

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARISTELA BOACEFF CIRAULO

INTERAÇÕES ENTRE ENDÓFITOS DE *COFFEA ARABICA*
ISOLADOS DE CULTURAS ASSINTOMÁTICA E
SINTOMÁTICA PARA A ATROFIA DOS RAMOS DE
CAFEEIRO CAUSADA POR *XYLELLA FASTIDIOSA*

MOGI DAS CRUZES, SP
2011

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARISTELA BOACEFF CIRAULO

INTERAÇÕES ENTRE ENDÓFITOS DE *COFFEA ARABICA*
ISOLADOS DE CULTURAS ASSINTOMÁTICA E
SINTOMÁTICA PARA A ATROFIA DOS RAMOS DE
CAFEEIRO CAUSADA POR *XYLELLA FASTIDIOSA*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia aplicada a recursos naturais e agronegócios

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO

Mogi das Cruzes, SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Ciraulo, Maristela Boaceff

Interações entre endófitos de *Coffea arabica* isolados de culturas assintomática e sintomática para a atrofia dos ramos de cafeeiro causada por *Xylella fastidiosa* / Maristela Boaceff Ciraulo. – 2011.

149 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2011

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

1. *Xylella fastidiosa* 2. Cafeeiro 3. Bactérias e fungos endofíticos 4. ARC I. Azevedo, João Lúcio de

CDD 632.96

ATA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas do dia vinte e quatro de fevereiro de dois mil e onze, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese "Interações entre endófitos de *Coffea arabica* isolados de culturas assintomática e sintomática para a Atrofia dos Ramos de Cafeeiro, causada por *Xylella fastidiosa*" para obtenção do grau de Doutora pelo(a) candidato(a) **Maristela Boaceff Ciraulo**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 72 (setenta e dois), a saber: 36 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da Tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Doutor(a). A Comissão Examinadora foi constituída pelos Senhores Professores Doutores João Lúcio de Azevedo e Sérgio Olavo Pinto da Costa da Universidade de São Paulo, Ernesto Acosta Martinez da Universidade de Mogi das Cruzes, Paulo Teixeira Lacava da Universidade Federal de Alfenas e Léia Cecília Lima Fávaro da Embrapa Agroenergia sob a presidência do primeiro, como orientador do(a) aluno(a). A Sessão Pública da defesa da Tese foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as argüições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir, a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 24 de fevereiro de 2011.

Comissão Examinadora

Julgamento

[Assinatura]
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]
Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]
Prof. Dr. Ernesto Acosta Martinez

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]
Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]
Profª Drª Léia Cecília Lima Fávaro

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

A Deus,

pela proteção, por eleger-me e capacitar-me.

À minha mãe **Laura Boaceff Ciraulo**, que acompanhou todos os meus dias de estudo, orgulhava-se de todas as minhas vitórias e não está mais aqui para ver a conclusão de tudo.

Ao meu pai **Antonino Ciraulo** por toda dedicação, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo** todo o meu agradecimento e admiração pelo ensinamento, orientação, atitude, motivação, confiança e exemplo de vida.

Ao **Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo** pela orientação e exemplo profissional que muito contribuiu para o meu conhecimento e aperfeiçoamento profissional.

Ao **Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava** pelo acompanhamento e auxílio para concretização deste trabalho.

À **Prof^a Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner** e a **todos os colegas** do Laboratório de Genética de Micro-organismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”- ESALQ-USP pelo apoio, ajuda e disponibilidade para a realização de parte deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luiz R. Nunes** e à **Prof^a. Dr^a Regina Lucia Batista Costa de Oliveira** pelos primeiros ensinamentos na área científica e pelo auxílio constante.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, **Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, Dr. Antonio Carlos Fávero Caires, Dr. Ernesto Acosta Martinez, Dr^a Leia Cecília Lima Fávaro, Dr. Paulo Teixeira Lacava e Dr. Sergio Olavo Pinto da Costa**, pelas sugestões e colaborações.

Ao Centro de Café Alcides Carvalho - Instituto Agronômico de Campinas (IAC), especialmente à bióloga **Masako Toma Braghini** e ao **Dr. Luiz Carlos Fazuoli**, pela disponibilização de plantas de *Coffea arabica*.

À **Dr^a Flávia Rodrigues Alves Patrício** do Instituto Biológico em Campinas, pela disponibilização das linhagens de *Pseudomonas syringae*, utilizada no presente trabalho.

À **Dr^a Maria Caroline Quecine** pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Aos grandes amigos de laboratório **Aline, Almir, Carol Bertini, Carol Melo, Emy, Felipe, Fernanda Caraviere, Fernanda Storte, Gabriela, Juliana, Dr^a Léia, Luciana, Manu, Marie, Marília e Silvia**, pela ajuda, amizade, estudo e por fazerem parte da minha vida.

Ao grande amigo **Almir** pelo auxílio, companherismo e grande amizade. São pessoas como você que fazem a diferença.

Aos grandes amigos **Felipe, Deibs e Daiane** pelo incentivo, auxílio e amizade valiosa.

À amiga **Dr^a Maria Cristina Pires de Brum** pelas horas de estudo, amizade e momentos de descontração.

Ao meu noivo **Walmir Abdão Amui** pela paciência e apoio durante todo o percurso.

Aos meus irmãos **Antonio Boaceff Ciraulo e Solange De Matteo Ciraulo, Margarete Boaceff Ciraulo Duarte e Carlos Humberto Martins Duarte** pela suas presenças, sempre me apoiando e aos meus sobrinhos **Marco, Caio, Letícia, Andressa e Augusto** pelo amor e por me trazer tantas alegrias.

As grandes amigas **Marlene e Lúcia** pelos conselhos, amizade e encorajamento que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal.

À toda **equipe da pós graduação da Universidade de Mogi das Cruzes** pelo auxílio sempre que necessário.

RESUMO

Atrofia dos Ramos de Cafeeiro (ARC) é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a qual coloniza os vasos do xilema de uma ampla variedade de espécies vegetais. Diferentes isolados deste fitopatógeno têm sido associados ao desenvolvimento de patogênese em espécies de plantas com significativa importância econômica em toda a América. Esta bactéria está disseminada em todas as áreas produtivas de cafeeiros do Estado de São Paulo e em outros estados brasileiros. Foi observado que algumas plantas convivem com *X. fastidiosa* em seus vasos xilemáticos, sem apresentarem sintomas da doença. Tendo em vista que estas plantas são geneticamente idênticas às plantas afetadas, uma possível explicação para a resistência à ARC pode estar na diversidade da comunidade endofítica presente na planta hospedeira. Dentro deste contexto, este trabalho teve como principal objetivo isolar e caracterizar a comunidade endofítica bacteriana e fúngica de *Coffea arabica*, cultivar Bourbon Amarelo em culturas assintomática e sintomática para a ARC e avaliar a interação entre a comunidade endofítica do cafeeiro e *X. fastidiosa*. Da comunidade microbiana isolada, foram coletados aleatoriamente 105 isolados bacterianos de ramos e 181 isolados fúngicos de ramos e folhas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo, de plantas sintomáticas e assintomáticas para ARC. Por meio do sequenciamento do 16S rRNA, foi observado que a comunidade bacteriana endofítica do cafeeiro é composta por pelo menos 23 gêneros, sendo observada relação entre os sintomas da ARC e a frequência de isolados dos gêneros *Escherichia*, *Microbacterium*, *Rhizobium* e *Xanthomonas*. Em contraste, *Cronobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, tiveram a sua frequência associada às plantas assintomáticas. A análise das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA e sua comparação com o banco de dados do *GenBank*, permitiu observar que a comunidade fúngica do cafeeiro é composta por pelo menos 22 gêneros, entre eles os gêneros *Corioloopsis*, *Cyttaria*, *Lecythophora*, *Peniophora*, *Phellinus*, *Pezicula*, e *Valsaria*, os quais foram descritos pela primeira vez como isolados endofíticos de plantas do gênero *Coffea*. Dentre os isolados, o gênero *Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) foi o mais frequentemente associado às plantas assintomáticas e *Fusarium* (Teleomorfo *Gibberella*) o gênero mais frequente em plantas sintomáticas. O perfil da comunidade endofítica mostrou uma frequência de gêneros distintos entre plantas sintomática e assintomática para ARC, sugerindo que o desenvolvimento da ARC pode estar associado à variação na diversidade desta comunidade endofítica. Além disto, experimentos para avaliar a produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos isolados fúngicos e teste de solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos mostraram que vários endófitos produzem agentes antimicrobianos e também são solubilizadores de fosfato. Em todos os testes, o isolado endofítico de ramos de *C. arabica* assintomática para ARC, identificado por P39, com similaridade para *Fomes meliae*, apresentou forte reação inibitória, capaz de inibir fortemente o crescimento de bactérias gram positivas e gram negativas, e a levedura patogênica humana *C. albicans*. Os resultados obtidos poderão fornecer subsídios para o controle da doença provocada por *X. fastidiosa* no cafeeiro.

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*/ cafeeiro/ bactérias e fungos endofíticos/ ARC.

