom candidato para testes futuros como inoculantes biológicos para o milho, uma vez que o resultado apresentado corrobora com os obtidos neste estudo (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014).

Bactérias entéricas, particularmente do gênero *Klebsiella*, apesar de serem descritas como patogênicas aos seres humanos, são comumente isoladas como endofíticas. A colonização endofítica por essas bactérias é importante pois elas podem ser benéficas, seja fornecendo para a planta hospedeira o nitrogênio por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) ou pela síntese de hormônios de crescimento (CORREA-GALEOTE; BEDMAR; ARONE, 2018; DONG; INIGUEZ; TRIPLETT, 2003; EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2013; VILELA et al., 2010)

Espécies endofíticas de *Klebsiella* já foram isoladas de *Coffea arabica* L. originárias da Colômbia, como *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella trevisanii* (VEGA et al., 2005). Santos (2008) também isolou *Klebsiella oxytoca* de *Coffea arabica* (SANTOS, 2008).

A *Klebsiella pneumoniae* também foi encontrada como endofítica (CHELIUS; TRIPLETT, 2000) e, quando inoculada na rizosfera de *Arabidopsis*, alfafa e no trigo, apresentou altos níveis de colonização e capacidade de promover o crescimento (DONG; INIGUEZ; TRIPLETT, 2003). Bactérias pertencentes a esse gênero também foram isoladas de raízes de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) (BRÍGIDO et al., 2019).

Cerigioli (2005) em um estudo da diversidade de bactérias endofíticas da cultura do milho (*Zea mays* L.) e seleção de linhagens para a promoção de crescimento vegetal observou que *Klebsiella pneumoniae* foi capaz de promover aumento de peso de raiz e da parte aérea de plantas de milho.

Em outro estudo cujo objetivo foi isolar e caracterizar bactérias potencialmente diazotróficas associadas ao sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e avaliar estes isolados quanto à eficiência na promoção do crescimento vegetal, foi possível observar bactérias do gênero *Klebsiella* que foram capazes de induzir o acúmulo de nitrogênio na parte aérea em níveis semelhantes ao tratamento nitrogenado (SILVA et al., 2017).

Na Tabela 9 são apresentados os resultados médios dos conteúdos de diferentes nutrientes presentes na parte aérea das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Por meio da comparação entre elas pelo teste de Kruskal – Wallis ($p \leq 0,05$), observa-se que a deposição dos macro e micronutrientes analisados na parte aérea das plantas de café não foram influenciadas pelos tratamentos

adotados (Figuras 25 e 26).

Figura 25 - Perfil do teor (%) de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) em (dg.Kg^{-1}) presentes nas folhas das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis ($p \leq 0,05$) e não houve diferença significativa entre as médias.

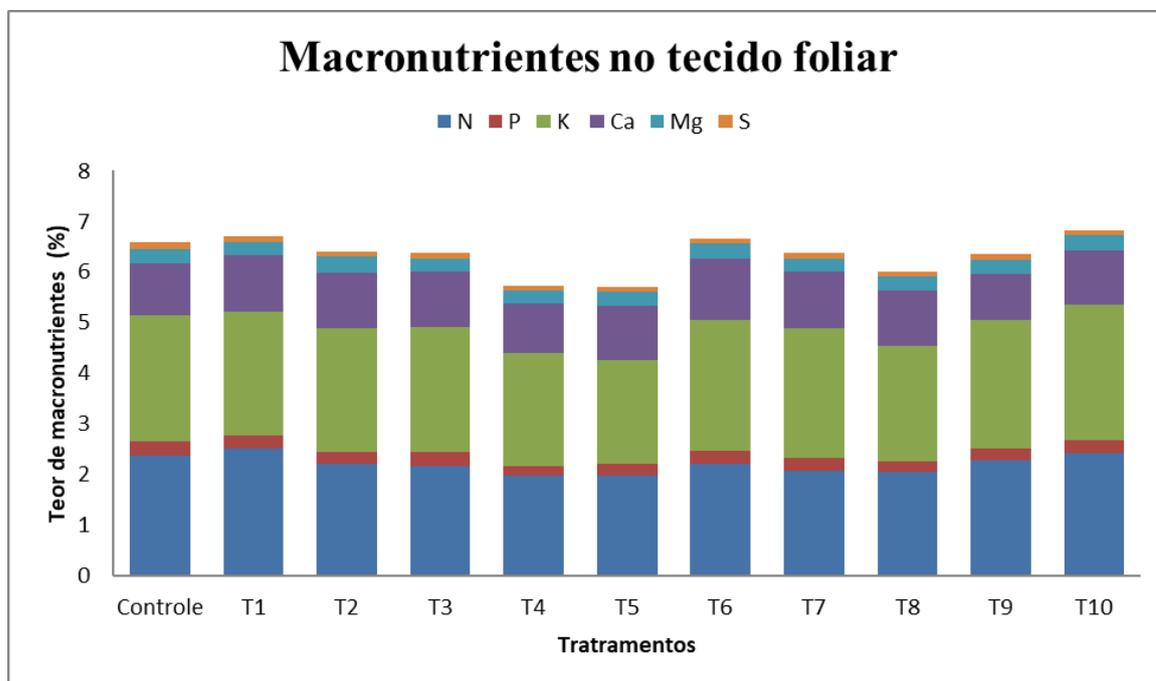
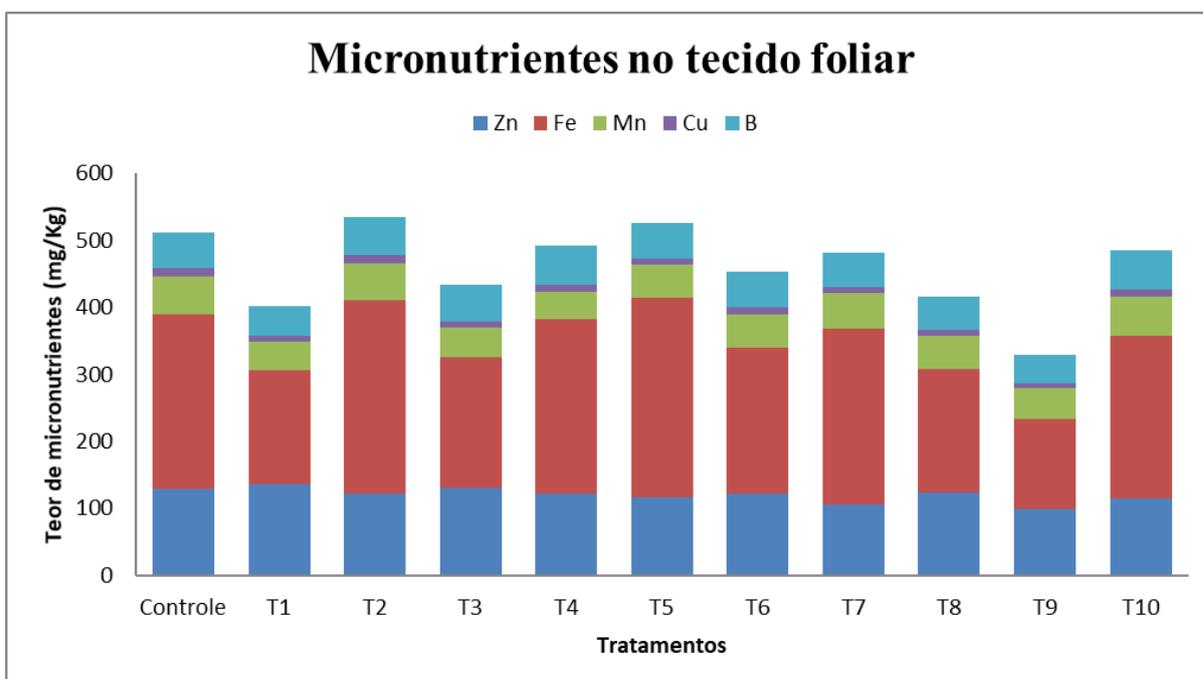


Figura 26 - Perfil do teor (em mg.Kg^{-1}) de micronutrientes (Zn, Fe, Mn, Cu, B) presentes nas folhas das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis ($p \leq 0,05$) e não houve diferença significativa entre as médias.



Observando os resultados da análise dos nutrientes das plantas, podemos inferir também que os mecanismos de solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio observados no momento da seleção das linhagens mais promissoras, podem não ter tido influência no crescimento da planta já que não há uma correlação de incremento de nutrientes como o N e P nos tratamentos que tiveram os melhores resultados em casa de vegetação.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Batista et al. (BATISTA et al., 2018) em que dois gêneros de rizobactérias (*Burkholderia* sp. e *Bacillus* sp.) associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) foram testadas separadamente e em consórcio para promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) e soja *Glycine max* L. Nesse estudo, os 2 gêneros de bactérias que foram inoculados promoveram crescimento nas plantas de milho; porém não diferenciaram significativamente a ou aumento ou a diminuição dos macro e micronutrientes nas folhas.

É difícil indicar os mecanismos necessários à maior habilidade da bactéria em promover o crescimento da planta (THAKURIA et al., 2004). Estes mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias não são completamente compreendidos e ainda precisam ser mais estudados, uma vez que diversos fatores, ainda não conhecidos, estão envolvidos (BATISTA et al., 2018; BRADER et al., 2014; SAHARAN; NEHRA, 2011).

Exemplo disso é o uso de bactérias endofíticas e rizosféricas promotoras de crescimento vegetal na indução de resistência sistêmica contra diferentes fitopatógenos de plantas e que vem demonstrando bons resultados em determinadas condições de campo (MÉLO-FILHO; GUENTHER, 2015; SILVA, 2018; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007).

Além disso, outros mecanismos que foram avaliados no presente trabalho como produção de outros hormônios reguladores vegetais, de enzimas, e outros mecanismos que auxiliam no controle biológico de fitopatógenos podem contribuir e auxiliar na indução da resistência sistêmica a fitopatógenos (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018; SILVA et al., 2018a; ZOHARA et al., 2016).

Tabela 9. Valores médios dos conteúdos dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), em dg.Kg^{-1} , e micronutrientes (Zn, Fe, Mn, Cu, B), em mg.Kg^{-1} , presentes nas folhas das plantas de café cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis ($p \leq 0,05$) e não houve diferença significativa entre as médias.

Tratamentos	Nutrientes										
	g.Kg ⁻¹						mg.Kg ⁻¹				
	N	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Fe	Mn	Cu	B
<i>Controle</i>	2,37	0,28	2,50	1,03	0,28	0,13	128,00	261,00	57,00	12,00	54,10
<i>T1</i>	2,52	0,24	2,45	1,13	0,26	0,11	136,00	170,00	42,00	9,00	44,90
<i>T2</i>	2,20	0,25	2,43	1,11	0,31	0,11	121,00	290,00	54,00	13,00	56,60
<i>T3</i>	2,17	0,27	2,48	1,08	0,27	0,10	130,00	196,00	43,00	10,00	54,10
<i>T4</i>	1,97	0,20	2,23	0,98	0,25	0,09	122,00	260,00	40,00	12,00	57,50
<i>T5</i>	1,98	0,22	2,05	1,07	0,30	0,09	116,00	298,00	50,00	8,00	53,70
<i>T6</i>	2,22	0,24	2,60	1,20	0,31	0,10	122,00	218,00	49,00	10,00	53,30
<i>T7</i>	2,07	0,25	2,56	1,13	0,26	0,10	106,00	262,00	53,00	9,00	52,00
<i>T8</i>	2,04	0,22	2,29	1,08	0,28	0,10	124,00	183,00	50,00	10,00	48,70
<i>T9</i>	2,28	0,23	2,55	0,91	0,28	0,11	98,00	135,00	47,00	7,00	41,50
<i>T10</i>	2,41	0,27	2,68	1,07	0,29	0,11	115,00	243,00	58,00	10,00	59,20

CAPÍTULO 4

**DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA ASSOCIADA A *Coffea arabica* L.
DE CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO POR ANÁLISE METAGENÔMICA**

RESUMO

A *Coffea arabica* L. é uma planta perene cultivada em muitos países tropicais. O Brasil possui uma variedade de condições climáticas que permite a produção de muitos tipos de café. O solo é um ambiente complexo e desafiador para os microbiologistas e contém a maior diversidade microbiana do planeta. A análise metagenômica utilizando sequenciamento de nova geração permite a identificação e comparação de genomas microbianos em diferentes amostras ambientais e fornece grande quantidade de informações sobre os perfis genéticos e metabólicos das comunidades microbianas. Neste capítulo, hipotetizamos que a comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Coffea arabica* L. foi modificada em resposta ao manejo convencional ou orgânico desta cultura. Assim, caracterizamos e comparamos a diversidade da comunidade bacteriana rizosférica associada a *Coffea arabica* L. em duas áreas agrícolas no estado de São Paulo, mostrando a abundância relativa dos principais grupos bacterianos presentes na rizosfera desta cultura agrícola. No amplo nível taxonômico, identificamos sequências de 1 filo, 6 ordens e 27 famílias entre todas as amostras. A família *Planctomycetaceae* foi a família mais prevalente (4,00 %) nas duas áreas analisadas, sendo as famílias *Solibacteraceae* (4,00 %) e *Xanthobacteraceae* (3,00 %) a segunda e a terceira mais prevalentes no cultivo convencional. Na área de cultivo orgânico aparecem como segundo e terceiro grupo mais prevalente o filo *Acidobacteria* (4,00 %) e a família *Nitrosomonadaceae* (3,00 %). Os grupos que apresentaram menor prevalência na área de cultivo convencional e orgânica foram as ordens *Xanthomonadales* (0,3%) e *Sphingomonadales* (0,1%), respectivamente. Os grupos bacterianos *Solibacteraceae* (Subgrupo 3), *Xanthomonadaceae*, *Solirubrobacterales*, *Saccharibacteria*, *Gaielliales*, *Pseudonocardiaceae*, *Acetobacteraceae*, *Tepidisphaeraceae*, *Thermomicrobia*, *Sphingmonadales*, *Acidobactérias* III, *Rhodospirillaceae*, *Desulfurellaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhizobiales*, *Acidobacteriaceae* (Subgrupo 1), *Acidobacteria* I, *Xanthomonadales* I, *Nitrosomonadaceae*, *Haliangiaceae* e *Acidimicrobiaceae* apresentaram abundância relativa com diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras de rizosfera de café convencional e orgânico, o que indica a influência do manejo na diversidade bacteriana do solo rizosférico.

Palavras-chave: Solo rizosférico de café, diversidade bacteriana, metagenômica, café orgânico.