ABSTRACT

Coffee Stem Atrophy (ARC) is caused by *Xylella fastidiosa*, which colonizes the xylem vessels of a wide variety of plant species. Different strains of this pathogen have been associated with the development of pathogenesis in plant species with significant economic importance around the America. This bacterium is widespread in all areas of coffee production in the State of São Paulo and other Brazilian states. It was observed that some plants live with *X. fastidiosa* in their xylem, without showing symptoms of the disease. Considering that these plants are genetically identical to the affected plants, a possible explanation for this tolerance to ARC may be due to the diversity of the endophytic community in host plants. Therefore, the objectives of the present study were to isolate and characterize the bacterial and fungal endophytic community of *Coffea arabica* cv Yellow Bourbon cultures in symptomatic and asymptomatic to ARC and to evaluate the interaction between the endophytic community of coffee plants and *X. fastidiosa*. A total of, 105 bacterial endophytes isolated from branches and 181 fungal endophytes from leaves and branches of *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo were selected from ARC symptomatic and asymptomatic plants. The bacterial isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing allowing to observe that the endophytic bacterial community from coffee is composed by at least 23 genera, being observed the relationship between symptoms of ARC and the frequency of isolated genera: *Escherichia*, *Microbacterium*, *Rhizobium* and *Xanthomonas*. In contrast, *Cronobacter*, *Pantoea* and *Pseudomonas* were frequently associated with asymptomatic plants. Analysis of the sequences rRNA region ITS1-5.8S-ITS2 rRNA and its comparison with the GenBank database, showed that the fungal community of coffee plants is composed by at least 22 genera, such as *Corioloopsis*, *Cyttaria*, *Lecythophora*, *Peniophora*, , *Phellinus*, *Pezicula* e *Valsaria* which were first described as endophytes from plants of the genus *Coffea*. Among the isolates, the genus *Trichoderma* (*Hypocrea* Teleomorph) was the more frequent endophytic fungus associated with symptomless plants, while *Fusarium* (*Gibberella* Teleomorph) was more frequent in symptomatic plants. The profile of the endophytic community showed that the frequency of some microbial groups is different between symptomatic and asymptomatic plants, suggesting that the development of ARC could be associated to variation in this endophytic communities, which could interact actively with *X. fastidiosa*. In addition, experiments to evaluate the production of compounds with antimicrobial activity by the fungal isolates and testing of phosphate solubilization by bacterial isolates showed that endophytes produce antimicrobial agents and are also solubilizers of phosphate. Furthermore, experiments to evaluate the production of compounds with antimicrobial activity by the isolated fungal were conducted. In all tests, the endophytic identified as P39, with similarity to *Fomes melia*, showed strong inhibitory reaction, able to inhibit strongly the growth of gram positive and gram negative bacteria as well the human pathogenic yeast *C. albicans*. The obtained results may supply information about the control the diseases caused by *X. fastidiosa*.

Keywords: *Xylella fastidiosa*/ coffee plants/ endophytic fungi and bacteria/ ARC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Aspectos de ramos e folhas, com e sem sintomas aparentes da doença ARC em plantas de <i>Coffea arabica</i> cv. Bourbon Amarelo.....	20
Figura 02	Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo com primers CVC-1 e 272-2-int, específicos para <i>X. fastidiosa</i>	51
Figura 03	Árvore fenética dos isolados fúngicos de plantas sintomática e assintomática para ARC.....	65
Figura 04	Dendograma baseado na similaridade por meio do índice de <i>C. Jaccard</i> para a sequência da região ITS1–5,8S–ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos endofíticos.....	66
Figura 05	Análise de rarefação das UTOs correspondentes das comunidades fúngicas isoladas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo.....	67
Figura 06	Curva de rarefação das UTOs correspondentes as comunidades fúngicas isoladas.....	68
Figura 07	Diagrama de Venn representando cálculos de UTOs compartilhados e exclusivos de isolados fúngicos de folhas e ramos de plantas sintomática e assintomática para ARC.....	70
Figura 08	<i>Heatmap</i> apresentando relação entre UTOs e o número de sequências fúngicas correspondentes.....	71
Figura 09	Diversidade de gêneros de fungos endofíticos isoladas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	77
Figura 10	Frequências de gêneros bacterianos observados no primeiro e segundo isolamentos de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo.....	81
Figura 11	Árvore fenética dos isolados de plantas sintomática e assintomática para ARC.....	89

Figura 12	Análise de rarefação mostrando o número esperado de UTOs correspondentes das diferentes populações bacterianas, para os níveis de similaridade 100%, 97%, 95% e 90% entre as sequências.....	92
Figura 13	Diagrama de Venn representando cálculos de UTOs compartilhados e exclusivos de isolados bacterianos de plantas sintomática e assintomática para ARC.....	94
Figura 14	<i>Heatmap</i> apresentando relação entre UTOs e o número de sequências bacterianas correspondentes.....	95
Figura 15	Diversidade de gêneros de bactérias endofíticas isoladas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	97
Figura 16	Formação de halo de degradação indicativo do fósforo previamente na forma insolúvel por isolados bacterianos de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo.	102
Figura 17	Halos de inibição provocados pela produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos isolados endofíticos.....	106
Figura 18	Árvore fenética consenso do isolado P39, <i>Fomes</i> sp. e grupos próximos, demonstrando a relação entre os grupos.....	107
Figura 19	Aspectos morfológicos de <i>F. meliae</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Identificação dos códigos de fungos endofíticos isolados de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo.....	39
Tabela 02	Valores de frequência de infecção (F.I.) de fungos endofíticos isolados de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo, em plantas assintomática e sintomática para ARC, parte da planta e as diversas condições de isolamento dos fungos (meio de cultura e temperatura).....	53
Tabela 03	Identificação molecular dos isolados fúngicos de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	55
Tabela 04	Isolados fúngicos de plantas do gênero <i>Coffea</i>	63
Tabela 05	Índices de riqueza (<i>Chao</i> e <i>Ace</i>) obtidos a partir da análise das sequências da região ITS1-5,8-ITS2 do rRNA dos grupos de isolados fúngicos associados à <i>C. arabica</i> correspondentes aos diferentes tratamentos, nas diferentes similaridades consideradas.	73
Tabela 06	Índices de diversidade (<i>Shannon-Wiener</i> e <i>Simpson</i>) obtidos a partir da análise das sequências da região ITS1-5,8-ITS2 do rRNA dos grupos de isolados fúngicos associados à <i>C. arabica</i> correspondentes aos diferentes tratamentos, nas diferentes similaridades consideradas.....	74
Tabela 07	Unidades Formadoras de Colônias de bactérias endofíticas por gramas de tecidos de ramos frescos isoladas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	80
Tabela 08	Identificação molecular dos isolados bacterianos de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	83
Tabela 09	Isolados bacterianos de <i>Coffea</i> obtidos no presente trabalho e já descritos anteriormente.....	90
Tabela 10	Índices de diversidade riqueza (<i>Ace</i> e <i>Bootstrap</i>) e de diversidade (<i>Shannon-Wiener</i> e <i>Simpson</i>) obtidos a partir da análise das sequências da região 968 - 1401pb do gene rRNA dos grupos de isolados bacterianos.....	93

Tabela 11	Índices de solubilização de fosfato por bactérias endofíticas do cafeeiro.....	104
Tabela 12	Frequência de gêneros de fungos endofíticos isoladas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em folhas e ramos de plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	136
Tabela 13	Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo pelo método de difusão em ágar.....	138
Tabela 14	Sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos M06 e N43 que apresentaram similaridades com Meruliaceae sp.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Monofosfato de adenosina
ARC	Atrofia dos Ramos de Cafeeiro
Assint	Assintomática
BD	Meio líquido batata - dextrose
BDA	Meio batata - dextrose - Agar
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos Ambiental e Industrial
CEIB	Central do Instituto Biológico em Campinas
CIAGRO	Centro Integrado de Informações Agropecuárias
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CVC	Clorose Variegada dos Citros
DAUFPE	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
DDD	Dicloro Difenil Dicloroetano
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DIBA	<i>Dot Immunobinding Assay</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DSF	Fator de Sinal Difusível
DVPAD	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
dTTP	2' - desoxitimidina 5' - trifosfato
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético.
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligada à Enzima

ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
FI	Frequência de Infecção
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
ITS	Espaçador interno transcrito
ITOL	<i>Interactive tree of life</i>
NA	Nutriente ágar
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PD	<i>Pierce's Disease</i> (Doença de Pierce)
PEG	Polietileno glicol
RDP	<i>Ribosomal Data Project</i>
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
rpf	Fator regulador de patogenicidade
rpm	Rotações por minuto
SAS	<i>Statistical Analysis Systems</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIMO	<i>Sapelo Island Microbial Observatory</i>
Sint	Sintomática
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Solução de Tris (10mM) e EDTA (1mM)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSA	Meio ágar triptona de soja
TSB	Meio líquido triptona de soja
UTOs	Unidades Taxonômicas Operacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 <i>Xylella fastidiosa</i> como o agente causal da Atrofia dos Ramos de Cafeeiro.....	18
1.2 Micro- organismos endofíticos.....	25
1.2.1 Interações endófito-planta hospedeira.....	26
1.2.2 Micro-organismos endofíticos e sua ocorrência.....	29
1.2.3 Micro-organismos endofíticos associados às plantas de café.....	31
1.3 Aplicações biotecnológicas dos endófitos no controle de fitopatógenos.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos gerais.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 MÉTODO.....	36
3.1 Material vegetal.....	36
3.2 Desinfecção superficial.....	36
3.3 Identificação de <i>X. fastidiosa</i> em tecidos vegetais.....	37
3.4 Isolamento de fungos endofíticos de <i>C. arabica</i>	38
3.5 Isolamento de bactérias endofíticas de <i>C. arabica</i>	40
3.6 Caracterização molecular.....	41
3.7 Identificação de isolados.....	43
3.8 Bactérias solubilizadoras de fosfato.....	44
3.9 Coeficiente de similaridade.....	45
3.10 Análise estatística de diversidade, riqueza e rarefação.....	45
3.10.1 Análise de variância.....	46
3.11 Experimentos de antibiose.....	47
3.11.1 Produção de compostos com atividade antimicrobiana por fungos.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Identificação de <i>X. fastidiosa</i> em tecidos vegetais.....	49
4.2 Isolamento e caracterização de fungos. endofíticos.....	52
4.2.1 Correlação da diversidade da comunidade fúngica endofítica isolada de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo com o aparecimento de sintomas da ARC.....	75

4.3 Caracterização da comunidade de bactérias.....	79
4.3.1 Correlação das comunidades bacterianas endofíticas isoladas de <i>C. arabica</i> cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.....	95
4.4 Fungos endofíticos produtores de antimicrobianos.....	104
5 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICES.....	135

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a cafeicultura tem grande destaque no cenário agrícola e econômico, visto que o país é líder na produção de café, com uma participação de 30 a 40% no mercado mundial. Só em 2010, a produção brasileira foi estimada em 48,1 milhões de sacas de café (CONAB, 2010). O café está entre as cinco mais valiosas exportações agrícolas de países em desenvolvimento, emprega 25 milhões de pessoas em todo o mundo, e é cultivado em muitas das regiões com maior nível de biodiversidade (RICKETTS *et al.*, 2004). Cerca de 70% da produção mundial de café é oriunda de cultivares de *Coffea arabica*, sendo praticamente a mesma proporção, 76,6%, observada no Brasil (CONAB, 2010). A espécie é nativa de uma região restrita e marginal às demais espécies do gênero, localizada no Sudoeste da Etiópia, Sudeste do Sudão e Norte do Quênia, entre 1.000 e 3.000 metros de altitude (CARVALHO, 1989). As cultivares de *C. arabica* são bastante aparentadas e em grande maioria, derivam-se das cultivares Típica, originalmente introduzida no Brasil em 1727 e Bourbon Vermelho, oriunda da ilha de mesmo nome (ANTHONY *et al.*, 2001). Embora a base genética da espécie seja bastante estreita (BERTHAUD; CHARRIER, 1988), as cultivares comercializadas apresentam grande variabilidade botânica oriunda de uma série de mutações e de cruzamentos naturais e artificiais (KRUG *et al.*, 1940a).

O cafeeiro tem sido alvo de várias doenças, que o atingem em diversas fases de crescimento, desde a sementeira até a fase adulta. A ferrugem (*Hemileia vastatrix*), a cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), a mancha-de-Phoma (*Phoma* spp.) e a mancha areolar (*Pseudomonas syringae*) destacam-se como as mais prevalentes nos cafezais e são sinônimos de prejuízo e inquietação por parte dos cafeicultores (SCHIEBER; ZENTMYER, 1984). A Atrofia dos Ramos de Cafeeiro (ARC) é causada pela bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* (ROSSETI *et al.*, 1990; LIMA *et al.*, 1995; BERETTA *et al.*, 1996; BRLANSKY; HARTUNG, 2002), a qual que tem sido associada a doenças de inúmeras culturas agrícolas de grande importância econômica.

1.1 *Xylella fastidiosa* como o agente causal da Atrofia dos Ramos de Cafeeiro

Os primeiros relatos sobre *X. fastidiosa* datam de 1973, quando uma bactéria semelhante às bactérias da família Ricktsiaceae foi associada ao mal de Pierce (PIERCE, 1982). Bactérias da espécie *X. fastidiosa* foram inicialmente associadas a membros da família Ricktsiaceae devido a similaridades na morfologia, na ultra-estrutura da célula bacteriana e nos seus requisitos nutricionais (HOPKINS; MOLLENHAUER, 1973). Esta bactéria só foi cultivada axenicamente pela primeira vez em 1978, quando estudos com seu DNA revelaram uma composição diferente do grupo das Ricktsiaceae, caracterizando-a como pertencente a um grupo taxonômico diferente, passando então a ser chamada de bactéria limitada ao xilema (CHEN *et al.*, 1992). Foi verificado que o DNA de *X. fastidiosa* apresenta o conteúdo de guanina mais citosina entre 49,5 e 53,1 % (WELLS *et al.*, 1987), enquanto que para a rickettsia *Rochalimaea quintana* esses valores estão em torno de 38,5 % (DAVIS *et al.*, 1981). Além disto, estudos de homologia de DNA revelaram que a relação entre *X. fastidiosa* e espécies da família Ricktsiaceae foi de somente 2%. Em decorrência destes fatores, em 1987, Wells sugeriu a criação de um novo gênero: *Xylella*, o qual possui apenas a espécie *Xylella fastidiosa*.

X. fastidiosa é uma bactéria limitada ao xilema que, depois de instalada na planta, se multiplica e obstrui os vasos responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a parte aérea da planta. Esta bactéria é um bastonete gram-negativo, aflagelada, apigmentada, não formadora de esporos, podendo atingir o tamanho de 0,25 a 3,5µm X 0,9 a 3,5 µm. O crescimento ótimo da bactéria ocorre em pH 6,5-6,9 e a temperaturas de 26-28°C (HOPKINS; MOLLENHAUER, 1973; WELLS *et al.*, 1987). Temperaturas na faixa de 28°C a 30°C também foram relatadas como ótimas para isolados de videiras (FEIL; PURCEL, 2001). O tempo de duplicação desta bactéria, em laboratório, é dependente do meio, sendo a média entre 10 e 48 horas (WELLS *et al.*, 1987).

A bactéria se desenvolve no interior dos vasos xilemáticos de várias espécies vegetais, podendo ser encontrada em cerca de uma centena de espécies (FREITAG, 1951) incluindo 28 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas, estando associada ao desenvolvimento de patologias em espécies de significativa importância econômica em diferentes regiões, sobretudo nas Américas (HOPKINS; PURCELL, 2002). Como exemplos de plantas

hospedeiras de *X. fastidiosa*, podem ser citados: citros, cafeeiro, videira, ameixeira, amoreira, pereira, amendoeira, olmo, figueira, carvalho, alfafa, tabaco e também, plantas ornamentais (COLETTA-FILHO *et al.*, 2001). Também foram descritos diversos hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa* como o capim carrapicho (*Cenchrus echinatus*), capim favorito (*Rhynchelitrum repens*), capim pé de galinha (*Eleusine indica*), vinca (*Catharanthus roseus*), grama seda (*Cynodon dactylon*), poaia branca (*Rhichardia brasiliensis*), entre outras (DONADIO; MOREIRA, 1997). Desta forma, diferentes isolados de *X. fastidiosa* já foram implicados no desenvolvimento de Clorose Variegada dos Citros (CVC) em citros, Doença de Pierce (PD) em videiras, Escaldadura Foliar em ameixeiras, Atrofia dos Ramos de Cafeeiro (ARC) em cafeeiros e outras fitopatogênias (HOPKINS, 1989; PURCELL *et al.*, 1979; PURCELL; HOPKINS, 1996; PARADELA FILHO *et al.*, 1996).

No cafeeiro, *X. fastidiosa* foi relatada pela primeira vez em 1995, no estado de São Paulo, afetando plantas de cafezais das regiões de Macaúbal e São José do Rio Preto (PARADELA FILHO *et al.*, 1996). Após essa primeira constatação, a bactéria foi encontrada em associação ao cafeeiro nas principais regiões produtoras de café de outros estados, incluindo Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro (LEITE; NUNES, 2003). Além do Brasil, *X. fastidiosa* foi relatada em cafeeiros na Costa Rica causando a doença denominada crespeira (MONTERO-ASTÚA *et al.*, 2008).

Pesquisas confirmaram que a bactéria encontrada nos cafeeiros brasileiros era a mesma que causa a Clorose Variegada dos Citros (CVC), embora exista diferença genética entre os isolados (LIMA *et al.*, 1995). Estudos envolvendo as relações filogenéticas de estirpes de *X. fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros incluindo plantas de citros, café, videira, ameixa e pêra, foram inferidas pela análise da sequência do rRNA 16S e 16S-23S, sendo demonstrado que estirpes da bactéria presentes nas plantas de café, pêssago, ameixa e citros estão estreitamente relacionadas (MEHTA; ROSATO, 2001). Posteriormente, Almeida *et al.* (2008) constataram que isolados de *X. fastidiosa*, coletados de citros e café sintomáticas para a CVC e ARC, foram capazes de colonizar plantas de citros e café, respectivamente, mas não outro hospedeiro, indicando isolamento biológico entre as linhagens. Além disto, foi observada a falta de congruências entre árvores filogenéticas, indicando que a CVC e a ARC são causadas por duas estirpes biologicamente distintas de *X. fastidiosa* que divergiam geneticamente, mas são homogeneizadas por recombinações frequentes.