ABSTRACT

Coffea arabica L. is a perennial plant grown in many tropical countries. Brazil has a variety of climatic conditions that allow the production of many types of coffee. Soil is a complex and challenging environment for microbiologists and contains the greatest microbial diversity on the planet. Metagenomic analysis using new generation sequencing allows the identification and comparison of microbial genomes in different environmental samples and provides a large amount of information on the genetic and metabolic profiles of microbial communities. In this chapter, we hypothesized that the bacterial community associated with the *Coffea arabica* L. rhizosphere was modified in response to the conventional or organic management of this crop. Thus, we characterize and compare a diversity of the rhizospheric bacterial community associated with *Coffea arabica* L. in two agricultural areas in the State of São Paulo, showing the relative abundance of the main bacterial groups present in the rhizosphere of this culture. At the broad taxonomic level, we identified sequences of 1 phylum, 6 orders, and 27 families among all samples. The family *Planctomycetaceae* was the most prevalent family (4.00%) in the two areas analyzed, with the families *Solibacteraceae* (4.00%) and *Xanthobacteraceae* (3.00%) being the second and third most prevalent in conventional cultivation. In the area of organic cultivation appear as second and third most prevalent group *Acidobacteria* filo (4.00%) and family *Nitrosomonadaceae* (3.00%). The groups with the lowest prevalence in conventional and organic cultivation were the *Xanthomonadales* (0.3%) and *Sphingomonadales* (0.1%), respectively. The bacterial groups (*Solibacteraceae*, *Xanthomonadaceae*, *Solirubrobacterales*, *Saccharibacteria*, *Gaielliales*, *Pseudonocardiaceae*, *Acetobacteraceae*, *Tepidisphaeraceae*, *Thermomicrobia*, *Sphingmonadales*, *Acidobacteria* III, *Rhodospirillaceae*, *Desulfurellaceae*, *Comamonadaceae*, *Rhizobiales*, *Acidobacteriaceae* (Subgroup 1), *Acidobacteria* I, *Xanthomonadales* I, *Nitrosomonadaceae*, *Haliangiaceae* and *Acidimicrobiaceae*) showed a relative abundance with significant difference ($p \leq 0.05$) between the rhizosphere samples of conventional and organic coffee, indicating the influence of the management on the bacterial diversity of the rhizospheric soil.

Key words: Coffee rhizospheric soil, bacterial diversity, metagenomics, organic coffee.

4.1. Introdução

A caracterização das comunidades microbianas contribui para o entendimento de processos ecológicos que direcionam interações microrganismo e seus hospedeiros, bem como a biorremediação e a biogeoquímica (NIELSEN et al., 2014).

Os micro-organismos dominam a biosfera, e constituem componentes essenciais à vida. Tais organismos, além de catalisarem transformações indispensáveis nos ciclos biogeoquímicos terrestres e aquáticos, produzem importantes componentes da atmosfera e representam uma enorme porção da diversidade genética da vida (MENECHINE, 2016).

Com o avanço da Microbiologia, Genética e Biologia Molecular, novas técnicas de análise foram surgindo, como a metagenômica, e assim, os estudos em ecologia microbiana avançaram consideravelmente, tanto na compreensão da biodiversidade e como no conhecimento dos processos microbianos dos ambientes (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012). Dessa forma, a metagenômica foi desenvolvida com o intuito de auxiliar os métodos de Microbiologia clássica a entender melhor a diversidade de micro-organismos nos diversos ambientes, uma vez que há evidências de que a grande maioria dos micro-organismos presentes no planeta Terra não são cultiváveis (HANDELSMAN, 2004; MEYER et al., 2019). Essa técnica oferece um caminho para acessar de forma mais completa a diversidade de micro-organismos presentes do ambiente em análise, permitindo executar estudos de genômica funcional dos membros de sua microbiota, sem a necessidade do cultivo de micro-organismos (CAROLINI et al., 2013; MARDIS, 2008).

Com as abordagens genômicas, houve uma mudança sobre a perspectiva microbiana envolvendo estrutura, função e ecologia, e isto tem se revelado extremamente importante. Por meio das tecnologias de sequenciamento de nova geração como Illumina, Ion Proton, Ion Torrent, Nanopore, por exemplo. Aliadas com ferramentas de bioinformática e estatística para análise das sequências de DNA é possível obter caracterizações de populações microbianas diretamente de qualquer amostra ambiental, como por exemplo, solo e rizosfera associados a culturas de interesse econômico sob diferentes cultivos e manejos (MENDES et al., 2015; MENECHINE, 2016; NIELSEN et al., 2014).

A rizosfera é definida como a região do solo que recebe a influência direta das raízes, o que possibilita a proliferação microbiana. Essa região no entorno das raízes funciona como um habitat dinâmico que apresenta comunidades microbianas complexas, que desempenham muitas funções importantes, tanto em sistemas naturais como em sistemas agrícolas, participando das transformações da matéria orgânica, dos ciclos biogeoquímicos, bem como

da promoção de crescimento vegetal (MONTEIRO, 2016).

A identificação de micro-organismos presentes na rizosfera das diferentes culturas agrícolas permite realizar pesquisas que avaliam a biodiversidade genética bacteriana desses ambientes. Assim, a utilização de medidas de diversidade ou o cálculo de um indicativo de diversidade envolve uma informação refinada contida em dados de análise de comunidade e é representada por um valor numérico que reflete o número e abundância relativa de grupos taxonômicos em uma única comunidade microbiana (BENT; FORNEY, 2008; MENDES et al., 2015; PASSOS, 2014).

A preocupação com os efeitos das monoculturas, notadamente o café, nos ecossistemas é uma constante, como tem sido observado em muitos debates e estudos. Cunha (1995) concluiu que a gestão convencional da cultura do café em Viçosa, estado de Minas Gerais trouxe consequências, tais como: compactação do solo, perda de nutrientes através de erosão, que, impactou negativamente a produção. Por outro lado, o sistema de produção de café orgânico tem emergido como uma alternativa tecnologicamente e economicamente rentável, destinado a eliminar os impactos ambientais causados pelo uso inadequado dos recursos naturais e a adoção de tecnologias que afetam o meio ambiente de forma negativa (CUNHA, 1995).

A produção de café legitimamente orgânica é um sistema alternativo baseado em três princípios básicos da agricultura orgânica: a não utilização de agroquímicos, a busca pelo equilíbrio solo/planta por meio do manejo racional do solo e a valorização social do trabalhador rural (NOGUEIRA et al., 2016). O conceito de "orgânico" é baseado no manejo de sistemas agrícolas similares à vida de um organismo, respeitando o potencial produtivo da propriedade agrícola. Nestes sistemas ou "organismos agrícolas", a produção vegetal e animal, a exploração dos recursos naturais e especialmente o homem, evolui de uma forma totalmente integrada (THEODORO, 2007). Nesse sentido, a caracterização da microbiota bacteriana rizosférica relacionada ao café é de extrema importância e ainda é desconhecida, possuindo um enorme potencial agrícola e tecnológico.

O presente capítulo consistiu na investigação da comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Coffea arabica* L. em resposta ao manejo convencional ou orgânico desta cultura. Nossos resultados mostraram que, como o microbioma é altamente similar entre as condições estudadas, existem bactérias específicas envolvidas em cada tipo de manejo, levando a um melhor entendimento dos padrões das comunidades bacterianas e identificando potenciais marcadores biológicos para futuras manipulações microbianas do solo.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo geral

Avaliar e comparar a diversidade da comunidade bacteriana rizosférica de *Coffea arabica* L. proveniente das áreas central e nordeste do estado de São Paulo por meio da análise metagenômica do gene 16S rDNA a fim de estabelecer uma relação entre a ocorrência de diferentes grupos de bactérias e o tipo de manejo empregado.

4.2.2. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral deste capítulo, os objetivos específicos foram:

- a) Sequenciar o gene 16S rDNA da microbiota do solo rizosférico de *Coffea arabica* L. de duas áreas de cultivo: convencional e orgânico.
- b) Caracterizar a diversidade taxonômica a partir da microbiota do solo rizosférico de *C. arabica* L.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Coleta das Amostras

Amostras de solo rizosférico de café foram coletadas em maio de 2017. As amostras provenientes do cultivo convencional foram obtidas na Fazenda Monte Alto em Dourado, Estado de São Paulo; latitude 22°42'30"S, longitude 47°30'00"W e altitude de 546 m.

O local possui solo de textura arenosa em todo o perfil. Apresentam 85% ou mais de soma de fração de areia fina e areia grossa ao longo de pelo menos dois metros a partir da superfície (EMBRAPA, 1999). O clima é do tipo temperado úmido com inverno seco e verão quente (Cwa), segundo a classificação de Köppen e Geiger, precipitação média anual de 1.328 mm e temperatura média anual de 20° C (CEPAGRI, 2019).

As amostras provenientes do cultivo orgânico, foram obtidas no Sítio Nova Aliança em Ribeirão Corrente, Estado de São Paulo; latitude 20°27'25"S, longitude 47°35'24" e

altitude de 855 m. O solo é classificado como Nitossolo de cores vermelhas e vermelho-escuras (EMBRAPA, 1999). Textura argilosa e muito argilosa; estrutura em blocos fortemente desenvolvidos, derivados de rochas básicas e ultrabásicas, com diferenciação de horizontes pouco notável. O clima é do tipo temperado úmido e verão temperado (Cwa), segundo a classificação de Köppen e Geiger, precipitação média anual de 1.544 mm e temperatura média anual de 20,6 °C (CEPAGRI, 2019).

Os locais de estudo foram selecionados com base em suas diferenças no manejo do plantio convencional e orgânico. Na área amostrada de cultivo convencional foi coletado solo rizosférico de 12 plantas sadias de maneira aleatória; enquanto na área de cultivo orgânico, o solo rizosférico de 18 plantas sadias foi coletado aleatoriamente.

O solo coletado estava a uma profundidade de 30 cm abaixo da superfície do solo e aderiu no máximo a 3 mm das raízes. Após a coleta de cada planta, as ferramentas utilizadas foram lavadas em água corrente e desinfetadas com álcool etílico a 70% para evitar a contaminação de um solo para outro.

As amostras foram armazenadas em sacos de plástico para o transporte para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB (UFSCar), em São Carlos - SP.

4.3.2. Extração do DNA, normalização das amostras e preparo dos *pools*

O DNA total de cada amostra foi extraído usando o PowerSoil DNA Isolation Kit (Catálogo # 12888) de acordo com o protocolo do fabricante (MoBio Laboratories, Inc.). Para o protocolo de extração, foram utilizados aproximadamente 0,25 g de solo rizosférico.

A integridade do DNA extraído foi avaliada por gel de eletroforese em gel de agarose (0,7% p/ v) a (3 volts.cm⁻¹) em 1 x tampão TEB e corado com GelRed™, utilizando marcador molecular (1 kb DNA Ladder RTU - KASVI).

O DNA genômico de cada amostra foi purificado usando o Kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com o fabricante e então a quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas usando o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Marlborough, EUA). O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20°C até o momento do ensaio.

As amostras foram diluídas a 50 ng/μL e agrupadas usando o mesmo volume para cada uma (três amostras foram usadas para formar um *pool*, resultando em quatro repetições do manejo convencional e seis repetições do manejo orgânico).

4.3.3. Amplificação do DNA

Após a confecção dos *pools*, todos os DNAs foram purificados com *beads* magnéticas para realizar as amplificações da região hipervariável do gene 16S rDNA pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As reações da PCR foram feitas em triplicata de amostras, tendo como volume final de 20 μ L, contendo 10 μ L de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3 μ M de oligonucleotideo forward e 0,3 μ M de oligonucleotideo reverse, 20 ng de DNA genômico e água ultrapura esterilizada suficiente para 20 μ L.

4.3.4. Confecção das bibliotecas metagenômicas e sequenciamento

Foram amplificadas aproximadamente 460 pb do DNA que codifica para o RNA ribossomal 16S por PCR, usando iniciadores específicos que amplificam as regiões variáveis V3 e V4 deste gene.

As sequências iniciadoras utilizadas para a amplificação desta região e suas respectivas sequências foram:

16S	Amplicon	PCR	Forward	Primer:
5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG3'				
16S	Amplicon	PCR	Reverse	Primer:
5'TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC				
3'				

Os produtos de PCR foram utilizados para construir a biblioteca metagenômica para sequenciamento utilizando o kit de Reagente MiSeq v3 (ciclo 600) (Illumina Inc.).

Cada amostra foi identificada unicamente a partir de adaptadores específicos que foram ligados a cada biblioteca.

O sequenciamento parcial do gene que codifica para o RNA ribossômico 16S foi realizado pelo método de sequenciamento de última geração usando a plataforma Illumina MiSeq que produziu milhares de leituras de 300 pb (2×300 pb) para cada biblioteca.

4.3.5. Análise dos dados de sequenciamento

As leituras de sequenciamento da porção V3-V4 do gene 16S rRNA foram analisadas, utilizando o software USEARCH v10.0.240 (EDGAR, 2010). Inicialmente, os pares de leituras complementares foram montados e em seguida filtrados por qualidade para remoção de seqüências com baixa qualidade.

As unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram identificadas com base nas seqüências de DNA das amostras. Em seguida, os índices de diversidade, dominância, equabilidade e riqueza de cada amostra (índices de Shannon, Simpson, Buzas-Gibson e Chao, respectivamente com estatística) foram calculados.

A identificação taxonômica das OTUs encontradas foi realizada a partir da comparação com a base de dados SILVA v123 LTP (<https://www.arb-silva.de/>). Foi realizado o agrupamento da composição de espécies entre as amostras (amostras $\geq 1\%$).

Para analisar a significância de nossos resultados foram feitas comparações múltiplas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações par-a-par com teste não paramétrico de Wilcoxon.

Todos os tratamentos foram comparados entre si. Adotou-se o nível de significância estatística 0,05. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando o software R (<https://www.r-project.org/>).

4.4. Resultados

4.4.1. Avaliação e análise de unidades taxonômicas operacionais (OTUs)

A análise de metagenoma foi realizada em *pools* de amostras de solo rizosférico de *Coffea arabica* L. provenientes de cultivo convencional e orgânico. Foram sequenciadas a porção 16S do DNA ribossômico das bactérias que tiveram os DNAs extraídos das duas áreas analisadas.

As amostras foram tratadas por bioinformática e classificadas de acordo com sua similaridade sendo agrupada na forma de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU - do inglês Operational Taxonomic Unit). Cada OTUs refere-se a uma bactéria específica sequenciada.

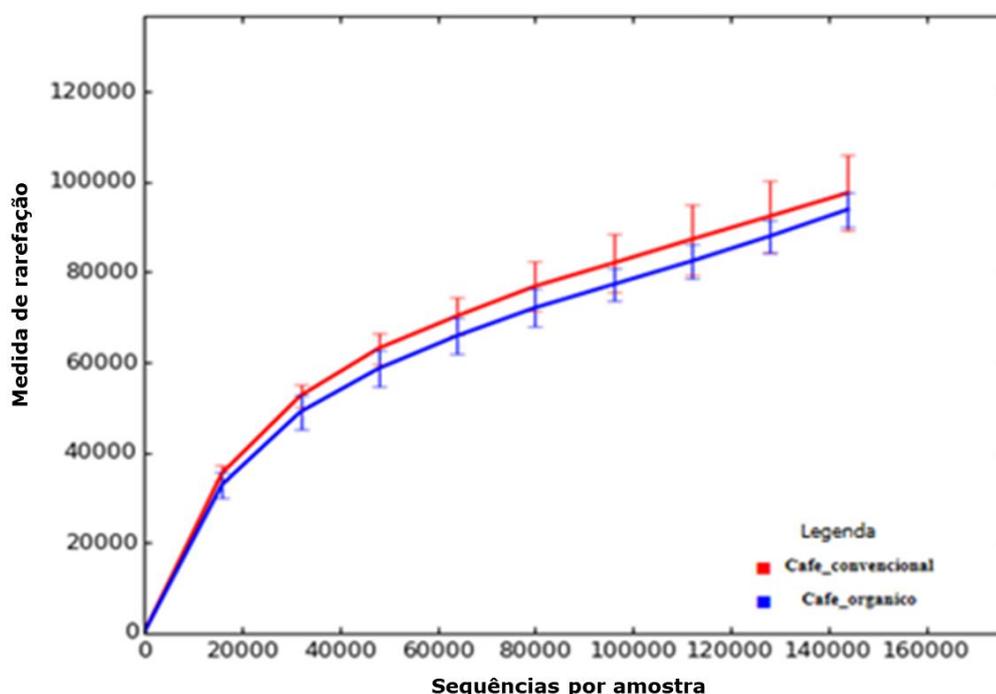
A quantidade total de sequências analisadas para cada área foi de 180.214 e 252.584 (OTU's) sequências por *pool* de amostra proveniente de cultivo convencional e orgânico, respectivamente.

A análise metagenômica da microbiota da rizosfera de café revelou uma média considerando 99% de similaridade entre as espécies.

Para verificar se o número de sequências foi suficiente para uma cobertura importante de todas as bactérias, realizou-se a construção de uma curva de rarefação; como mostra a Figura 27.

Nas duas áreas estudadas foi atingido o platô o que evidencia uma satisfatória cobertura dos dados.

Figura 27 - Curva de rarefação de bactérias rizosféricas de café de agricultura convencional e orgânica para avaliação de cobertura de sequências na identificação de novas OTUs.



4.4.2. Classificação taxonômica de OTUs

No amplo nível taxonômico identificamos sequências de 1 filo, 6 ordens e 27 famílias entre todas as amostras. Além disso, 6,66 % e 6,10 % das sequências da área de cultivo convencional e orgânico, respectivamente, não foram classificadas.

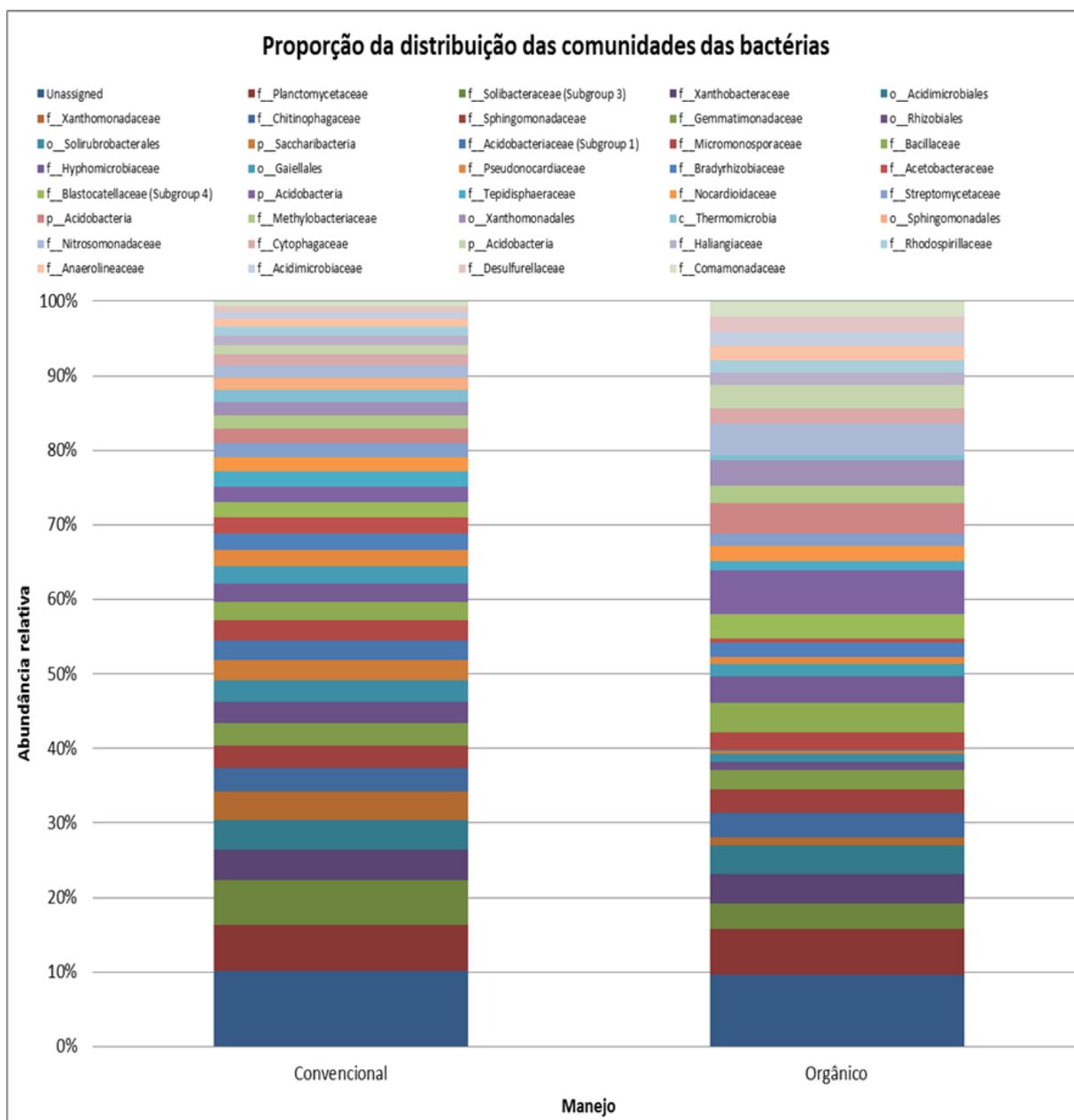
Foi observada uma prevalência de sequências classificadas pertencentes ao filo *Proteobacteria* (41,00 %). Outros grupos que foram observados em ambos os manejos, tais como *Actinobacteria* (20,00 %), *Acidobacteria* (15,00 %), *Bacteroidetes* (5,00 %), *Chloroflexi* (5,00 %), *Planctomycetes* (5,00 %), *Firmicutes* (3,00 %), *Gemmatimonadetes* (3,00 %) e *Saccharibacteria* (3,00 %).

Em uma avaliação mais detalhada, o microbioma observado entre os tratamentos é altamente similar e em média a família *Planctomycetaceae* foi a mais prevalente (aproximadamente 4,00 %). No entanto, algumas diferenças podem ser observadas com as famílias *Solibacteraceae* (4,00 %) e *Xanthobacteraceae* (3,00 %) sendo prevalente na área de cultivo convencional e o filo *Acidobacteria* (4,00 %) e a família *Nitrosomonadaceae* (3,00 %) na área de cultivo orgânico.

Os grupos com menor prevalência em ambos os manejos, convencional e orgânico foram as ordens *Xanthomonadales* (0,30 %) e *Sphingomonadales* (0,10 %), respectivamente.

Os grupos taxonômicos podem ser visualizados e individualmente analisados quanto à abundância relativa na Figura 28.

Figura 28 - Abundância relativa de bactérias rizosféricas do café (*Coffea arabica* L.) na área de agricultura convencional e orgânica analisadas por sequenciamento utilizando o sistema Illumina MiSeq.



4.4.3. Índices ecológicos entre manejo convencional e orgânico

Para a avaliação da diversidade e riqueza de espécies presentes na população total de OTUs entre as áreas de manejo, foram calculados os índices de Shannon e Jackknife de 1ª ordem respectivamente.

Estes índices são baseados nas abundâncias proporcionais das espécies e são muitos utilizadas em ecologia de população, levando em conta, tanto a uniformidade (equitabilidade) quanto a riqueza de espécies. O aumento do número de espécies ou o aumento da uniformidade das abundâncias aumenta a diversidade.

O índice mais utilizado para a determinação de diversidade é o índice de Shannon-Wiener (H'), procedente da teoria da informação de 1948. Este índice dá maior peso para as espécies raras, e é obtido pela equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Onde S é o número de espécies, p_i é a proporção da espécie i , estimada como n_i/N , onde n_i é a medida de importância da espécie i (número de indivíduos, biomassa), e N é o número total de indivíduos (Shannon, 2001).

Já o método Jackknife de 1ª ordem estima a riqueza total utilizando o número de espécies que ocorrem em apenas uma amostra (*uniques*). A estimativa de riqueza é calculada pela equação:

$$E_D = S_{obs} + S_1 \left(\frac{f-1}{f} \right)$$

Em que: S_{obs} = número de espécies observadas; S_1 = o número de espécie que está presente em somente um agrupamento (espécie de um agrupamento) e f = o número de agrupamento que contém iésima espécie de um agrupamento.

Os resultados mostram que em ambos os índices não houve diferença estatística entre as áreas estudadas, ou seja; em geral, os micro-organismos são altamente similares entre os tratamentos.

No entanto, quando os grupos bacterianos com prevalência acima de 1,00 % foram comparados e clusterizados pela análise de distância Euclidiana (Figura 29), nossos resultados mostraram que as áreas de cultivo convencional e orgânico se distanciam uma da outra com base em alguns grupos bacterianos que se diferem significativamente ($p < 0,05$). Estes grupos estão relacionados na Tabela 10.

Figura 29 - Abundância relativa de grupos distintos no nível mais profundo identificados na rizosfera de *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico. A cor amarela representa maior abundância bacteriana até 4,00 %. Grupos com abundância menor que 1 % não foram considerados.

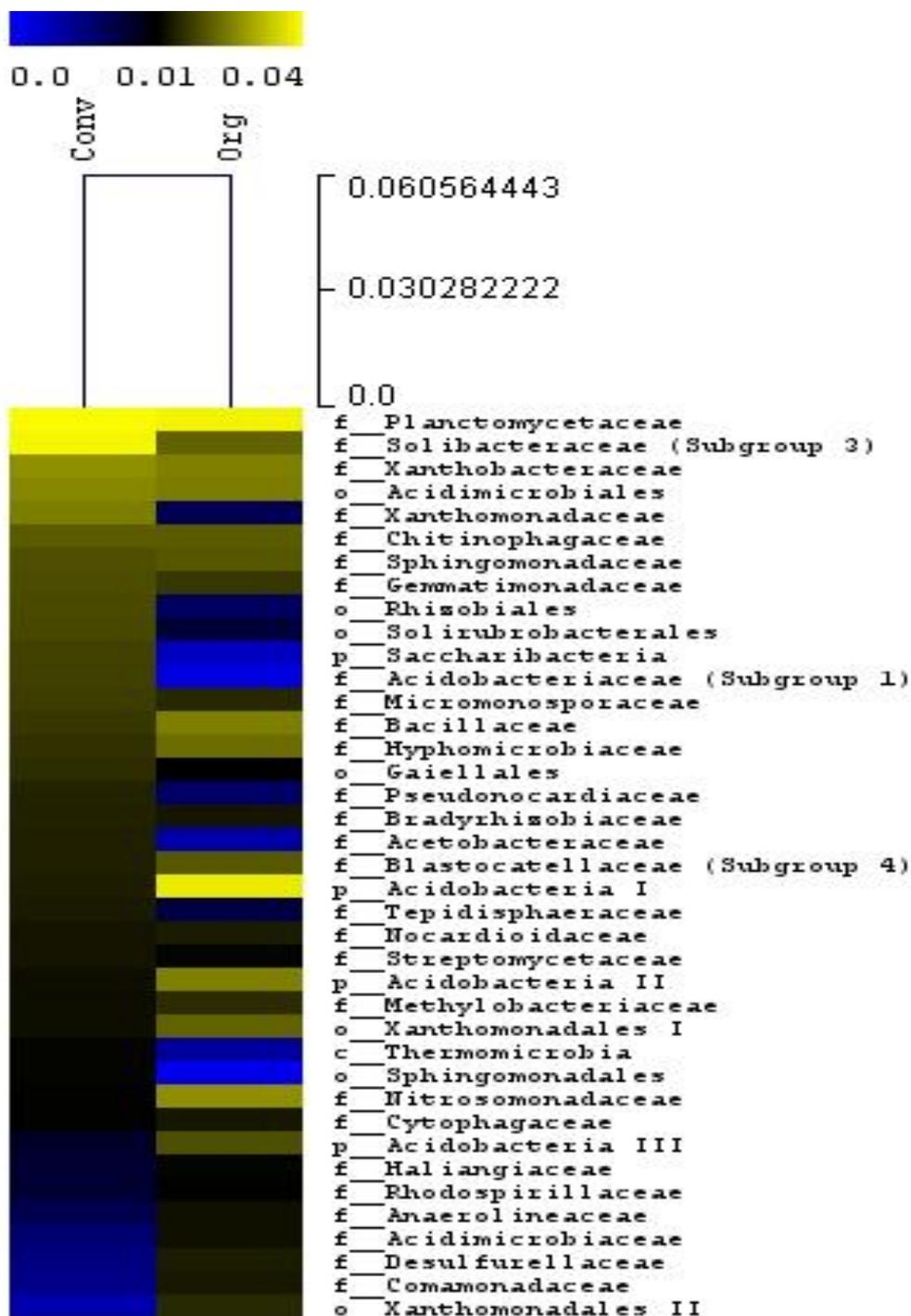


Tabela 10 - Grupos bacterianos que apresentaram abundância relativa com diferença significativa entre as amostras de rizosfera de café de cultivo convencional e orgânico.