As plantas de café com sintomas externos da ARC têm encurtamento dos entrenós, diminuição no comprimento dos pecíolos e área foliar e senescência precoce das folhas mais maduras, resultando em comparação com plantas saudáveis, ramos com pequeno número de

folhas no seu ápice (Figura 01). Devido ao encurtamento dos pedicelos e dos entrenós, as flores e os frutos ficam agrupados e têm, também, redução no seu tamanho (PARADELA FILHO *et al.*, 1997; QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998).



Figura 01: Aspectos de ramos e folhas, com e sem sintomas aparentes da doença Atrofia dos Ramos de Cafeeiro (ARC) em plantas de *Coffea arabica* cv. Bourbon Amarelo. Em A e C observam-se plantas com sintomas aparentes da doença. Em B e D observam-se plantas sem sintomas da doença.

Internamente, ocorre deposição de "goma" nos vasos do xilema, assim como divisões anormais no mesófilo e no xilema, floema e córtex do pecíolo e do caule de ramos com sintomas externos severos de infecção. As células do mesófilo das folhas de cafeeiro afetadas também têm número reduzido de cloroplastos, o qual está associado à maior concentração de cristais de oxalato de cálcio (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998).

Segundo Paradelo Filho *et al.* (1997) há muitos anos, o cafeeiro vem apresentando sintomas de infecção por *X. fastidiosa*, que, entretanto, eram atribuídos a estresse nutricional. Esses autores consideram que, no Brasil, a bactéria foi disseminada do cafeeiro para as laranjeiras devido à presença da bactéria em cafeeiro de regiões onde não havia plantações de citros; além disto, foi observada similaridade dos vetores transmissores dessa bactéria e à presença da CVC em lavouras que sucederam a cultura cafeeira. Redak *et al.* (2004)

acreditam ainda que *X. fastidiosa* seja endêmica do continente americano por infectar diversas culturas exóticas, enquanto as nativas suportam a colonização da bactéria sem a presença dos sintomas.

Os pecíolos foliares de ameixeira, cafeeiro e laranja doce infectados com *X. fastidiosa* foram examinados através de microscopia eletrônica de varredura. Foi comparado o percentual de vasos colonizados com a severidade dos sintomas. O percentual de vasos colonizados em cafeeiro foi maior que nas outras duas espécies, sugerindo que o cafeeiro pode ser mais suscetível a colonização por *X. fastidiosa* (ALVES *et al.*, 2004).

A disseminação de *X. fastidiosa* para a planta hospedeira depende de insetos vetores, conhecidos popularmente como “cigarrinhas” sugadoras de seiva. Ao se alimentarem do xilema de árvores contaminadas, as “cigarrinhas” adquirem a bactéria, que no interior destes insetos se multiplica, formando agregados densos de células, anexos ao canal dos alimentos no pré-cibário e na válvula cibariana, além de se acumularem na parte anterior do tubo digestivo, o estomodéu (HILL; PURCELL, 1995). Ocorre o desprendimento dos agregados celulares para os estiletos e a bactéria é então transmitida para outras plantas saudáveis (HILL; PURCELL, 1995). Em videira, cigarrinhas adultas podem transmitir a bactéria logo após sua infecção e, devido à capacidade de multiplicação da bactéria no interior do vetor, continuam a transmitir pelo resto do ciclo de vida, a qual pode durar meses (PURCELL *et al.*, 1979; PURCELL; FINLAY, 1979).

Onze espécies de cigarrinhas pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae são comprovadamente capazes de transmitir a bactéria *X. fastidiosa* e, portanto, são responsáveis pela disseminação da bactéria em todas as regiões do país. Quatro espécies têm sido descritas como transmissoras de *X. fastidiosa* em cafeeiro: *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Homalodisca ignorata* e *Oncometopia facialis* (MARUCCI *et al.*, 2001; PAIÃO *et al.*, 2003). Mais tarde, o grau de infectividade natural por *X. fastidiosa* em cinco espécies de cigarrinhas Cicadellidae potencialmente transmissoras da bactéria para cafeeiro: *Acrogonia citrina*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis* e *Sonesimia grossa*, foi determinado em lavouras cafeeiras de cinco municípios das regiões Norte e Noroeste do Paraná (SILVA *et al.*, 2007).

Um dado importante é a existência de uma matriz extracelular no interior do aparelho bucal destes insetos com características físico-químicas similares à matriz que envolve células bacterianas nos vasos do xilema. Tanto em citros como em cafeeiro, a flutuação do crescimento da população desses insetos parece ser a mesma, ou seja, começa na primavera,

alcança picos máximos nos meses de verão e decresce nos meses de outono e inverno (PARADELA FILHO *et al.*, 1997).

Para que uma planta possa ser considerada hospedeira de *X. fastidiosa*, ela deve ser alvo dos vetores citados acima e manter uma alta densidade populacional desta bactéria, o que significa apresentar entre 10^7 a 10^9 bactérias vivas por grama de tecido (HOPKINS, 1985). Em citros, detecta-se a bactéria três meses após a inoculação, enquanto em mudas de cafeeiro é possível detectar a presença da bactéria, em viveiro a partir do quarto par de folhas (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998).

Vários procedimentos são utilizados para a detecção de *X. fastidiosa* em tecidos vegetais, como o Ensaio de Imunoabsorbância Ligada à Enzima (ELISA) (MONÉ *et al.*, 1980; RAJU *et al.*, 1983; HOPKINS; ADLERZ, 1988; SHERALD; LEI, 1991), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MINSAVAGE *et al.*, 1994; POOLER; HARTUNG, 1995), Isolamento em Meio de Cultura (DAVIS *et al.*, 1981; WELLS *et al.*, 1987; HOPKINS; ADLERZ, 1988; LEITE JR; LEITE, 1991; LEE *et al.*, 1993; HILL; PURCELL, 1995), Microscopia (HOPKINS; ADLERZ, 1988; ROSSETI *et al.*, 1990), *Dot Immunobinding Assay* (DIBA) (LEE *et al.*, 1992) e Imunocaptura Magnética (POOLER *et al.*, 1997). Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos em cafeeiro para maior conhecimento da relação patógeno - hospedeiro - vetor (LIMA *et al.*, 1996; QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998, 2004; 2005 a,b; MONTEIRO-ASTÚA *et al.*, 2008). A maioria desses estudos tem sido realizada com cultivares de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Yorinori *et al.* (2003) detectaram a presença da *X. fastidiosa* em sete espécies e quatro híbridos interespecíficos de *C. arabica*, por meio do teste sorológico de DAS-ELISA e de imunofluorescência indireta, apesar da ausência de sintomas externos de infecção nessas plantas. Esses autores detectaram a presença da *X. fastidiosa* em todas as amostras de *C. arabica*, entretanto, nas demais espécies de *Coffea*, os resultados nem sempre foram positivos. Em *C. racemosa* e *C. dewevrei* (sin. de *C. liberica* var. *dewevrei*) ocorriam menores proporções de plantas positivas a *X. fastidiosa*.

Nem todos os fatores que determinam o crescimento e a reprodução de *X. fastidiosa* em tecidos vegetais são conhecidos, porém a fisiologia da planta, nutrientes presentes no xilema e as condições climáticas são fatores importantes para o estabelecimento da bactéria na planta hospedeira (HILL; PURCELL, 1995).

As condições ambientais influenciam extremamente as interações plantas – micro-organismos e podem determinar o grau de predisposição do hospedeiro à infecção, agindo indireta ou diretamente sobre o patógeno e interferindo em sua sobrevivência de forma positiva ou negativa.

Apesar dos mecanismos exatos que levam ao aparecimento dos sintomas da doença ainda não serem conhecidos e algumas plantas portadoras serem assintomáticas (RAJU *et al.*, 1983), as doenças causadas por *X. fastidiosa* são caracterizadas, em geral, por um fenômeno de estresse hídrico sistêmico. Embora haja um fluxo ascendente de seiva nos vasos, a formação de biofilme, que liga as bactérias umas às outras e aos vasos do xilema, gomas e tiloses do hospedeiro, podem frear o deslocamento das células de *X. fastidiosa*, principalmente porque os diâmetros dos vasos do xilema não permitem que os agregados da bactéria circulem livremente (HOPKINS, 1989). Com exceção de alguns hospedeiros, *X. fastidiosa* pode ser considerada um patógeno fraco ou oportunista, sendo observado que algumas linhagens podem viver como residentes em vasos de xilema de plantas que não mostram sintomas da doença e, em caso de debilidade da planta causada por estresse, estas mesmas linhagens podem causar doenças. Os fatores relatados como causadores de estresse são: outras pragas ou doenças, deficiência mineral, corte de raízes durante o cultivo, superprodução, senescência da planta e, principalmente, deficiência hídrica. Folhas necrosadas por outros patógeno, especialmente pelo agente da antracnose, mostram uma quantidade maior de bactéria do que folhas que não apresentam tais necroses (GRIFFITHS *et al.*, 1971; CHEN, 2002). No entanto, somente estes fatores não poderiam responder por todos os sintomas, sugerindo que mecanismos adicionais seriam necessários para a manifestação da doença, que acabariam comprometendo o pleno desenvolvimento da planta (MC ELRONE *et al.*, 2003). Tais considerações concordam com Hopkins (1989), que observou em cultivares de *Vitis vinifera* que os sintomas de *X. fastidiosa* apareceram após um estresse de produção de frutos.