Grupo bacteriano	valor p
<i>Solibacteraceae (subgrupo 3)</i>	0,0095
<i>Xanthomonadaceae</i>	0,0095
<i>Solirobrobacterales</i>	0,0095
<i>Sacaribactérias</i>	0,0095
<i>Gaielliales</i>	0,0381
<i>Pseudonocardiaceae</i>	0,0095
<i>Acetobacteraceae</i>	0,0095
<i>Tepidisphaeraceae</i>	0,0095
<i>Termomicrobia</i>	0,0381
<i>Sphingmonadales</i>	0,0190
<i>Acidobactérias III</i>	0,0095
<i>Rhodospirillaceae</i>	0,0381
<i>Desulfurelanceae</i>	0,0095
<i>Comamonadaceae</i>	0,0095
<i>Rhizobiales</i>	0,0095
<i>Acidobacteriaceae (Subgrupo 1)</i>	0,0095
<i>Acidobactérias I</i>	0,0095
<i>Xanthomonadales I</i>	0,0381
<i>Nitrosomonadaceae</i>	0,0095
<i>Haliangiaceae</i>	0,0381
<i>Acidimicrobiaceae</i>	0,0095

Para comparação, normalizamos as sequências de cada amostra para 3.000 sequências aleatórias para um total de 30.000 sequências (10 amostras x 3.000 sequências por amostra), onde 45.545 (18,7 %) foram identificadas pelo menos uma vez (aqui referidas como sequências únicas). Essas sequências únicas foram agrupadas em OTUs, resultando em 12.65 OTUs no nível de similaridade de 99 %. Para maior clareza, todas as outras análises e estatísticas deste estudo usaram OTUs agrupadas no nível de 99 % de similaridade.

O maior número de OTUs a 99 % de similaridade de sequência foi encontrado na rizosfera de café a partir do cultivo orgânico, quando comparado com a rizosfera de café a partir do cultivo convencional. O número de OTUs por local da amostra foi, como esperado, diretamente correlacionado ao número de amostras analisadas.

4.4.4. Análise estatística

A análise estatística AMOVA (baseada em OTUs) mostrou que cada área de cultivo (convencional e orgânico) não foi estatisticamente diferente da outra ($p < 0,0001$), quando amostras de rizosfera foram comparadas por local.

As comparações entre a rizosfera do local da amostra foram não significativamente diferente ($p < 0,05$).

O solo é um sistema ecológico muito complexo e os micro-organismos presentes nele, desempenham um papel muito importante (GUPTA et al., 2015). O pirosequenciamento de alto rendimento é considerado um bom método para estudar a diversidade microbiana do solo, que pode ser usado para realizar sequenciamento de alta qualidade de seções específicas de DNA de comunidades microbianas do solo (MOLINA-MONTENEGRO et al., 2018).

Neste estudo, a diversidade, composição e abundância relativa da comunidade bacteriana na rizosfera de *Coffea arabica* L. de agricultura convencional e orgânica foram representadas via sequenciamento de alto rendimento da Illumina.

Os solos apresentam uma estruturação das comunidades microbianas com similaridade determinada de analisada em nível taxonômico, ou seja, composta de uma comunidade microbiana encontrada na grande maioria dos solos que é formada pelos filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacterioides*, *Firmicutes* e *Planctomycetes* (JANSSEN, 2006; LUPATINI et al., 2017; PHILIPPOT et al., 2013).

5. Discussão

Muitos estudos demonstraram que a comunidade microbiana da rizosfera pode ser moldada pelo habitat do hospedeiro da planta, exsudatos radiculares e características estruturais ou fenotípicas da raiz (HAICHAR et al., 2008; NARULA; KOTHE; BEHL, 2009; SALEEM et al., 2018).

A taxonomia das bactérias presentes nos solos do presente estudo foi acessada por meio da técnica de metagenômica. Foi observada uma prevalência de sequências classificadas pertencentes ao filo *Proteobacteria* (41,00 %). Outros grupos que foram observados em ambos os manejos foram o filo *Actinobacteria* (20,00 %), *Acidobacteria* (15,00 %), *Bacterioides* (5,00 %), *Chloroflexi* (5,00 %), *Planctomycetes* (5,00 %), *Firmicutes* (3,00 %), *Gemmatimonadetes* (3,00 %) e *Saccharibacteria* (3,00 %).

Proteobacteria é um filo de ocorrência típica na rizosfera devido às suas rápidas taxas de crescimento e este ambiente, rico em nutrientes, é apropriado para este filo ou certas classes dentro deste filo (JOHNSTON-MONJE et al., 2016).

Algumas famílias pertencentes a este grupo são bem conhecidas e estudadas em todo o mundo. Sua presença em áreas agrícolas é comum, além de poder produzir diversos biocompostos de importância biotecnológica (KUMAR et al., 2013).

Newman et al., 2016 sugeriram que as *Xanthomonadaceae* são adaptadas e/ou enriquecidas por ambientes contendo glifosato (NEWMAN et al., 2016). Estudos anteriores também observaram um aumento na abundância de bactérias da família *Xanthomonadaceae* em resposta à fertilização a longo prazo e citaram a importância potencial de *Xanthomonadales* na dinâmica populacional bacteriana de solos alterados (CAMPBELL et al., 2010). Curiosamente, membros da nova família *Sinobacteraceae* (Ordem *Xanthomonadales*) foram isolados de um solo adjacente e contaminado por uma fábrica de produtos químicos que produziam herbicidas, incluindo o glifosato (Zhou et al., 2008), sugerindo que os membros desta família é aumentada em sua abundância e atividade metabólica em resposta à contaminação de solos por herbicidas (ZHOU et al., 2008).

O gênero *Rhizobium* é um dos mais estudados na agricultura devido à sua capacidade de realizar o processo de fixação de nitrogênio em leguminosas (CASTELLANE; LEMOS, 2007; DE SOUZA et al., 2012). A maioria das espécies bacterianas dentro da ordem bacteriana *Rhizobiales* são amplamente encontradas nas raízes e folhas das espécies de leguminosas e também não-leguminosas e são os principais constituintes da microbiota da planta.

Bactérias Gram-negativas específicas do solo, que são membros da α -*Proteobacteria* e estão na ordem *Rhizobiales*, possuem a habilidade única de infectar as raízes das leguminosas e assim desencadear a colonização e a formação de um órgão especializado chamado de nódulo. Como simbiontes intracelulares, as bactérias fixam nitrogênio atmosférico (N₂) e fornecem à planta. Assim, esta simbiose assume importância agrícola e ecológica, fornecendo uma fonte nitrogênio para auxiliar no crescimento das plantas (BOTHE; DRAKE, 2007). Em plantas não leguminosas, espécies da ordem *Rhizobiales* definem grupo fundamental da microbiota da planta, sugerindo interações funcionais adicionais com os hospedeiros vegetais (GARRIDO-OTER et al., 2018).

A família *Acetobacteraceae* é conhecida por abrigar muitas espécies de organismos de importância biotecnológica para a indústria e para a agricultura. Esta família também tem sido

descrita como bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de promover o crescimento vegetal por uma diversos mecanismos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998)

A maioria dos representantes deste grupo, também conhecida como diazotróficas, está geralmente associada à rizosfera do solo de muitas plantas e também estabelece uma associação mais específica, que se caracteriza por estarem estabelecidas como endófitos, no interior de raízes, folhas e outros tecidos vegetais. Os seus mecanismos para promoção de crescimento vegetal estão geralmente relacionados ao aumento da biomassa das plantas, solubilização de fosfato e outros minerais, e o controle biológico contra fungos fitopatogênicos (REIS; TEIXEIRA, 2015).

Informações adicionais estão sendo obtidas nos últimos anos sobre as funções de outros habitantes da microbiota do solo e da rizosfera, incluindo gêneros microbianos “incomuns” ou “raros” como os planctomicetos. A família *Planctomycetaceae*, pertencente ao filo *Planctomycetes*, foi detectada em maior abundância (4,00 %) nas duas áreas analisadas. Apresenta parede celular distinta, sem o peptídeoglicano característico, nucleóide e estrutura celular com compartimentalização. Características particulares como sua reprodução e metabolismo, além de sua onipresença ecológica, fazem deles um interessante grupo de organismos a serem estudados. (HOL et al., 2010; RISTOK et al., 2019; WANG et al., 2019b; ZHANG et al., 2019a).

O primeiro planctomiceto observado foi morfológicamente semelhante a um fungo planctônico, *Planctomyces bekefii* (GIMESI, 1924), dando o nome a esse filo. Curiosamente, nunca foi isolado em cultura pura. O primeiro relato do isolamento de um planctomiceto em culturas axênicas deve-se ao trabalho de James T. Staley (STALEY, 1973). Este organismo foi renomeado taxonomicamente várias vezes e foi finalmente designado *Pirellula staley* (SCHLESNER; HIRSCH, 1987).

Em 1986, uma nova ordem, *Planctomycetales* e família *Planctomycetaceae*, foi proposta para acomodar os vários membros deste grupo que foram descritos, com base na análise da sequência do gene 16S rRNA e características morfológicas distintas (SCHLESNER; STACKEBRANDT, 1986). O filo *Planctomycetes* foi proposto apenas em 2001 (GARRITY; HOLT, 2001) e em 2006, um superphylum foi designado para incorporar os filos *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* e *Chlamydiae* (superphylum PVC) (WAGNER; HORN, 2006).

A família *Planctomycetaceae* foi observada em maior abundância (4,00 %) (Figura 29) nas duas áreas analisadas. Esta família pertence ao filo *Planctomycetes*. É composto por

micro-organismos aeróbicos, comumente descritos em águas oligotróficas, eutróficas e também no solo (KRIEG et al., 2010).

Bactérias pertencentes ao filo *Planctomycetes* têm um grande número de características distintas e incomuns, tais como parede celular sem peptidoglicano, compartimentalização interna e características moleculares únicas em seus genes rRNA (IZUMI et al., 2013). Eles são facultativos, quimiotróficos aeróbios, com exceção dos micro-organismos responsáveis pela oxidação anaeróbica de amônia (anammox), Gram negativos (principalmente) e apresentam crescimento lento (SINISCALCHI et al., 2016). Algumas espécies pertencentes ao gênero *Planctomyces* são capazes de crescer em ambiente anaeróbico e reduzir nitrato a nitrito. Além disso, eles foram relatados em solos de manguezais, sistemas de tratamento de efluentes e lixiviados de aterros sanitários (ARAÚJO et al., 2014; KRIEG et al., 2010).

As *Acidobacteria* representam um filo altamente diverso, residente em uma ampla gama de habitats em todo o mundo (ZHANG et al., 2014). No entanto, apesar de sua alta abundância e diversidade, ainda temos relativamente pouca informação sobre as atividades atuais e ecologia dos membros deste filo, uma lacuna que pode ser atribuída em grande parte às dificuldades em cultivar a maioria das *Acidobacteria* e sua ausência nas coleções de cultura bacteriana (NAVARRETE et al., 2013).

Dada a amplitude filogenética de *Acidobacteria*, que é semelhante à diversidade metabólica das *Proteobacteria*, é evidente que estudos detalhados referentes a este filo são necessários. Todas as espécies cultiváveis conhecidas do filo *Acidobacteria* são heterotróficas e os membros de algumas subdivisões parecem ser mais versáteis na utilização de carboidratos (LI et al., 2013).

Dados genômicos e metagenômicos predizem uma série de capacidades ecologicamente relevantes para algumas acidobactérias, incluindo a habilidade de: uso de nitrito como fonte de nitrogênio, resposta à macro e micronutrientes e acidez do solo, expressão de múltiplos transportadores ativos, degradação de goma de gelana e produção de exopolissacarídeo (EPS). Assim, essas propriedades previstas aludem a um estilo de vida competitivo no solo (KIELAK et al., 2016).

No presente estudo, o filo *Acidobacteria*, bem como duas famílias (*Solibacteraceae* e *Acidobacteriaceae*) pertencentes a este filo foram mais abundantes ($P < 0,05$) na rizosfera de café da cultura convencional.

Bactérias pertencentes à família *Solibacteraceae* responderam negativamente à variação de temperatura em um estudo que avaliou a resposta do microbioma associado ao milho às variações climáticas e genótipos de plantas (WALTERS et al., 2018).

Em outro estudo, investigou-se a composição e o potencial metabólico da comunidade rizobacteriana de diferentes cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) com níveis variáveis de resistência ao fungo fúngico da raiz *Fusarium oxysporum* (Fox). As bactérias da família *Solibacteraceae* estavam entre as que apresentaram maior abundância na rizosfera do cultivar Fox-resistente (MENDES et al., 2017).

Jiang et al. (2017) analisaram as comunidades microbianas das rizosferas de macieiras perenes e mudas de macieira sob replantio em torno do Golfo de Bohai usando sequenciamento de alto eficiência. A umidade do solo e o conteúdo disponível de nitrogênio (N) e fósforo (P) disponível tiveram um efeito positivo sobre as *Acidobacteriaceae*. Assim, as propriedades do solo, especialmente o pH e a matéria orgânica, influenciam a abundância de micróbios benéficos do solo. Como a abundância de *Acidobacteriaceae* correlacionou-se significativamente com a umidade do solo e fósforo (P) disponível, inferiu-se que as *Acidobacteriaceae* provavelmente podem dissolver fósforo no solo (JIANG et al., 2017).

Essa família também foi mais abundante sob pastagem em comparação com os solos cultivados sob brócolis, batata, cebola e alface. A predominância de muitas bactérias sob pastagem, incluindo *Acidobacteriaceae*, pode refletir os efeitos combinados de sistemas radiculares muito diferentes e seus exsudatos (ou seja, tipo e quantidade) e diferenças nas propriedades do solo (ou seja, menor pH do solo, menor perturbação) comparado ao outras rizosferas (GARDNER; SENWO; DOWD, 2011).

O filo *Actinobacteria* é considerado um dos principais filos pertencentes ao domínio *Bacteria*. Pode representar até 30% da comunidade bacteriana do solo e participar na ciclagem de elementos e disponibilidade de nutrientes (ESCUADERO; DAZA; TORRES, 2012). As actinobactérias são amplamente encontradas no ecossistema do solo e da água e desempenham um papel crítico no processo de decomposição e formação do húmus (BUENO; FISCHER, 2006)(BUÉE et al., 2009).

Em um estudo realizado por Caldwell (2015) comparando a diversidade procariótica da rizosfera de fazendas intensivas, transicionais e orgânicas de café; o filo *Actinobacteria* estava entre os mais abundantes. Na fazenda orgânica, este grupo foi, em média, cinco vezes mais abundante quando comparada à fazenda intensiva e de transição (CALDWELL et al., 2015).

Estes resultados diferem dos encontrados nesse estudo, uma vez que as duas ordens (*Solirubrobacterales* e *Gaielliales*) e uma família (*Pseudonocardiaceae*) pertencentes a esse filo apresentaram maior abundância na rizosfera do café do cultivo convencional quando comparado à rizosfera do cultivo orgânico.