A interação *Xylella*-hospedeiro é muito complexa, havendo opiniões divergentes entre os autores. Em síntese, alguns autores consideram que a causa principal dessa doença está relacionada com a disfunção no sistema condutor de água devido às oclusões dos vasos do xilema por "gomas", tiloses ou células bacterianas (ESAU, 1948, MIRCETICH *et al.*, 1976 e MOLLENHAUER; HOPKINS, 1976); outros autores acreditam que essas obstruções são insuficientes para causar um estresse hídrico (FRENCH; STASSI, 1978; HOPKINS, 1981, QUEIROZ-VONTAN *et al.*, 2004). Outras três hipóteses para a origem dos sintomas da doença são a da fitotoxina (MIRCETICH *et al.*, 1976; LEE *et al.*, 1982); a do desbalanço de reguladores de crescimento (FRENCH; STASSI, 1978) que ocasionavam os sintomas na planta provocados pela bactéria e a terceira hipótese, sugere que a interação entre *X. fastidiosa* e bactérias endofíticas permitiriam contribuir para o surgimento de sintomas típicos da doença

em citros (ARAÚJO *et al.*, 2002b; LACAVA *et al.*, 2004; SANTOS, 2005; LACAVA *et al.*, 2006b; LACAVA *et al.*, 2007).

Estudo envolvendo o papel das fitotoxinas como sendo um dos fatores que contribuiriam para o não aparecimento dos sintomas da doença foi questionado, visto que em estudos com plantas sintomáticas e assintomáticas para Doença de Pierce em *Vitis vinifera* cv. Chardonnay um componente de baixo peso molecular semelhantes com a fitotoxina foi encontrado em plantas nas duas condições estudadas (GOODWIN *et al.*, 1988). Mais recentemente, estudos mostraram que a resistência à Doença de Pierce aparentemente não está relacionadas à presença de compostos inibitórios que circulam no xilema (BACCARI; LINDOW, 2011). Desta forma, em cafeeiros, citros e videira pode estar ocorrendo um sinergismo entre o desequilíbrio nutricional e a presença da bactéria e ou presença da bactéria e sua associação com micro-organismos endofíticos.

Foram estabelecidas hipóteses a respeito da interação entre bactérias endofíticas e *X. fastidiosa* suportadas por experimentos *in planta* e *in vitro* (ARAÚJO *et al.*, 2002b; LACAVA *et al.*, 2004; SANTOS, 2005; LACAVA *et al.*, 2006b; LACAVA *et al.*, 2007). Segundo os autores, a CVC poderia desempenhar um papel no estabelecimento de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira. Esta hipótese seria endossada pela análise da diversidade de *Methylobacterium* spp. pois este gênero foi o mais frequentemente isolado de plantas sintomáticas (ARAÚJO *et al.*, 2002b). Além disso, foi observado um efeito sinérgico de *Methylobacterium* spp. no crescimento de *X. fastidiosa* *in vitro* (LACAVA *et al.*, 2004, 2006a).

O controle do inseto transmissor e uso de mudas livres de contaminação se constituem nos meios mais usuais para evitar o alastramento para plantas ainda sadias. Além das técnicas já em uso, diversos trabalhos científicos convergem para a busca de mecanismos que bloqueiem a ação patogênica de *X. fastidiosa* (MIRCETICH *et al.*, 1976; FRENCH; STASSI, 1978; LEE *et al.*, 1982; ARAÚJO *et al.*, 2002b; DE SOUZA *et al.*, 2003; LACAVA *et al.*, 2004; ISHIDA *et al.*, 2004; SANTOS, 2005; LACAVA *et al.*, 2008; MONTEIRO-ASTÚA *et al.*, 2008; CIRAULO *et al.*, 2010). Até o momento, não existe um controle químico contra a bactéria, porém, o manejo adequado da lavoura tende a reduzir os efeitos de *X. fastidiosa* nos cafeeiros. Pode-se considerar que essa bactéria está disseminada por todas as regiões cafeeiras do estado de São Paulo e de outros estados brasileiros e, apesar do efeito e do prejuízo às lavouras não ter sido estimado, estudos sobre o controle dessa doença são essenciais para a cafeicultura.

1.2 Micro-organismos endofíticos

O termo micro-organismos endofíticos foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas. Quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas foi Bary (1866), a partir desta distinção, micro-organismos endofíticos foram considerados assintomáticos, ou seja, quaisquer micro-organismos que em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, colonizavam o interior de tecidos vegetais aéreos sem causar danos aparentes à planta hospedeira (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991).

Apenas no século XX, no fim dos anos 70, é que os micro-organismos endofíticos começaram a adquirir importância, quando foi verificado que eles apresentavam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (PETRINI, 1991).

Endófitos foram então considerados como micro-organismos isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente ou do interior destes, e que não causam danos aparentes à planta hospedeira (HALLMANN *et al.*, 1997). Ainda, os endófitos foram definidos como micro-organismos que habitam tecidos internos da planta sem causar qualquer efeito negativo imediato (BACON; WHITE, 2000). Porém, esta definição não foi considerada completa por excluir ou simplesmente omitir as populações microbianas não cultiváveis difíceis de sobreviver em condições de laboratório, e por isso pouco estudadas (ARAÚJO *et al.*, 2002a).

Uma definição de endófitos mais ampla diz que: micro-organismos endofíticos são todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) e que podem ou não desenvolver estruturas externas à planta, denominados Tipo II e Tipo I, respectivamente (MENDES; AZEVEDO, 2007). A distinção entre os endófitos do tipo I e do tipo II é o fato de que os primeiros residem completamente dentro do tecido vegetal, enquanto os do tipo II (micorrizas e bactérias nodulantes) colonizam o interior das raízes e crescem para a rizosfera. A importância desta divisão reside no fato de que os endófitos que não produzem estruturas externas terem sido até pouco tempo muito menos estudados que os fixadores simbióticos de nitrogênio e fungos micorrízicos; porém, é importante ressaltar que a classificação em micro-organismos endofíticos dos tipos I e II, micro-organismos endofíticos, epifíticos ou patógenos, tem uma

função meramente didática, pois entre endófitos, epífitos e patógenos existe um gradiente dinâmico (mutualismo-comensalismo-parasitismo) que é intrínseco à Biologia de forma geral.

Micro-organismos endofíticos do tipo I têm sido isolados praticamente de todas as espécies de plantas estudadas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Vários são os exemplos da aplicação de bactérias endofíticas na produção agrícola. Elas aumentam o crescimento do trigo por meio da produção de fitohormônios, aumentam a produção de arroz por meio do aumento da disponibilidade de minerais, aumentam a resistência de plantas de algodão às doenças, contribuem no manejo de pragas do milho, fixam nitrogênio no arroz e trigo e aumentam a formação de tubérculos de batata em condições de estresse de calor (BARBIERI *et al.*, 1986; BENSALIM *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1995; FAHEY *et al.*, 1991; MURTY; LADHA, 1988; WEBSTER *et al.*, 1997).

Zinniel *et al.* (2002) sugeriram que as bactérias endofíticas poderão ser utilizadas, futuramente, como produtoras de enzimas degradativas, para controlar doenças de plantas ou decompor produtos úteis.

Diversos estudos envolvendo fungos endofíticos têm merecido cada vez mais destaque (CARROLL, 1988; PETRINI, 1991; AZEVEDO *et al.*, 2000, REDMAN *et al.*, 2001; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) uma vez que, fungos endofíticos, constituem fontes promissoras de novos metabólicos e processos biotecnológicos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Nas relações mutualísticas, os fungos endofíticos podem inserir diversos benefícios as plantas como a tolerância à patógenos, à salinidade, à seca a metais pesados e aumento na aquisição de nutrientes (CARROL, 1986; READ, 1999; REDMAN *et al.*, 1999)

Ambientalmente, o uso de endófitos específicos pode ser preferível ao uso de fertilizantes químicos e aos de pesticidas, não somente devido ao menor custo, mas por contribuir com um sistema agrícola sustentável.

1.2.1 Interações endófito planta hospedeira

A interação entre plantas e micro-organismos vem sendo relatada há muito tempo e é considerada uma das estratégias mais bem sucedidas para a adaptação às diversidades do meio ambiente (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). Todas as partes da planta possuem micro-organismos endofíticos, existindo certo grau de especificidade endófito-hospedeiro (MELO *et*

al., 2002). A diversidade dentro de um determinado hospedeiro pode ser alta (CARROLL, 1995); comunidades de endófitos habitando certo hospedeiro particular podem ser amplamente distribuídas ou ter especificidade com determinado hospedeiro (CARROLL, 1988; PETRINI, 1996; STONE *et al.*, 2000; COHEN, 2004), sendo que o termo especificidade deve ser reservado para organismos que irão crescer somente em um hospedeiro (CARROLL, 1999; WAGNER; LEWIS, 2000; ZHOU; HYDE, 2001).

A entrada de micro-organismos endofíticos na planta se faz por várias vias, e uma das principais é por meio das raízes, por ferimentos causados pelo atrito com o solo durante o crescimento. A fase inicial da invasão de tecidos por bactérias é um processo altamente dependente do acaso. Apesar de a mobilidade de algumas espécies de bactérias estar garantida pela presença de flagelos (GOLDMAN *et al.*, 1986), estas usualmente invadem seu hospedeiro através de aberturas naturais e/ou ferimentos, de onde podem colonizar os espaços intercelulares. Algumas bactérias podem ser transmitidas diretamente para o interior de vasos condutores por insetos que se alimentam de seiva (QUADTHALLMANN *et al.*, 1997). A colonização tem início tão logo condições favoráveis sejam encontradas aliadas à ausência de reações por parte dos tecidos da planta (MINARD, 1995). Alguns fungos associados às plantas iniciam seu ciclo de vida com a germinação do esporo seguido do crescimento da hifa que invadem os tecidos do hospedeiro. A primeira etapa consiste na adesão à barreira representada, por exemplo, pela cutícula e o crescimento do tubo germinativo sobre essa superfície. A penetração de fungos endofíticos na planta pode ocorrer por aberturas naturais do hospedeiro como estômatos e hidatódios. Em seguida, o endófito pode se movimentar de forma passiva no interior no hospedeiro, pelo xilema (WAGNER; LEWIS, 2000). Diversas interações entre hospedeiros e micro-organismos são iniciadas pela detecção de sinais químicos liberados pelo hospedeiro. Os produtos liberados pela planta têm baixo peso molecular, são moléculas difusíveis e são reconhecidas pelos micro-organismos por meio de receptores específicos de proteínas (BRENCIC; WINANS, 2005). A detecção destes sinais leva à alteração nos padrões de expressão gênica do micro-organismo, que culmina em mudanças específicas e adaptativas na sua fisiologia e que são necessárias para estas associações (HAHLBROCK *et al.*, 2003). Em estudos envolvendo algodoeiros híbridos, realizados para examinar relações entre variação genética, fitoquímica da planta e endófitos fúngicos de ramo, os resultados demonstraram que o genótipo da planta pode albergar parceiros ecológicos escondidos (endofíticos), resultando em consequências para a comunidade e o ecossistema (BAILEY *et al.*, 2005).

Para penetrar nos seus hospedeiros, os endófitos podem viver como epífitos em uma parte do seu tempo; bem como, um micro-organismo endofítico, pode se tornar patógeno em uma planta em condições de estresse; e ainda, um epífito, eventualmente pode penetrar em uma planta. As interações ou simbioses estabelecidas pelos micro-organismos endofíticos podem ter as mais variadas características, tais como: mutualística, onde o endófito e o organismo associado obtêm vantagens na interação; neutra ou comensalística, onde o organismo associado não é afetado pela interação e antagonista ou parasítica, onde o organismo associado é comprometido pela interação (CARROLL; WICKLOW, 1992). Dessa forma, o status da interação planta-endófito pode ser transitório, sendo que o termo endófito deve ser empregado para micro-organismos que estão comportando-se endofiticamente no momento da detecção (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Associações mutualísticas com fungos endofíticos e plantas são fontes de estudos constantes e podem promover adaptações relacionadas ao ataques de insetos e animais herbívoros, capacidade de defesa da planta contra micro-organismos, contribuindo para controle de pragas na agricultura (AZEVEDO *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2001). Por exemplo, o fungo *Beauveria bassiana*, que tem sido reportado como endófito de milho (WAGNER; LEWIS; 2000), de batata e algodão (JONES, 1994), de cacau (EVANS *et al.*, 2003), de banana (AKELLO *et al.*, 2007) e de café (POSADA *et al.*, 2007; VEGA *et al.*, 2010), produz uma série de metabólitos e toxinas com ação contra insetos (VINING *et al.*, 1962; QUESADA-MORAGA; VEY, 2004).

Inclusive, em alguns casos espécies de plantas não são capazes de superar estresses ambientais na ausência desses simbioses (MÀRQUES *et al.*, 2007, REDMAN *et al.*, 2002, RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). A planta *Dichanthelium lanuginosum* quando interage com o fungo *Curvularia protuberata* é capaz de tolerar temperaturas próximas a 65°C, entretanto quando crescidos isoladamente, nem a planta e nem o fungo toleram temperaturas acima de 40°C (MÀRQUES *et al.*, 2007).

Fungos endofíticos também podem contribuir com o crescimento da planta por meio da produção de compostos que facilitam a absorção de nutrientes pela planta ou através da prevenção das perdas oriundas dos ataques por patógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; VARMA *et al.*, 1999). Alguns fungos da rizosfera são capazes de degradar compostos tóxicos, como xenobióticos e moléculas aromáticas, permitindo a sobrevivência das plantas em solos contaminados (HARVEY *et al.*, 2002).

Estudos envolvendo associações mutualísticas com bactérias endofíticas e plantas mostram que as bactérias exercem, no interior de seus hospedeiros, diversos atributos,

protegendo-os de ataque de insetos, herbívoros, patógenos, fixação biológica de nitrogênio, disponibilização de nutrientes e crescimento vegetal (AZEVEDO *et al.*, 2000).

1.2.2 Micro-organismos endofíticos e sua ocorrência

Todas as espécies vegetais estudadas até o momento apresentaram micro-organismos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003). Os estudos sobre endófitos se intensificaram no início dos anos 80 do século XX, e apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, os aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessas interações ainda necessitam serem esclarecidos. Na maioria dos casos, uma variedade enorme de gêneros e espécies endofíticas é observada, raramente constata-se uma especificidade endófito-hospedeiro, em que poucas espécies de organismos endófitos são encontradas (PEREIRA *et al.*, 1993; AZEVEDO, 1998). O conhecimento da diversidade desses organismos é de extrema importância, pois eles compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos (PROSSER *et al.*, 2007).

A ocorrência de endófitos varia bastante de acordo com o clima da região onde foi realizado o isolamento. A maioria dos estudos revela que a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado apresenta-se bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997).

Os endófitos podem colonizar os tecidos vegetais ocupando espaços intercelulares, o interior de tecidos vasculares ou mesmo intracelularmente. Segundo Araújo *et al.* (2002a), endófitos podem ser isolados dos mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, tais como pólen, ovários, anteras e estames. Entretanto, fungos e bactérias endofíticas parecem apresentar diferentes preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam. Fisher *et al.* (1992) isolaram bactérias e fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme e córtex do caule e folha) de plantas de milho saudáveis, e verificaram que as partes das plantas mais próximas ao solo eram mais colonizadas por bactérias que a parte superior das plantas. Já os fungos endofíticos, parecem colonizar preferencialmente as partes aéreas da planta hospedeira e os espaços intercelulares.

Diversas espécies vegetais tais como *Citrus sinensis* (ARAÚJO *et al.*, 2001), *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (SOUZA; ASTOLFI FILHO, 2004), *Dicksonia*

sellowiana (BARROS, 2003), *Bactris gasipaes* (ALMEIDA *et al.*, 2005), *Glicine max* (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2005), *Triticum aestivum* (LARRAN *et al.*, 2002); *Citrus limon* (DURAN *et al.*, 2005), *Coffea arabica* (VEGA *et al.*, 2005; VEGA *et al.*, 2010), entre outras, já tiveram a sua comunidade endofítica isolada e caracterizada.

Os principais ou mais frequentes grupos, gêneros e espécies de micro-organismos endofíticos têm sido descritos, dentre eles, os fungos predominam em número de trabalhos na literatura científica, seguidos de bactérias incluindo actinomicetos, não por isso menos importante (PETRINI, 1991; FISHER *et al.*, 1992; CHANWAY, 1996; HALLMANN *et al.*, 1997; RODRIGUES; PETRINI, 1997; AZEVEDO, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2000; STROBEL; DAISY, 2003).

O gênero *Colletotrichum* tem sido frequentemente isolado como endófito em uma grande variedade de espécies vegetais. Em estudos relacionados à diversidade fúngica de *Citrus* spp., Araújo *et al.* (2001) observaram maior abundância de micro-organismos dos gêneros *Colletotrichum*, *Guignardia* e *Cladosporium* entre os isolados endofíticos de folhas e porta-enxertos.

Em isolamento de fungos endofíticos de folhas, pseudocauls e rizomas de gengibre (*Amomum siamense*), coletados em dois locais na Tailândia, endófitos do gênero *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Xylaria* e *Phomopsis* foram os mais abundantes (BUSSABAN *et al.*, 2001).

Camatti-Sartori *et al.* (2008) isolaram fungos endofíticos de folhas, flores e frutos de macieiras (*Malus domestica*) no sul do Brasil, de três sistemas de cultivo diferentes, convencional, integrado e orgânico, durante dois ciclos vegetativos. O cultivo orgânico proporcionou um maior número de isolados quando comparado ao integrado e convencional, e os gêneros mais frequentes foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria*, entre os fungos filamentosos, e *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*, entre as leveduras.