Outros estudos utilizando sequenciamento de nova geração objetivaram caracterizar a comunidade bacteriana no solo do bioma cerrado brasileiro, do bioma pampa e em solo brasileiro de lavouras de cana-de-açúcar. O filo *Actinobacteria* também estava entre os grupos mais abundantes. Isso indica que esse grupo não é apenas comum, mas também pode desempenhar um papel importante em diversos solos de culturas agrícolas brasileiras (BENEDUZI et al., 2019; DINI-ANDREOTE et al., 2010; RAMPELOTTO et al., 2013).

Qiao et al (2017) determinaram a estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera no algodão e estudaram a variação da estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera em diferentes tipos de solo e estágios de desenvolvimento. Neste estudo, os micro-organismos dominantes de *Actinobacteria* em solos ricos em nutrientes foram *Solirubrobacterales*. O mesmo grupo, em outro estudo sobre a biodiversidade da microbiota da rizosfera bacteriana de videira em um vinhedo de manejo integrado de pragas, considerou espécies bacterianas dominantes não classificadas cuja frequência não se alterou nas diversas amostras (NOVELLO et al., 2017).

Outra de bactérias, pertencente ao filo *Actinobacteria*, que apresentou maior abundância na rizosfera do café convencional foi a *Gaiellales*. Esta ordem tem apenas uma espécie descrita, que foi isolada da água de um aquífero profundo (ALBUQUERQUE et al., 2011). Sequências do gene 16S rRNA de *Gaiella* sp. foram encontradas em sedimentos de uma primavera térmica (ROZANOV et al., 2014), em alta abundância no solo (KIM et al., 2014) e em rizosfera e amostras de raiz de arroz (HERNÁNDEZ et al., 2015). Sua presença no solo da rizosfera e nos tecidos radiculares mostra que alguns membros desse gênero interagem com as plantas. De acordo com os resultados de Szoboszlay et al (2016), a 7,40-dihydroxiflavona dos exsudatos radiculares pode ter um papel nessas interações (SZOBOSZLAY; WHITE-MONSANT; MOE, 2016).

Diferente do que encontramos neste estudo, Wang et al. (2016) investigaram a resposta das comunidades de bactérias à agricultura orgânica em diferentes culturas ao longo do curso médio e inferior do rio Yangtze, na China. Alguns grupos principais de bactérias foram mais abundantes no grupo orgânico, como foi o caso da família *Pseudonocardiaceae* (WANG et al., 2016).

Alvarez-Yela (2017) realizou um estudo metagenômico detalhado que estabelece o efeito de intervenções antropogênicas em comunidades microbianas e na dinâmica do ciclo biogeoquímico do solo. Embora os resultados sugiram que as atividades agrícolas levam a mudanças na estrutura das comunidades microbianas, essas mudanças não foram observadas em relação ao filo *Actinobacteria* (ALVAREZ-YELA et al., 2017). Em contrapartida, Chávez-Romero (2016), ao investigar como o manejo de resíduos agrícolas, o plantio direto e a aplicação de fertilizantes afetam a comunidade bacteriana, constataram que a abundância relativa de *Actinobacteria* aumentou com a adição de material vegetal orgânico (CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016).

De acordo com alguns estudos de solos em áreas agrícolas sob diferentes tipos de adubação orgânica, *Actinobacteria* é um dos grupos mais abundantes nessas áreas (HAMM et al., 2016; NIELSEN et al., 2014). As actinobactérias estão frequentemente associadas à degradação de compostos de carbono recalcitrantes. Em um estudo de como o manejo de resíduos agrícolas, plantio direto e aplicação de fertilizantes afetam a comunidade bacteriana e os grupos envolvidos na degradação de resíduos vegetais, os autores descobriram que a ocorrência deste filo aumentou em abundância com plantio direto (CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016).

As bactérias do filo *Saccharibacteria* são abundantes e generalizadas na natureza, mas pouco se sabe sobre sua ecofisiologia e filogenia detalhada. Trata-se de um grupo filogeneticamente diversificado que participa da degradação de vários compostos orgânicos, bem como compostos de carboidratos sob condições aeróbicas de redução de nitrato e anaerobiose (KINDAICHI et al., 2016).

Segundo Starr et al. (2018), *Saccharibacteria* gera energia por fermentação da necromassa do solo e exsudatos da raiz da planta para acetato e lactato. Com base nos levantamentos genéticos de RNA ribossômico 16S, sabemos que as sacaribactérias ocorrem na rizosfera, mas pouco se sabe sobre seu metabolismo e como elas diferem dos organismos relacionados que crescem em outros ambientes (BECKERS et al., 2017; CORREA-GALEOTE et al., 2016; STARR et al., 2018).

Wang et al (2018) estudaram as alterações nas comunidades microbianas da rizosfera em mudas de pepino em vasos tratadas com ácido siríngico. Eles observaram que as OTUs exclusivas da amostra de solo tratado com este ácido eram dominadas por sequências pertencentes a classes pertencentes ao filo *Saccharibacteria* (WANG et al., 2018).

É válido considerar que, na aplicação de diferentes tipos de manejo, é esperado uma mudança qualitativa e quantitativa na constituição desse solo. Diferentes tipos de manejo

podem significar uma disponibilidade de substrato diferente que acabará determinando, favorecendo ou inibindo, o estabelecimento de diferentes grupos microbianos (Cardoso et al., 1992).

De acordo com o exposto, vale ressaltar a metagenômica como uma ferramenta importante no entendimento das comunidades microbianas, desde o estudo da biodiversidade e características funcionais até a prospecção de genes de interesse biotecnológico.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes considerações podem ser apresentadas:

- a) Foi possível obter um total de 342 isolados bacterianos endofíticos de *Coffea arabica* L. proveniente de cultivo convencional e orgânico;
- b) Dos 342 isolados bacterianos endofíticos avaliados para fatores de crescimento *in vitro*, 64,33% solubilizaram fosfato inorgânico, 34,21% apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio atmosférico e 25,15% produziram mais que 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido indol acético;
- c) Os isolados endofíticos apresentaram atividade antagônica aos seguintes fungos fitopatogênicos: *Colletotrichum* sp. (20 %), *Fusarium oxysporum* (26 %) e *F. solani* (30 %);
- d) Testes de atividade enzimática *in vitro* revelaram que 11% dos isolados endofíticos testados apresentaram atividade amilolítica, 3% celulolítica, 3% esterolítica, 3% lipolítica, 12% pectinolítica, 11% pectinolítica e 1% proteolítica;
- e) Os isolados bacterianos endofíticos foram identificados por MALDI-TOF e também pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e os resultados obtidos foram semelhantes.
- f) A comunidade bacteriana endofítica cultivável do café proveniente da área de cultivo orgânico é mais diversa quando comparada com esta mesma comunidade isolada do café proveniente da área de cultivo convencional.
- g) O isolado CRA-241 (*Enterobacter tabaci*) foi o melhor isolado testado para promoção de crescimento vegetal *in vivo*.
- h) Na análise metagenômica da rizosfera de *Coffea arabica* L.a família *Planctomycetaceae* foi a mais abundante nas duas áreas analisadas, enquanto as ordens *Xanthomonadales* e *Sphingomonadales* foram as que apresentaram menor abundância relativa na área de cultivo convencional e orgânico, respectivamente;
- i) Um total de 21 grupos bacterianos apresentou abundância relativa com diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras de rizosfera de café convencional e orgânico, o que indica a influência do manejo na diversidade bacteriana do solo rizosférico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. 1–14, mar. 2019.

ABIC. **Associação Brasileira da Indústria de Café**. Disponível em: <<http://abic.com.br/>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

ACOB. **Cafeicultura Orgânica: Técnicas agroecológicas**. Disponível em: <<http://www.cafeorganicobrasil.org/>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

AFFE, H. M. D. J.; RIGONATO, J.; NUNES, J. M. D. C. Metagenomic Analysis of Cyanobacteria in an Oligotrophic Tropical Estuary, South Atlantic. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–13, 2018.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.

ALBUQUERQUE, L. et al. *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of Gaiellaceae fam. nov. and Gaiellales ord. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 595–599, 2011.

ALJANABI, S.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.

ALVAREZ-YELA, A. C. et al. Influence of agricultural activities in the structure and metabolic functionality of paramo soil samples in Colombia studied using a metagenomics analysis in dynamic state. **Ecological Modelling**, v. 351, p. 63–76, 2017.

AMORIM, H. V. DE. Estado nutricional do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista de Agricultura**, v. 43, p. 93–102, 1968.

ANDRADE, F. M. D. E. **Crescimento e inoculação em morangueiro**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2017.

ANDRADE, L. N. T.; NUNES, M. U. C. **Produtos alternativos para controle de doenças e pragas em agricultura orgânica**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001.

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 45–80, 2000.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20–29, 2017a.

ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20–29, 2017b.

ARAÚJO, A. S.; MARTINS, E. DA S. Produção de α -amilases por *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 583–592, 2018.

ARAÚJO, J. B. S. **Composto orgânico e biofertilizante na nutrição do cafeeiro na formação do sistema orgânico**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2004.

ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 229–236, 2001.

ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.

ARAÚJO, W. L. et al. **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. 1. ed. Santarém: Universidade Federal do Oeste do Pará -, 2014.

ASSUMPTIÃO, L. DE C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. agropec. bras**, n. 5, p. 503–510, 2009.

AWAIS, M. et al. Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. September 2015, p. 312–321, 2017.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40–65, 2000.

AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological

applications. In: KHARWAR, R. N. et al. (Eds.). . **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. New Delhi: Springer, 2014. p. 17–22.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: **Fungi: multifaceted microbes**. [s.l: s.n.]. p. 189–207.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for Biological Control of Plant Diseases. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Eds.). . **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis, 1997. p. 95–109.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 81–86, 1993.

BAREA, J. M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of Plant Growth Regulators by Rhizosphere. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 40, p. 129–134, 1976.

BARKEN, K. B.; HAAGENSEN, J. A. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. **Clinica Chimica Acta**, v. 384, n. 1–2, p. 1–11, 1 set. 2007.

BARRATT, B. I. P. et al. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 155–167, 2018.

BASTIDA, F. et al. When drought meets forest management: Effects on the soil microbial community of a Holm oak forest ecosystem. **Science of The Total Environment**, v. 662, p. 276–286, abr. 2019.

BATISTA, B. D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. [s.l.] Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

BATISTA, B. D. et al. Screening of tropically derived , multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, n. September 2017, p. 33–42, 2018.

BATISTA, B. D.; QUECINE-VERDI, M. C.; LACAVAL, P. T. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por endófitos e rizobactérias. In: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO et al. (Eds.). . **Biologia Microbiana Ambiental**. Maringá: Eduem, 2018. p. 105–124.

BATISTA JUNIOR, C. B. et al. NOTAS CIENTÍFICAS Efeito fungistático de *Bacillus*

thuringiensis e de outras bactérias sobre alguns fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 1189–1194, 2002.

BATISTA, T. F. C. et al. Ocorrência de fungos e nematóides fitogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari (AM). **Revista Ciências Agrárias**, v. 47, p. 163–171, 2007.

BECKERS, B. et al. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2017.

BENEDUZI, A. et al. Distinct grazing pressure loads generate different impacts on bacterial community in a long-term experiment in Pampa biome. **Applied Soil Ecology**, v. 137, n. January, p. 167–177, 2019.

BENT, S. J.; FORNEY, L. J. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 2, p. 689–695, 2008.

BERG, G. et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399–406, 1976.

BESERRA JÚNIOR, J. E. A. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 535–537, 2006.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 24 abr. 2012.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1614–1619, 1 nov. 2010.

BOGAS, A. C. et al. Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.

- BOGAS, A. C. et al. Effects of growth-promoting endophytic *Methylobacterium* on development of Citrus rootstocks. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 19, p. 646–653, 2016.
- BÖHME, K. et al. Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Electrophoresis**, v. 32, n. 21, p. 2951–2965, 2011.
- BÓKA, B. et al. Genome analysis of a *Bacillus subtilis* strain reveals genetic mutations determining biocontrol properties. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 52, 2019.
- BONATELLI, M. L. **Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. [s.l.] Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.
- BONGIORNO, V. A. et al. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 855–865, 2016.
- BOTHE, H.; DRAKE, H. **Interactions among Organisms that Result in Enhanced Activities of N-Cycle Reactions**. [s.l.] Elsevier B.V., 2007.
- BOTTA, A. L. et al. In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 666–674, 2013.
- BOURASSA, L.; BUTLER-WU, S. M. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. **Methods in Microbiology**, v. 42, p. 37–85, 1 jan. 2015.
- BRADER, G. et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, 2014.
- BRADY, C. et al. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., . **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 309–319, 2013.
- BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions : ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 86–98, 2016.
- BRASIL. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1999.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e dá outras providências. Brasil, 2005.

BRÍGIDO, C. et al. Diversity and Functionality of Culturable Endophytic Bacterial Communities in Chickpea Plants. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 42, 14 fev. 2019.

BRILL, W. J. Biological nitrogen fixation. **Scientific American**, v. 236, p. 68–81, 1977.

BROECKLING, C. D. et al. Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 74, n. 3, p. 738–744, 2008.

BROEK, A. VANDE et al. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1338–1342, 1999.

BROWN, M. E. Seed and Root Bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 181–197, 1974.

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2006.

BUERMANS, H. P. J.; DEN DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 10, p. 1932–1941, out. 2014.

BULEN, W. A.; LECOMTE, J. R. Nitrogenase complex and its components. **Methods in Enzymology**, v. 24, p. 456–470, 1972.

CALDWELL, A. C. et al. Prokaryotic Diversity in the Rhizosphere of Organic , Intensive , and Transitional Coffee Farms in Brazil. p. 1–17, 2015.

CAMERON, M. et al. Short communication: Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 590–595, 2018.

CAMPBELL, B. J. et al. The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 1842–1854, 2010.

CARBONNELLE, E. et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 104–109, 1 jan. 2011.

CAROLINI, R. et al. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 49–61, 2013.

CARRILLO, J.; DURÁN, C. Fast identification of Bacteria for Quality Control of Drinking Water through A Static Headspace Sampler Coupled to a Sensory Perception System. **Biosensors**, v. 9, n. 1, p. 23, 2019.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353–359, 2006a.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353–359, 2006b.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. D. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503–1506, 2007.

CASTILLO, I. et al. Isolation of endophytic, epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from cultivated rice paddy soils of the Guadalquivir river marshes. , v. 4, n. 3, p. 127-136, . **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science (GARJAS)**, v. 4, n. 3, p. 127–136, 2015.

CASTRO, P. R. DE C. E; SANTOS, V. M. DOS; STIPP, S. R. Nutrição vegetal e biorregulação no desenvolvimento das plantas. **Informações Agronômicas N°**, v. 139, n. setembro, p. 9–15, 2012.

CASTRO, R. A. et al. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014.

CASTRO, R. A. et al. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 59–66, 2018a.