Em estudo sobre a diversidade da comunidade de fungos endofíticos de plantas de cacau (*Theobroma cacao*) resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura da bruxa, os endófitos isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os autores identificaram ainda alguns endófitos potencialmente antagonistas, destacando-se *Gliocladium catenulatum*, que reduziu

em 70% a incidência da vassoura da bruxa *in vivo* em plântulas de cacaueteiro (RUBINI *et al.*, 2005).

1.2.3 Micro-organismos endofíticos associados às plantas de café

Os primeiros relatos da influência de fungos sobre a qualidade do café datam de 1940, quando Krug (1940a) verificou, com auxílio de uma lupa de bolso em amostras de cafés ardidos, a presença de um fungo de micélio avermelhado identificado inicialmente como do gênero *Fusarium*. A partir daí, na série de trabalhos denominada "A origem dos cafés duros", o autor procura relacionar a má qualidade da bebida à presença de fungos, principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (KRUG, 1940a, b, c). Em vários estudos foi sugerido que a boa qualidade de café do tipo mole e duro tenha relação com a presença de *Cladosporium* nos frutos (CARVALHO *et al.*, 1989; MEIRELLES, 1990; ALVES; CASTRO, 1998). Em duas localidades do município de Lavras, MG foi verificada a ocorrência de *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. em diferentes intensidades dependendo do estágio de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro. Maior frequência e intensidade de colonização por *Cladosporium* foram constatadas na área conhecida como produtora de café de boa qualidade (ALVES; CASTRO, 1998). Em outro estudo sobre a diversidade microbiana de cafés em diferentes estágios de maturação, realizado na região Sul de Minas Gerais, *Cladosporium* foi registrado com maior frequência (45,9%), seguido de *Fusarium* (38,8%), *Aspergillus* (2,2%) e *Penicillium* (13,1%), além dos gêneros *Monilia*, *Arthrobotrys* e *Beauveria* em proporções menores (SILVA, 2000).

Santamaria; Bayman (2005) compararam comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas com folhas de café (*C. arabica*) em Porto Rico. Foram isolados 821 micro-organismos agrupados em 131 morfoespécies. *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram os gêneros mais comuns entre os epifíticos, enquanto *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia* foram isolados com maior frequência entre os endófitos. *Guignardia* não foi isolado da superfície das plantas, apenas como endófito. Os autores observaram que fragmentos de folha com *Colletotrichum* são menos prováveis de conter *Xylaria* e *Guignardia* do que os tecidos sem *Colletotrichum*, sugerindo a possibilidade de competição ou antagonismo entre os

endófitos, ou seja, *Xylaria* pode estar restringindo o crescimento de *Colletotrichum*, importante patógeno de muitas plantas.

Mais recentemente, em estudo com 843 fungos endofíticos de folhas, raízes, caules e frutos de *C. arabica* cultivadas na Colômbia (32% dos isolados), Hawaí (46% dos isolados), México (13% dos isolados) e Porto Rico (9% dos isolados) foi verificada uma maior frequência de *Colletotrichum* (29,7%), *Fusarium* (20,9%), *Penicillium* (15,2%) e *Xylariaceae* (7,3%), sendo que 86% dos genótipos dos endofíticos isolados foram identificados como *Ascomycota* (VEGA *et al.*, 2010). Com relação a diversidade bacteriana, estudos de *C. arabica* cultivados na Colômbia, Hawaí e México mostraram que a comunidade bacteriana cultivável é composta pelos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cedecea*, *Chromobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, *Xanthomonas* e *Yersinia* (VEGA *et al.*, 2005).

Shiomi *et al.* (2006) isolaram bactérias endofíticas de folhas e ramos de *C. arabica* e *C. robusta* e avaliaram quanto ao potencial destas bactérias para o biocontrole da ferrugem do café, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Os autores verificaram que dos quarenta isolados testados, cinco foram eficientes em controlar ferrugem do cafeeiro, embora alguns isolados testados tenham aumentado a severidade da doença. Mais recentemente, foi observado aumento significativo da atividade de peroxidase em folhas de mudas do cafeeiro tratadas com as endófitas *Brevibacillus choshinensis* e *Cedecea davisae*, onde tanto o patógeno quanto as endófitas estavam ausentes, fornecendo fortes evidências de ter havido indução de resistência sistêmica (SILVA *et al.*, 2008).

1.3 Aplicações biotecnológicas dos endófitos no controle de fitopatógenos

A interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito danoso sobre o outro é conhecida por antibiose (BETTIOL; GHINI, 1995). A seleção de micro-organismos capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana é amplamente explorada para biocontrole. Dentre o universo de micro-organismos capazes de atuar antagonicamente destacam-se os endófitos. Capazes de colonizar os tecidos internos das plantas, conferindo-lhes uma vantagem ecológica sobre os micro-

organismos que colonizam as plantas epifiticamente, por exemplo, no sentido que são menos expostos às adversidades do ambiente. Além disso, os endófitos ocupam um habitat semelhante àqueles ocupados por patógenos; este fato lhes confere um grande potencial para o controle biológico (HALLMANN *et al.*, 1997). Sabe-se que diversos micro-organismos apresentam potencial antagônico a diferentes fitopatógenos, principalmente, fungos habitantes do solo, tais como isolados selvagens e melhorados de *Trichoderma* spp. (REIS *et al.*, 1999). O gênero *Trichoderma* é representado por fungos não patogênicos, que são habitantes do solo e que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose (KRUGNER; BACCHI, 1995), bem como, por hiperparasitismo (MELO; AZEVEDO, 2000). Vários outros exemplos de biocontroladores endofíticos são descritos na literatura, como o *Fusarium oxysporum*, patógeno de plantas de tomate, que pode ser controlado por linhagens endofíticas da mesma espécie (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007); o fungo patogênico *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa no cacau, pode ser controlado por linhagens endofíticas do fungo *Gliocladium catenulatum*, o qual demonstrou reduzir a incidência da vassoura de bruxa de cacau a 70% (RUBINI *et al.*, 2005); estudos relacionados ao biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* permitiram a seleção de antagonistas fúngicos eficazes no controle de *S. sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa, bem como, verificaram a interferência dos antagonistas no desenvolvimento vegetal (ETHUR *et al.*, 2005). Bactérias endofíticas isoladas de folhas e ramos de *C. arabica* e *C. robusta* quando avaliadas quanto ao seu potencial de biocontrole da ferrugem do café causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, foi verificado que alguns isolados foram eficientes em controlar a ferrugem do cafeeiro (SHIOMI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008). A avaliação por técnicas moleculares e microbiológicas da associação entre a comunidade bacteriana endofítica de *Citrus sinensis* (laranja natal) e a presença de plantas resistentes a CVC foi estudada por Araújo *et al.* (2002b). Os autores observaram que a bactéria endofítica *C. flaccumfaciens* foi isolada principalmente de plantas resistentes (assintomáticas ou escapes), enquanto que o gênero *Methylobacterium* foi isolado principalmente de plantas afetadas pela CVC. Pela primeira vez, foi cogitada a possibilidade do controle biológico da CVC.

Muitos micro-organismos endofíticos são capazes de sintetizar compostos bioativos, por meio do seu metabolismo secundário. Estes compostos são formados geralmente nas fases finais do crescimento, e podem ser utilizados pela planta na defesa contra fungos e bactérias fitopatogênicas. Aparentemente são substâncias não essenciais para o crescimento, e dentre outros produtos, podem ser antibióticos, metabólitos antifúngicos, auto – inibidores, pigmentos, toxinas, etc. Desta forma, o uso de micro-organismos endofíticos de diversos

hospedeiros vegetais no controle biológico de patógenos microbianos, insetos e nematóides, em culturas de importância econômica, têm sido amplamente estudados nos últimos 30 anos (HOITINK; BOEHM, 1999; AZEVEDO *et al.*, 2000). Com o acúmulo de informações a respeito da diversidade, modo de ação e biologia dos endófitos, pode-se vislumbrar um controle que minimize ou finalize os sintomas de doenças em plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais.

O objetivo geral deste trabalho foi o de estudar a diversidade de micro-organismos endofíticos de plantas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo assintomática e sintomática para a Atrofia dos Ramos de Cafeeiro (ARC), causada por *X. fastidiosa*, e verificar se existe correlação entre esta diversidade e os sintomas da ARC.

2.2 Objetivos específicos

- I. Isolamento da comunidade endofítica de fungos e bactérias do cafeeiro, *C. arabica*, cv. Bourbon Amarelo em cultura assintomática e sintomática para a ARC.
- II. Identificação e caracterização da diversidade genética de fungos e bactérias endofíticas de *C. arabica* por meio do sequenciamento do rRNA;
- III. Verificação da capacidade de produção de compostos antimicrobianos pelos isolados endofíticos.
- IV. Seleção de micro-organismos solubilizadores de fosfato, com potencial biotecnológico para controle de fitopatógenos.