CASTRO, R. A. et al. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 59–66, 2018b.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA, 1999.

CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 748–754, 2005.

CEPAGRI. **A classificação climática de koeppen para o estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://www.cpa.unicamp.br/>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

CERDA, R. et al. Effects of shade, altitude and management on multiple ecosystem services in coffee agroecosystems. **European Journal of Agronomy**, v. 82, p. 308–319, 2017.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção do crescimento vegetal**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2005.

CERQUEIRA, F. et al. Antibiotic resistance genes distribution in microbiomes from the soil-plant-fruit continuum in commercial *Lycopersicon esculentum* fields under different agricultural practices. **Science of The Total Environment**, v. 652, p. 660–670, 20 fev. 2019.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.

CHANG, C. L. T. et al. Beneficial effect of *Bidens pilosa* on body weight gain, food conversion ratio, gut bacteria and coccidiosis in chickens. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.

CHAUHAN, H. et al. Novel plant growth promoting rhizobacteria — Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38–53, 2015.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43–52, 2013.

CHÁVEZ-ROMERO, Y. et al. Soil & Tillage Research 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C , N-fertilizer and tillage-crop residue management. v. 159, p. 1–8, 2016.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 783–787, 2000.

CHEN, B. et al. The Effects of the Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05

and IAA on the Plant Growth and Cadmium Uptake of *Sedum alfredii* Hance. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

CHÈNEBY, D. et al. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, n. 2, p. 121–128, 1 dez. 2000.

CHENNIAPPAN, C. et al. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. **Biological Control**, v. 129, n. July 2018, p. 55–64, 2019.

CHIMWAMUROMBE, P. M.; GRÖNEMEYER, J. L.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1–11, 2016.

CHONE, R. M. S. et al. Brassinosteroid increases the cytokinin efficiency to induce direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 1, p. 63–71, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **No Title**. Disponível em: <www.conab.gov.br>.

COMPANT, S. et al. PAS 100:2011 Specification for Composted Materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 1–68, 2005.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

Conselho de Exportadores de Café do Brasil. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

CORREA-GALEOTE, D. et al. Bacterial Communities in the Rhizosphere of Amilaceous Maize (*Zea mays* L.) as Assessed by Pyrosequencing. v. 7, n. July, p. 1–8, 2016.

CORREA-GALEOTE, D.; BEDMAR, E. J.; ARONE, G. J. Maize Endophytic Bacterial Diversity as Affected by Soil Cultivation History. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 484, 16 mar. 2018.

COSTA, S. M. L.; MELLONI, R. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*) Relationship of arbuscular mycorrhizal

fungi and rhizobacteria on the growth of olive tree seedlings (*Olea europaea*). **Ciencia Florestal**, v. 29, n. 1, p. 169–180, 2019.

COSTE, R. **Les caféiers et les cafés dans le monde**. Paris: Larose, 1955.

CUNHA, G. DE M. **Estudo comparativo de condições químicas e físicas de um Latossolo Vermelho-Amarelo Álico, de Encosta, sob duas coberturas: café e mata natural**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 1995.

DA SILVEIRA, A. P. D. et al. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 2, p. 283–295, 7 fev. 2019.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. Porto: [s.n.].

DAUNGFU, O.; YOUPENSUK, S.; LUMYONG, S. Endophytic Bacteria Isolated from Citrus Plants for Biological Control of Citrus Canker in Lime Plants. **Tropical Life Sciences Research**, v. 30, n. 1, p. 73–88, 2019.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.

DAWWAM, G. E. et al. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 2, p. 195–201, 2013.

DE BARY, A. **Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten**Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Leipzig: [s.n.].

DE OLIVEIRA, A. N.; DE OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Production and some properties of crude alkaline proteases of indigenous Central Amazonian rhizobia strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1185–1195, 2010.

DE RESPINIS, S. et al. MALDI-TOF MS of Trichoderma: a model system for the identification of microfungi. **Mycological Progress**, v. 9, n. 1, p. 79–100, 17 mar. 2010.

DE SOUZA, J. A. M. et al. Draft genome sequence of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium elkanii* 587. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 13, p. 3547–3548, 2012.

DEL CHIERICO, F. et al. Proteomics boosts translational and clinical microbiology. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 69–87, 31 jan. 2014.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and

assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 189–195, 2009.

DIAS, P. P. Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição para o crescimento de plantas. p. 101, 2011.

DINESH, R. et al. Isolation , characterization , and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. **Microbiological Research**, v. 173, p. 34–43, 2015.

DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, v. 336, n. 1, p. 337–349, 2010.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. L. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, 1995.

DONG, Y.; INIGUEZ, A. L.; TRIPLETT, E. W. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Plant and Soil**, v. 257, n. 1, p. 49–59, 2003.

DONOHUE, M. J. et al. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 3, p. 380–389, 1 jun. 2006.

DORIGHELLO, D. V. **VERSATILIDADE DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

DUAN, Y. Q. et al. *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1161–1169, 2015.

DUARTE, G. M. et al. População de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio na rizosfera de milho transgênico e crioulo, cultivados com solo de agroecossistemas em Urutaí, GO. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 3, 2014.

DVORNIKOVA, T. P.; SKRIABIN, G. K.; SUVOROV, N. N. Enzymatic transformation of tryptamine by fungi. **Mikrobiologiya**, v. 39, p. 42–46, 1970.

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature EMBO Reports**, v. 249, p. 805–810,

1974.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE**, v. 26, p. 2460–2461, 2010.

EL-DEEB, B.; FAYEZ, K.; GHERBAWY, Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 56–64, 2013.

EL-DIN HASSAN, S. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. 2017.

ELBEHIRY, A. et al. Performance of MALDI biotyper compared with Vitek™ 2 compact system for fast identification and discrimination of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 6, p. 1061–1070, 2016.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J. W. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian journal of microbiology**, v. 46, n. 11, p. 1036–41, 2000.

ELY, C. S.; SMETS, B. F. Guild Composition of Root-Associated Bacteria Changes with Increased Soil Contamination. **Microbial Ecology**, 2019.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro: [s.n.].

ESCUADERO, E. L. R.; DAZA, O. D. S.; TORRES, J. H. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. **Rev. Colomb. Biotecnol. Diciembre**, v. XIV, n. 2, p. 70–80, 2012.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; HOSSEINI, H. M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. **MethodsX**, v. 2, p. 72–78, 2015.

FABIAŃSKA, I. et al. Plant-mediated effects of soil phosphorus on the root-associated fungal microbiota in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 221, n. 4, p. 2123–2137, 2019.

FACCHIN, S. et al. Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. **Open Journal of Ecology**, v. 3, n. 1, p. 34–47, 2013.

FACCHIN, S. **Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas microbianas com aplicações biotecnológicas no tratamento de esgotos**. [s.l.]

Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

FANTINEL, V. S. et al. BIOCONTROLE In Vitro De Colletotrichum siamense UTILIZANDO Trichoderma spp. E Bacillus thuringiensis var. kurstaki. **Ciência Agrícola**, v. 16, n. 3, p. 43–50, 2018.

FARINA, R. **Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura de canola (Brassica napus L .) cultivada no município de Vacaria , Rio Grande do Sul . Roberto Farina.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

FELIPHE, B. H. M. P. E. **Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados à Eugenia Pyriformis (Myrtaceae).** [s.l.] Universidade Federal de Alfenas, 2015.

FENG, F. et al. Isolation, Colonization, and Chlorpyrifos Degradation Mediation of the Endophytic Bacterium Sphingomonas Strain HJY in Chinese Chives (Allium tuberosum). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1131–1138, 2017.

FERREIRA, A. et al. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by Pantoea agglomerans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 1, p. 8–14, 2008.

FIGUEIREDO, B. P. DE. **Efeito do adubo orgânico na diversidade bacteriana de solos.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal, 2015.

FILHO, G. N. S.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesq. agropec. bras**, v. 36, p. 1495–1508, 2001.

FIOROTT, A. S.; STURM, G. M. Café canéfora: em busca de qualidade e reconhecimento. **Café Amazônia**, p. 427–431, 2015.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; SCOTT, H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (Zea mays L.). **New Phytologist**, v. 122, n. 2, p. 299–305, 1992.

FLORES-FERNÁNDEZ, C. N. et al. Novel extremophilic proteases from Pseudomonas aeruginosa M211 and their application in the hydrolysis of dried distiller's grain with solubles. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, 2019.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with

leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 35–59, 2009.

FUCHS, B.; KRAUSS, J. Can Epichloë endophytes enhance direct and indirect plant defence? **Fungal Ecology**, p. 1–6, 2018.

GAIERO, J. R. et al. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1738–1750, 2013.

GAMEZ, R. et al. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). **Microbiological Research**, v. 220, p. 12–20, 2019.

GARDNER, T.; SENWO, Z.; DOWD, S. E. Soil Rhizosphere Microbial Communities and Enzyme Activities under Organic Farming in Alabama. n. December, 2011.

GARRIDO-OTER, R. et al. Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 1, p. 155–167.e5, 2018.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. . The road map to the Manual. In: D. R., B.; R. W., C.; G. M., G. (Eds.). . **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2001. p. 119–166.

GAUDREAU, A. M. et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of bacteria growing as biofilms. v. 145, n. October 2017, p. 79–81, 2018.

GIMESI, N. **Hydrobiologiai Tanulmányok (Hydrobiologische Studien). I: Planctomyces bekefii Gim. nov. gen. et sp.** Kiadja a M ed. Budapest: [s.n.].

GLICK, B. R. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications**. v. 2012, 2012.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Manual de fitopatologia**, p. 184–200, 1997.

GOMIERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M. G. Environmental impact of different agricultural management practices: Conventional vs. Organic agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 1–2, p. 95–124, 2011.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review-promoting rhizobacteria (PGPR); indole

acetic acid (IAA); phosphate solubilization; siderophore production; antibiotic production; induced systematic resistance (ISR); ACC deaminase. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, p. 1–19, 2016.

GRAÇAS, J. P. et al. **Microrganismos estimulantes na agricultura**. Piracicaba: Divisão de Biblioteca ESALQ-USP, 2015.

GRANT, C. A. et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, v. 95, n. 19, p. 1–5, 2001.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005.

GRIFFIN, M. F. Biocontrol and Bioremediation: Two Areas of Endophytic Research Which Hold Great Promise. In: In: VERMA, V. C.; GANGE, A. C. (Eds.). **Advances in Endophytic Research**. Springer-Verlag, Heidelberg: [s.n.]. p. 231–256.

GUIMARÃES, D. O. Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans*. p. 53, 2009.

GUPTA, G. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, n. 2, p. 96–102, 2015.

GUPTA, G.; PANWAR, J.; JHA, P. N. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 252–261, 2013.

HAICHAR, F. E. Z. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **ISME Journal**, v. 2, n. 12, p. 1221–1230, 2008.

HAILE, M.; KANG, W. H. The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. **Journal of Food Quality**, v. 2019, p. 1–6, 2019.

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

HAMM, A. C. et al. Bacterial communities of an agricultural soil amended with solid pig and dairy manures, and urea fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v. 103, p. 61–71, 2016.

- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 1477–1481, 2004.
- HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1855–1869, 1996.
- HARON, M. H. et al. Plant microbiome-dependent immune enhancing action of Echinacea purpurea is enhanced by soil organic matter content OPEN. **Nature Scientific Reports**, v. 9, n. 136, p. 1–11, 2019.
- HARTMANN, A. et al. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges – A review. **Journal of Advanced Research**, v. Online, 2019.
- HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1–2, p. 7–14, 2008.
- HE, R. et al. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 191–195, 2009.
- HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, p. 1–8, 2016.
- HERNÁNDEZ, M. et al. Different bacterial populations associated with the roots and rhizosphere of rice incorporate plant-derived carbon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 2244–2253, 2015.
- HOL, W. H. G. et al. Reduction of rare soil microbes modifies plant-herbivore interactions. **Ecology Letters**, v. 13, n. 3, p. 292–301, 2010.
- HONGYU, K. et al. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, n. 5, p. 83–90, 2015.
- HOUFANI, A. A. et al. Cellulase–Hemicellulase Activities and Bacterial Community Composition of Different Soils from Algerian Ecosystems. **SOIL MICROBIOLOGY**, v. 77, p. 713–725, 2019.
- HUNGRIA, M. et al. INTERAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS DO SOLO, FEIJOEIRO E MILHO EM MONOCULTURA OU CONSÓRCIO 1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 807818, 1997.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. **Indonesian Journal of Agricultura Science**, v. 4, n. 1, p. 27–31, 2003.

ISABEL, M. et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 3–4, p. 167–174, 2013.

IZUMI, H. et al. Isolation and diversity of planctomycetes from the sponge *Niphates* sp., seawater, and sediment of Moreton Bay, Australia. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 533–546, 2013.

JACKSON, D.; SKILLMAN, J.; VANDERMEER, J. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. **Biological Control**, v. 61, n. 1, p. 89–97, 2012.

JACOBSEN, S. K. et al. Organic cropping practice decreases pest abundance and positively influences predator-prey interactions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 272, p. 1–9, fev. 2019.

JALGAONWALA, R. E.; MAHAJAN, R. T. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 6, p. 1733–1741, 2011.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. MINIREVIEW 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

JANSSEN, P. H. Janssen 2000. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 2006.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 83–98, 2014.

JIANG, J. et al. Microbial community analysis of apple rhizosphere around Bohai Gulf. **Scientific Reports**, n. March, p. 1–9, 2017.

JOHNSTON-MONJE, D. et al. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1–2, p. 337–355, 2016.

JORDANA-LLUCH, E.; MARTRÓ CATALÀ, E.; AUSINA RUIZ, V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 10, p. 635–644, 1 dez. 2012.

JÚNIOR, E. C. DA S.; JUNQUEIRA, A. M. R.; SOARES, J. P. G. **ANÁLISE DO IMPACTO DA TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE CAFÉ ORGÂNICO EM UNIDADES PRODUTIVAS NO DF e RIDE**. SOBER - Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. **Anais...**Campinas: 2018

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais Doenças De Anonáceas No Brasil : **Anais do V Congresso Internacional e Encontro Brasileiro de Annonaceae: do gene à exportação**, v. 36, p. 55–64, 2014.

KALAIYARASI, M. et al. Statistical Approach for the Production of Protease and Cellulase from *Bacillus cereus* KA3. **Bioprocess Engineering**, v. 1, n. 4, p. 93–103, 2017.

KÄMPFER, P.; MARTIN, K.; GLAESER, S. P. *Lysinibacillus contaminans* sp. nov., isolated from surface water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART9, p. 3148–3153, 2013.

KANNAN, R.; DAMODARAN, T.; UMAMAHESWARI, S. Sodicity tolerant polyembryonic mango root stock plants: A putative role of endophytic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 350–359, 2015.

KARASOV, T. L. et al. Mechanisms to Mitigate the Trade-Off between Growth and Defense. **The Plant Cell**, v. 29, n. 4, p. 666–680, 2017.

KEYS, C. J. et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 221–242, 1 set. 2004.

KHARE, E.; MISHRA, J.; ARORA, N. K. Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and Prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

KHIANNAM, S. et al. Isolation and screening of endophytic bacteria for hydrolytic enzymes from plant in mangrove forest at Pranburi, Prachuap Khiri Khan, Thailand. In: C, S.; C, L.; F, F. (Eds.). **Endophytes for plant protection: the state of the art. Proc 5th Int Symp Plant Protect Plant Health Europe**. Berlin: [s.n.]. p. 279–284.

KIELAK, A. M. et al. The Ecology of Acidobacteria : Moving beyond Genes and Genomes. v. 7, n. May, p. 1–16, 2016.

- KIM, Y.-E. et al. Metagenomic analysis of bacterial communities on Dokdo Island. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 65–74, 2014.
- KINDAICHI, T. et al. Phylogenetic diversity and ecophysiology of Candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge. n. October 2015, p. 1–11, 2016.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. **Ecology and Epidemiology**, v. 71, n. 6, p. 642–644, 1981.
- KLUEPFEL, D. A. The Behavior and Tracking of Bacteria in the Rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, n. 1, p. 441–472, 2003.
- KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 426–435, 2011.
- KÕIVID, V. et al. Endophytic bacterial communities in peels and pulp of five root vegetables. 2019.
- KRECHEL, A. et al. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 772–786, 2002.
- KRIEG, N. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology. V. 4. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae and Planctomycetes. Second.** 2. ed. New York: Springer, 2010.
- KRIKORIAN, A. . Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. (Eds.). . **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.** [s.l: s.n.]. p. 41–77.
- KUMAR, S. et al. Draft Genome Sequence of *Streptomyces gancidicus* Strain BKS 13-15. **Genome Announcements**, v. 1, n. 2, p. 1–2, 2013.
- KY, C. L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 223–230, 2001.
- LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. **Bacteria in agrobiología: Crop productivity.** [s.l: s.n.].
- LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by

Endophytes. p. 231–256, 2014.

LACAVA, P. T.; MELO, I. S.; PEREIRA, J. O. . Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.). . **Bioteconologia Microbiana Ambiental**. 1. ed. Maringá: Eduem, 2018. p. 83–104.

LEBUHN, M.; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, v. 629, p. 255–266, 1993.

LEONARDO INIGUEZ, A. et al. Regulation of Enteric Endophytic Bacterial Colonization by Plant Defenses. / **169 MPMI**, v. 18, n. 2, p. 169–178, 2005.

LI, J. et al. Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 75–87, 2015.

LI, Z. et al. Biosynthesis of rare hexoses using microorganisms and related enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 2434–2445, 2013.

LIMA BOHNER, T. O.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O Impacto Ambiental Do Uso De Agrotóxicos No Meio Ambiente E Na Saúde Dos Trabalhadores Rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, p. 329, 2013.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 267–298.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583–606, 2002.

LOPES, F. da atividade antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glandulosa* e de fungos endofíticos a ela relacionados. **Fcfar.Unesp.Br**, 2008.

LÓPEZ-VALDEZ, F. et al. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 499–505, 2011.

LOYOLA-VARGAS, V. M. et al. Somatic Embryogenesis in *Coffea* spp. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). . **Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 241–266.

LOZANO, G. L. et al. Bacterial analogs of plant tetrahydropyridine alkaloids mediate

microbial interactions in a rhizosphere model system. **Applied and Environmental Microbiology**, 2019.

LUCINI, F.; PUTZKE, J. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM *Handroanthus chrysotrichus* (IPÊ AMARELO – BIGNONIACEAE) CULTIVADAS NOS MUNICÍPIOS DE SANTA CRUZ DO SUL E VENÂNCIO AIRES - RS. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**, v. 27, n. 1, p. 49–55, 2015.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541–546, 2009.

LUPATINI, M. et al. Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–13, 2017.

LUZ, B. D. DA S. 1 et al. Bioprospecção De Microrganismos Produtores De Enzimas De Interesse Industrial Realizada No Parque Estadual Serra Do Ouro Branco, Brasil Bioprospecting Microorganisms Enzymes Producers of Industrial Interest Held on Serra Do Ouro Branco State Park, Brazil. **Interbio**, v. 10, p. 14–24, 2016.

LUZ, J. S. et al. Atividade Enzimática De Fungos Endofíticos E Efeito Na Promoção Do Crescimento De Mudanças De Maracujazeiro-Amarelo Enzymatic Activity of Endophytic Fungi and Effect of Growth Promotion of Yellow Passion. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 128–134, 2006.

MACHADO, P. C. **Identificação molecular e caracterização bioquímica de bactérias endofíticas associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com potencial biotecnológico.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015.

MADHAIYAN, M. et al. Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated Enterobacter species. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013.

MANIKANDAN, M.; HUA, P. Y.; WU, H. F. Rapid endophytic bacterial detection by enzyme incorporated MALDI MS. **RSC Advances**, v. 4, n. 91, p. 50233–50240, 2014.

MAPA, M. DA A. P. E A. -. **No Title.**

MAPA, M. DA A. P. E A. **Fixação Biológica do Nitrogênio.**

MARAG, P. S.; SUMAN, A.; GOND, S. Prospecting Endophytic Bacterial Colonization and their Potential Plant Growth Promoting Attributes in Hybrid Maize (*Zea mays* L .). v. 7, n.

03, p. 1292–1304, 2018.

MARCINKEVICIUS, K. et al. Phytochemical investigation and biological activities of *Fusarium SP.* An entomogenous fungus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, n. February, p. 101084, 2019.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369–409, 1993.

MARTINS, A. L. **História do café**. 2. ed. São Paulo: Contexto, 2012.

MATOS, A. D. M. et al. Phosphate Solubilization by Endophytic Bacteria isolated from *Oryza sativa*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 6, n. 10, p. 2713–2721, 2017.

MATTHUS, E. et al. Phosphate Starvation Alters Abiotic-Stress-Induced Cytosolic Free Calcium Increases in Roots 1[OPEN]. 1991.

MAUGERI, G. et al. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 1, 2019.

MCINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337–342, 1995.

MCKINLEY, V. L. **Effects of Land Use and Restoration on Soil Microbial Communities**. [s.l: s.n.].

MEHDIPOUR-MOGHADDAM, M. J. et al. Novel phytase and cellulase activities in endophytic azospirilla. **World Applied Sciences Journal**, v. 10, n. 10, p. 1129–1135, 2010.

MEHNAZ, S.; MALIK, K. A. MICROBIAL DIVERSITY AND METAGENOMIC ANALYSIS OF THE RHIZOSPHERE OF PARA GRASS (*UROCHLOAMUTICA*) GROWING UNDER SALINE CONDITIONS. v. 48, n. 2, p. 779–791, 2016.

MÉLO-FILHO, L. R.; GUENTHER, M. Induced systemic resistance as a sustainable alternative to agricultural pesticides [A resistência sistêmica induzida como alternativa sustentável ao uso de agrotóxicos]. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 8, p. 27–38, 2015.

- MENDES, L. W. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, v. 70, p. 255–265, 2015.
- MENDES, L. W. et al. Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. **Nature Publishing Group**, p. 1–13, 2017.
- MENECHINE, A. K. **ANÁLISE METAGENÔMICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS DE SOLO E**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2016.
- MESQUITA, C. M. DE et al. **Manual do café: distúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro (Coffea arabica L.)**. EMATER-MG ed. Belo Horizonte: [s.n.].
- MEYER, F. et al. Assessing taxonomic metagenome profilers with OPAL. **Genome Biology**, v. 20, n. 51, p. 1–10, 2019.
- MILIUTE, I. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance : a review. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 465–478, 2015.
- MINOTTO, E. et al. **ENZYME CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM TOMATO PLANTS** *Journal of Advanced Scientific Research*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.sciensage.info/jasr>>. Acesso em: 16 abr. 2019a.
- MINOTTO, E. et al. Enzyme Characterization of Endophytic Actinobacteria. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 2, p. 16–23, 2014b.
- MIRANDA, J. C. **Doenças em cultivo orgânico do cafeeiro (Coffea arabica L.): Epidemiologia e controle alternativo**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2007.
- MISAGHI, I. J. Endophytic Bacteria in Symptom-Free Cotton Plants. **Phytopathology**, v. 80, n. 9, p. 808, 1990.
- MOLINA-MONTENEGRO, M. A. et al. Metagenomic exploration of soils microbial communities associated to Antarctic vascular plants. **PeerJ Preprints**, 2018.
- MONTEIRO, L. C. P. **Diversidade microbiana na rizosfera de plantas em competição**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- MOREIRA, C. F. **Caracterização de sistemas de café orgânico sombreado e a pleno sol no Sul de MG**. [s.l.: s.n.].
- MOREIRA, F. M. DE S. et al. Diazotrophic associative bacteria: Diversity, ecology and

potential applications | Bact?rias diazotr?ficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplica??es. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. In: UFLA (Ed.). . **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: [s.n.], p. 407–447.

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, n. 2, p. 195–203, 2000.

MURRAY, P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1626–1630, 1 nov. 2010.

NARULA, N.; KOTHE, E.; BEHL, R. K. Role of root exudates in plant-microbe interactions. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 82, n. 2, p. 122–130, 2009.

NAVARRETE, A. A. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 3, p. 607–621, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: [s.n.].

NESME, J. et al. Back to the Future of Soil Metagenomics Edited by : v. 7, n. February, p. 1–5, 2016.

NETO, D. P. DE C. et al. High-Throughput rRNA Gene Sequencing Reveals High and Complex Bacterial Diversity Associated with Brazilian Coffee Bean Fermentation. **Food Technology & Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 90–95, 2017.

NEWMAN, M. M. et al. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. **Science of the Total Environment**, v. 543, p. 155–160, 2016.

NIELSEN, S. et al. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 191, p. 73–82, jun. 2014.

NIGAM, P. S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597–611, 2013.

NOGUEIRA, C. H. et al. **Reduto do café orgânico**. [s.l: s.n.].

- NOVELLO, G. et al. The Rhizosphere Bacterial Microbiota of *Vitis vinifera* cv . Pinot Noir in an Integrated Pest Management Vineyard. v. 8, n. August, p. 1–11, 2017.
- OAKLEY, B. B. et al. The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 360, n. 2, p. 100–112, 2014.
- OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015.
- OLIVEIRA, M. N. V. et al. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil . **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 221–230, 2013.
- OLIVEIRA, R. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. **Mycosphere**, v. 5, n. 4, p. 523–530, 2014.
- OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C. et al. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological Research**, v. 208, p. 25–31, 1 mar. 2018.
- OUBAHA, B. et al. The potential of antagonistic moroccan *Streptomyces* isolates for the biological control of damping-off disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Aphanomyces euteiches*. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 2, p. 82–90, 2019.
- PAIM, T. G. D. S. et al. Desempenho da metodologia por MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram-positivos isolados na cidade de Porto Alegre / RS , Brasil. **Journal of Infection Control**, v. 2, n. 2, p. 112–116, 2013.
- PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1–25, 2006.
- PAMPHILE, J. A. et al. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EXTRAÍDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS: O CASO DO *Colletotrichum* sp. BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF SECONDARY METABOLITES EXTRACTED FROM ENDOPHYTIC FUNGI: THE CASE OF *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, v. 53, n. 1, p. 113–119, 2017.
- PARIKH, S. J.; JAMES, B. R. Soil: The Foundation of Agriculture. **Nature Education Knowledge**, v. 3, 2012.

- PARNELL, J. J. et al. From the Lab to the Farm : An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. v. 7, n. August, p. 1–12, 2016.
- PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R. DE; ABREU, M. S. DE. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1129–1132, 2009.
- PASSOS, J. F. M. DOS. **Diversidade De Bactérias Cultiváveis Em Pomares De Macieiras Sob Diferentes Tipos De Manejo E Obtenção De Clones Metagenômicos Indutores De Resistência Sistêmica Induzida Nessa Cultor**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
- PATIL, N. B. et al. Optimization of Indole 3 - acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 2, n. 1, p. 295–302, 2011.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207–20, mar. 1996.
- PAVLO, A. et al. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, v. 56, n. 1, p. 43–49, 2011.
- PAZ, I. C. et al. Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 4, p. 3711–3720, 2012.
- PEIXOTO, B. M. **Classificação de sequencias e análise de diversidade em metagenômica**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- PEIXOTO NETO ET AL. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 70–84, 2003.
- PELZER, G. Q. et al. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. v. 36, n. April, p. 95–103, 2011a.
- PELZER, G. Q. et al. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 95–103, 2011b.
- PEREIRA, F. D. E. S. et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces. **Microbial Pathogenesis**, v. 86, p. 32–37, 2015.

PEREIRA, I. S. et al. HISTOLOGIA DE RAMOS DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L .) COM MANCHA MANTEIGOSA CAUSADA POR *Colletotrichum* spp . **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, v. 1, p. 1–5, 2005.

PEREIRA, P. et al. Field Studies on the Relationship between *Fusarium verticillioides* and Maize (*Zea mays* L.): Effect of Biocontrol Agents on Fungal Infection and Toxin Content of Grains at Harvest . **International Journal of Agronomy**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

PEREIRA, R. M. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 439–447, 2006.

PÉREZ, M. M. et al. Fungal Lipases: Versatile Tools for White Biotechnology. In: [s.l: s.n.]. p. 361–404.

PERNEZNY, K. et al. Guidelines for Identification and Management of Plant Disease Problems : Part II . Diagnosing Plant Diseases Caused by Fungi , Bacteria and Viruses 1. p. 1–8, 2017.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1797–1803, 2013.

POPPE, L. et al. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an effective antagonist against postharvest pathogens on fruits. **Bulletin OILB/SROP**, v. 11, p. 963–973, 2002.

POSADA, F. et al. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 748–757, 2007.

POTRIKUS, C. J.; BREZNAK, J. A. Nitrogen-Fixing Enterobacter agglomerans Isolated from Guts of Wood-Eating Termites¹. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 33, n. 2, p. 392–399, 1977.

PRASAD, M. P.; DAGAR, S. Original Research Article Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 3, n. 8, p. 937–947, 2014.

PREECE, C. et al. Effects of past and current drought on the composition and diversity of soil microbial communities. 2019.

PROCÓPIO, R. E. L. et al. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1408–1422, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: Editora da Universidade de Santa Cruz do Sul, 2002.

QIN, S. et al. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. **Applied Soil Ecology**, v. 93, p. 47–55, 2015.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W.; BENHAMOU, N. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 577–582, 1997a.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W.; BENHAMOU, N. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 577–582, 1997b.

QUECINE, M. C. et al. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7511–7518, 2012.

QUECINE, M. C.; BATISTA, B. D.; LACAVALA, P. T. Diversity and Biotechnological Potential of Plant-Associated Endophytic Bacteria. In: **Plant Biotechnology**. [s.l.: s.n.]. p. 377–423.

RAIJ, B. VAN. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: [s.n.].

RAMOS, M. R. et al. Vegetable production under the organic system effects on soil physical attributes. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 58, n. 1, p. 45–51, 2015.

RAMPELOTTO, P. H. et al. Changes in Diversity, Abundance, and Structure of Soil Bacterial Communities in Brazilian Savanna Under Different Land Use Systems. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 3, p. 593–607, 2013.

RANA, K. L. **NITROGEN FIXING ENDOPHYTIC MICROBES FROM CEREAL CROPS AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS**. [s.l.] Eternal University, 2016.

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 217–224, 2012.

- RATH, M.; MITCHELL, T. R.; GOLD, S. E. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, v. 208, n. August 2017, p. 76–84, 2018.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 29–54, 1998.
- REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. DOS S. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 931–949, 2015.
- REITER, B. et al. Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 68, n. 5, p. 2261–2268, 2002.
- RICCI ET AL, M. DOS S. F. **Cultivo orgânico do café: Recomendações técnicas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.
- RICCI, M. DOS S. F. et al. Cultivo orgânico de diferentes cultivares de café (*Coffea arabica*) a pleno sol e sombreado. n. 1, p. 1–5, 2004.
- RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Functional Plant Biology**, v. 28, p. 829–836, 2001.
- RISTOK, C. et al. **Plant species richness elicits changes in the metabolome of grassland species via soil biotic legacy**. [s.l: s.n.].
- ROMERO, F. M. et al. A Bacterial Endophyte from Apoplast Fluids Protects Canola Plants from Different Phytopathogens via Antibiosis and Induction of Host Resistance. **Phytopathology**, v. 109, p. 375–383, 2019.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. / **827 MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.
- ROZANOV, A. S. et al. Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia). **BMC Genomics**, v. 15, n. Suppl 12, p. 1–15, 2014.
- RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2008.

- SAAD, M. M. G.; GHAREEB, R. Y.; SAEED, A. A. The potential of endophytic fungi as bio-control agents against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 1, 2019.
- SAEEDI SARAVI, S. S.; SHOKRZADEH, M. Role of Pesticides in Human Life in the Modern Age: A Review. **Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits**, 2012.
- SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. v. 2011, p. 1–30, 2011.
- SAITO, K. et al. TANGO1 Facilitates Cargo Loading at Endoplasmic Reticulum Exit Sites. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 891–902, 2009.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, 1987.
- SALEEM, M. et al. Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. **Rhizosphere**, v. 6, n. March, p. 47–51, 2018.
- SANTOS, C. C. R. DOS et al. Isolamento de *Gluconacetobacter* spp. em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 85–92, 2006.
- SANTOS, M. L. DOS et al. Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1–11, 2018.
- SANTOS, T. M. A. DOS. **DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A FRUTOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- SANTOS, P. E. DE LOS; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790–2798, 2001.
- SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.
- SAUER, S. et al. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. e2843, 30 jul. 2008.
- SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2010.

SAXENA, S. et al. Characterisation of caecum and crop microbiota of Indian indigenous chicken targeting multiple hypervariable regions within 16S rRNA gene. **British Poultry Science**, v. 57, n. 3, p. 381–389, 2016.

SCHLESNER, H.; HIRSCH, P. Rejection of the Genus Name *Pirella* for Pear-Shaped Budding Bacteria and Proposal to Create the Genus *Pirellula* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 441–441, 1987.

SCHLESNER, H.; STACKEBRANDT, E. Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family *Planctomycetaceae* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 174–176, 1986.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, p. 661–686, 2005.

SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. DE; LACAVA, P. T. Diversity and benefits of microorganisms from the tropics. In: AZEVEDO, J. L. DE; QUECINE, M. C. (Eds.). . **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. 37–56.

SEGHERS, D. et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1475–82, mar. 2004.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 239–249, 2004.

SHARMA, A. et al. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP 3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). [s.d.].

SHEN, F. T. et al. Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 4, 2019.

SHIOMI, H. F. et al. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 32–39, 2006.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515–521, 2000.

SILVA, C. DE F. et al. Soil Microbiological Activity and Productivity of Maize Fodder With

- Legumes and Manure Doses. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4, p. 882–890, 2018a.
- SILVA, C. F. et al. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 951–957, 2008.
- SILVA, T. R. DA et al. Caracterização Molecular e Capacidade de Promoção do Crescimento Vegetal de Bactérias Diazotróficas Isoladas do Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Anais da XII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido**, p. 305–311, 2017.
- SILVA, H. DO N. E. **PODE UM FERTILIZANTE CONTENDO MANANOLIGOSSACARÍDEO DERIVADO DE *Saccharomyces* TOMATEIRO EM CULTIVO PARA PROCESSAMENTO INDUSTRIAL?** [s.l.] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2018.
- SILVA, H. S. A. et al. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v. 63, n. 1, p. 62–67, 2012a.
- SILVA, H. S. A. et al. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v. 63, n. 1, p. 62–67, 2012b.
- SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de micro-organismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.).** [s.l.] Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2015.
- SILVA, M. C. S. et al. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 16–22, 2016.
- SILVA, N. I. D. E. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, n. xxxx, 2018b.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189–196, 2007.
- SILVEIRA, É. L. DA. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Campus” de Jaboticabal, 2008.

- SINGH, I. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions : a review. v. 8, n. 4, p. 191–213, 2018.
- SINGH, V. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, n. 2, p. 96–102, 2015.
- SINISCALCHI, L. A. B. et al. Enriquecimento de microrganismos metanotróficos a partir de lodo de reator UASB tratando esgotos domésticos. p. 109–122, 2016.
- SOARES, A. C. F. et al. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 40, n. 4, p. 447–453, 2010.
- SOARES, M. A. et al. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). **Plant and Soil**, v. 405, n. 1–2, p. 107–123, 22 ago. 2016.
- SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of Agrarian Science**, n. May 2017, p. 0–1, 2018.
- SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. D. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11–18, 2007.
- SOUZA, F. DE F. ET AL. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA, 2004.
- SOUZA, J. L.; GUIMARÃES, G. P.; FAVARATO, L. F. Desenvolvimento de hortaliças e atributos do solo com adubação verde e compostos orgânicos sob níveis de N. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 19–26, 2015.
- STALEY, J. T. Budding bacteria of the *Pasteuria-Blastobacter* group. **Journal of Microbiology**, v. 19, p. 609–614, 1973.
- STARR, E. P. et al. Stable isotope informed genome-resolved metagenomics reveals that *Saccharibacteria* carbon. p. 1–12, 2018.
- STEARNS, S. C. Trade-offs in life-history evolution. **Functional Ecology**, v. 3, n. 3, p. 259–268, 1989.
- STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. J. F. An overview of endophytic microbes:

endophytism defined. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Eds.). . **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 3–30.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

STURZ, A. V. et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 1, p. 13–19, 1997.

SUBRAMANIAM, G.; ARUMUGAM, S.; RAJENDRAN, V. Plant growth promoting actinobacteria: A new avenue for enhancing the productivity and soil fertility of grain legumes. **Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes**, n. 147, p. 1–298, 2016.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2014.

SZOBOSZLAY, M.; WHITE-MONSANT, A.; MOE, L. A. The Effect of Root Exudate 7 , 4 0 - Dihydroxyflavone and Naringenin on Soil Bacterial Community Structure. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2016.

TAIZ, L. .; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TAO, G.-C. et al. Phosphate-Solubilizing and-Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. **Pedosphere**, v. 18, n. 4, p. 515–523, 2008.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. [s.l: s.n.].

TEYMOURI, M. et al. Assessment of phosphate solubilization activity of Rhizobacteria in mangrove forest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 168–172, 2016.

THAKURIA, D. et al. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v. 86, n. 7, p. 978–985, 2004.

- THEODORO. Desempenho do manejo orgânico na nutrição e produtividade de lavoura cafeeira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 5, p. 631–638, 2007.
- THEODORO, V. C. DE A. et al. Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 147–153, 2009.
- THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, p. 3, 2012.
- TIAN, B.; CAO, Y.; ZHANG, K. Metagenomic insights into communities , functions of endophytes , and their associates with infection by root-knot nematode , *Meloidogyne incognita* ., **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–15, 2015.
- TILMAN, D. Constraints and Tradeoffs: Toward a Predictive Theory of Competition and Succession. **Oikos**, v. 58, n. 1, p. 3–15, 1990.
- TIRYAKI, D.; AYDIN, İ.; ATICI, Ö. Psychrotolerant bacteria isolated from the leaf apoplast of cold-adapted wild plants improve the cold resistance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under low temperature. **Cryobiology**, v. 86, p. 111–119, fev. 2019.
- VAL-MORAES, S. P. et al. Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 1997–2003, 2011.
- VALARINI, P. J. et al. Qualidade do solo em sistemas de produção de hortaliças orgânico e convencional. **Horti**, v. 29, p. 485–491, 2011.
- VALVERDE, R.; GULLO, S.; PE, R. Looking for Rhizobacterial Ecological Indicators in Agricultural Soils Using 16S rRNA metagenomic Amplicon Data. p. 1–18, 2016.
- VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, n. 1, p. 7–17, 1996.
- VAN RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: [s.n.].
- VEGA, F. E. et al. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 371–380, 2005.
- VEGA, F. E. et al. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 72–82, 2008.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and

colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127–141, 2001.

VERMA, V. C.; GANGE, A. C. **Advances in Endophytic Research**. New Delhi: Springer, 2014.

VIEIRA, B. S. et al. POTENCIAL ANTAGONÍSTICO DE *Bacillus subtilis* (BSV-05) CONTRA OS PATÓGENOS RADICULARES DO FEIJOEIRO: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. **Ciência Agrícola**, v. 14, n. 1, p. 59–66, 2016.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: An EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95–108, 2006.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1128–1135, 2010.

VITULO, N. et al. Bark and Grape Microbiome of *Vitis vinifera*: Influence of Geographic Patterns and Agronomic Management on Bacterial Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2019.

WAGNER, B. L. et al. Colonization of Corn,. **Society**, v. 66, n. 8, p. 3468–3473, 2000.

WAGNER, M.; HORN, M. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 241–249, 2006.

WALIA, A. et al. Endophytic bacteria: Role in Phosphate solubilization. In: MAHESHWARI, D. K.; ANNAPURNA, K. (Eds.). . **Endophytes: Crop Productivity and Protection**. Haryana: Springer International Publishing, 2017. v. 16p. 61–93.

WALLACE, J. G.; MAY, G. **Endophytes: The Other Maize Genome**. [s.l: s.n.].

WALTERS, W. A. et al. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. 2018.

WANG, C. et al. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 1, p. 409–420, 2019a.

WANG, W. et al. Consistent responses of the microbial community structure to organic

farming along the middle and lower reaches of the Yangtze River. **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–11, 2016.

WANG, X.-X. et al. Maize varieties can strengthen positive plant-soil feedback through beneficial arbuscular mycorrhizal fungal mutualists. **Mycorrhiza**, n. 2017, p. 1–11, 2019b.

WANG, Z. et al. Changes in rhizosphere microbial communities in potted cucumber seedlings treated with syringic acid. p. 1–16, 2018.

WEIH, M. Trade-offs in plants and the prospects for breeding using modern biotechnology. **New Phytologist**, v. 158, n. 1, p. 7–9, 2003.

WEILE, J.; KNABBE, C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 731–742, 2009.

WHITE, J. F. et al. A proposed mechanism for nitrogen acquisition by grass seedlings through oxidation of symbiotic bacteria. **Symbiosis**, v. 57, n. 3, p. 161–171, 5 jul. 2012.

WHITE, J. F. et al. Hydrogen peroxide staining to visualize intracellular bacterial infections of seedling root cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 8, p. 566–573, ago. 2014.

WHITE, J. F. et al. **Evidence for Widespread Microbivory of Endophytic Bacteria in Roots of Vascular Plants Through Oxidative Degradation in Root Cell Periplasmic Spaces**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

WHITTAKER, R. H. New Concepts of Kingdoms of Organisms. **Science**, v. 163, p. 150–160, 1969.

WILLIAMSON, L. C. et al. **Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis 1**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.plantphysiol.org>. Acesso em: 9 abr. 2019.

WOESE, C. R.; KANDLERT, O.; WHEELIS, M. L. **Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya (Euryarchaeota/Crenarchaeota/kingdom/evolution)**Proc. **Nati. Acad. Sci. USA**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/pnas/87/12/4576.full.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2019.

WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification

using exact alignments. **Genome Biology**, v. 15, p. 1–12, 2014.

WRIGLEY, G. *Coffea arabica* L. In: **Coffee**. London: Longman, 1988. p. 2–4.

XIA, Y. et al. Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1233–1237, 2005.

YU, L. et al. Effects of competition and phosphorus fertilization on leaf and root traits of late-successional conifers *Abies fabri* and *Picea brachytyla*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 162, p. 14–24, jun. 2019.

ZAIDI, A. et al. *Scientia Horticulturae* Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables : Current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231–239, 2015.

ZAMBOLIM, L. Doenças do cafeeiro. **Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas Cultivadas**, n. Figura 1, p. 193–213, 2016.

ZAMBUDIO, S.; FERREIRA, A. L. Fixação Biológica de Nitrogênio. **XXI Ciência para a Vida**, v. 1, p. 10–15, 2012.

ZHANG, J. et al. Grape berry surface bacterial microbiome: impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 204–214, 2019a.

ZHANG, S. J. et al. Following Coffee Production from Cherries to Cup: Microbiological and Metabolomic Analysis of Wet Processing of *Coffea arabica* . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 6, 2019b.

ZHANG, Y. et al. Community structure and elevational diversity patterns of soil Acidobacteria. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 26, n. 8, p. 1717–1724, 2014.

ZHANG, Y. J. et al. Speed versus endurance tradeoff in plants: Leaves with higher photosynthetic rates show stronger seasonal declines. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–9, 2017.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 269–278, 2018.

ZHOU, J. et al. Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. v. 68, n. 1, p. 326–334, 2008.

ZHOU, Z. et al. Soil Microbial Community Structure Shifts Induced by Biochar and Biochar-Based Fertilizer Amendment to Karst Calcareous Soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants † Downloaded from. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

ZOHARA, F. et al. Inhibitory effects of *Pseudomonas* spp. on plant pathogen *Phytophthora capsici* in vitro and in planta. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 69–77, 2016.