3 MÉTODO

3.1 Material vegetal

No presente trabalho foram coletadas amostras de ramo e folha, com e sem sintomas aparentes da ARC de plantas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo cultivadas no Centro de Café Alcides Carvalho - Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em Campinas SP, localizado a 99,1 Km da cidade de São Paulo (latitude 22°54' S, longitude 47°05' W e altitude de 669 m). O clima em Campinas é do tipo Cwa, segundo a classificação climática de Koeppen que se baseia em dados mensais pluviométricos e termométricos. O tipo de clima Cwa é tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. As coletas foram realizadas, nos dias 4 de fevereiro de 2009 e 22 de julho de 2009, onde as médias climatológicas na data e local da coleta foram: temperatura máxima de 28,6°C, temperatura mínima de 17,9°C e índice pluviométrico de 4,5mm, em 4 de fevereiro e temperatura máxima de 24,7°C, temperatura mínima de 11°C e índice pluviométrico de 0 mm, em 22 de julho (CIAGRO- 2009).

As folhas e ramos foram coletados a aproximadamente 0,5 m do tronco principal e a 0,8 m de altura do solo, de *C. arabica*, cv. Bourbon Amarelo das culturas sintomáticas e assintomáticas para a ARC. O cafeeiro teve seu plantio realizado no mês de janeiro de 1947 e apresentam altura de 3 a 3,5 m. Para o isolamento de fungos foram utilizadas folhas e ramos de três plantas assintomáticas e três plantas sintomáticas de *C. arabica*, cv. Bourbon Amarelo para a ARC, provenientes da coleta realizada em fevereiro de 2009. Para o isolamento de bactérias foram analisados ramos de três plantas assintomáticas e três plantas sintomáticas provenientes das duas coletas realizadas em fevereiro e julho de 2009.

3.2 Desinfecção superficial

Para a eliminação de micro-organismos epifíticos, o material vegetal utilizado para o isolamento de bactérias e fungos foi submetido ao processo de desinfecção superficial no qual o material vegetal foi lavado em água corrente, em seguida foi realizada a imersão sucessiva

em etanol 70% (1min), solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl disponível) 2 min 30 seg, novamente em etanol 70% (30 seg) e finalmente enxaguado em água destilada esterilizada, por duas vezes. O tempo ideal de cada etapa foi determinado em testes preliminares pela modificação dos protocolos descritos por PETRINI (1996). O processo de desinfecção foi avaliado por meio da inoculação de 100µl da água utilizada na última etapa do processo em placas com meio batata - dextrose - ágar (BDA) para o controle negativo de fungos e TSA (*Tryptic Soy Agar*) 5% para o controle negativo de bactérias, seguido de incubação por até 14 dias a 28°C.

3.3 Identificação de *X. fastidiosa* em tecidos vegetais

A presença de *X. fastidiosa* em culturas sintomáticas e assintomáticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo para a ARC foi confirmada por meio da técnica da PCR, como descrito por Pooler; Hartung (1995). O material vegetal, utilizado para o isolamento de bactérias e fungos, foi desinfectado superficialmente (veja item 3.2), cortados em fragmentos de 4 - 6 mm (0,5g) e triturados. O DNA foi extraído com o Kit de extração de DNA Power- Soil (MO BIO laboratories, Inc.), segundo especificações do fabricante. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (1,0%).

A detecção de *X. fastidiosa* foi realizada com iniciadores ou *primers* CVC-1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAA-3') e 272-2-int (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCT-3'), específicos para *X. fastidiosa*, amplificado em um volume final de 50µL contendo 1µL (0,5 – 10,0 ng) de DNA total, 0,2µM de iniciadores ou *primers* CVC-1 e 272-2-int, 200µM de cada dNTP, 3,75mM de MgCl₂ e 0,05U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em 20mM de Tris-HCl contendo 50mM KCl (pH 8,4). Um controle negativo (Mix PCR sem DNA) foi incluído em todos os experimentos. As condições das reações foram as seguintes: 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min., anelamento em 62°C por 1 min e extensão do iniciador em 72°C por 1 min, seguido por um período final em 72°C por 10 min. A presença de uma banda de aproximadamente 500 pb indicou a presença de *X. fastidiosa* nos tecidos vegetais.

3.4 Isolamento de fungos endofíticos de *C. arabica*

Após desinfecção superficial, folhas e ramos de três plantas assintomáticas e três plantas sintomáticas foram cortados em fragmentos (4 - 6 mm) e colocados sobre os meios BDA 20% (Oxoid), BDA 10% (Oxoid) e ágar-água (Ágar Difco 15g, água destilada 1000 mL, pH 6,5), todos contendo 100 µg.mL⁻¹ de tetraciclina (para impedir o crescimento de bactérias) e incubados por 5 a 15 dias a 28°C e a 37°C. O tempo ideal de cada etapa foi determinado em testes preliminares pela modificação dos protocolos descritos por PEREIRA *et al.* (1993). Para cada planta foram usados três folhas e três ramos distintos. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Após crescimento, a determinação da frequência de infecção (FI) foi avaliada pela contagem do número de fragmentos apresentando crescimento fúngico em relação ao número total de fragmentos de tecido vegetal, segundo a equação abaixo.

$$FI = \frac{\text{Nº de fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{Nº total de fragmentos foliares}}$$

As extremidades hifais de micélios morfologicamente diferentes, que cresceram a partir de fragmentos de tecido vegetal, foram transferidas e subcultivadas em meio BDA 20% (Oxoid) para posterior identificação. Foi realizada uma pré - identificação dos isolados fúngicos do presente trabalho, onde os isolados foram classificados inicialmente por letras e números obedecendo aos critérios: isolamento da comunidade de fungos endofíticos obtidos de plantas sintomáticas e assintomáticas para a ARC, tipos de meios de cultura utilizados para isolamento (BDA 20%, BDA 10% e ágar-água) e a temperatura de incubação (28°C e 37°C), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 01. Identificação dos códigos de fungos endofíticos isolados de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo, distinguidos pelos fatores: isolados de plantas assintomáticas e sintomáticas para ARC, parte da planta e as diversas condições de isolamento dos fungos (meio de cultura e temperatura).

Parte da planta	Sintomas de ARC	Meio de cultura	Isolados	
			28°C.	37°C.
Folha	Assintomático	BDA (20%)	A	B
		BDA (10%)	C	D
		Ágar -água	E	F
	Sintomático	BDA (20%)	G	H
		BDA (10%)	I	J
		Ágar -água	L	M
Ramo	Assintomático	BDA (20%)	N	O
		BDA (10%)	P	Q
		Ágar -água	R	S
	Sintomático	BDA (20%)	T	U
		BDA (10%)	V	W
		Ágar -água	X	Z

Os fungos isolados nas etapas anteriores foram purificados pelo método de estrias de esgotamento, que consiste em coletar, um fragmento da extremidade da hifa e fazer estrias em meio sólido de cultura, este procedimento foi repetido três vezes para a obtenção de colônias puras. Os fungos endofíticos isolados foram armazenados em Óleo Mineral. O processo permite manter os micro-organismos por um período de pelo menos 4 anos (ARAÚJO *et al.*, 2002a). Neste processo com óleo mineral, após cada fungo ser purificado, ele foi inoculado com alça de platina em tubo contendo meio de cultura inclinado e após crescimento da colônia, óleo mineral (autoclavado) foi adicionado ao tubo até cobrir completamente o meio e o fungo endofítico, sendo então os tubos devidamente selados e guardados em estantes. Tubos e frascos com as amostras foram marcados com o código da amostra e data de armazenamento e mantidos à temperatura ambiente.

3.5 Isolamento de bactérias endofíticas de *C. arabica*

Após a desinfecção superficial do material vegetal, bactérias endofíticas de ramos foram isoladas por trituração. A liberação de células de bactérias endofíticas ocorreu por meio de trituração homogênea dos tecidos vegetais de *C. arabica*, cv. Bourbon Amarelo em solução tampão PBS (NaCl: 8,0g.L⁻¹, KCl: 0,2g.L⁻¹, Na₂HPO₄: 1,44g.L⁻¹ KH₂PO₄: 0,24g.L⁻¹ água destilada: 1000mL [pH 7,4]) na concentração de 1 g de tecido vegetal em 5mL da solução. Após a incubação por 1 h a 28°C, as suspensões foram diluídas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³), semeadas em meio TSA 5% (Oxoid) contendo 100 µg.mL⁻¹ do fungicida derosol (2-metoxicarbonilamino- benzimidazol) e incubadas por 6 a 14 dias a 28°C. Após crescimento, a determinação da concentração de bactérias por grama de tecido vegetal fresco foi calculada pelo número de colônias observado em cada diluição.

Foi realizada uma pré-identificação dos isolados bacterianos obtidos no presente trabalho, utilizando-se apenas números, sendo que os números 1 ao 72 referem-se as bactérias obtidas no primeiro isolamento e os números 73 ao 212 são relativos as bactérias obtidas no segundo isolamento.

As bactérias isoladas nas etapas anteriores foram purificadas e agrupadas com base nas características fenotípicas (morfologia das colônias, cor das colônias e tempo médio de crescimento). A purificação foi realizada pelo método de estrias de esgotamento, que consiste em fazer estrias no meio sólido, onde por esgotamento se obtém colônias isoladas no final das estrias (BROCK; MADIGAN, 1991). Placas contendo as estrias foram incubadas para se observar o crescimento bacteriano. O método foi repetido três vezes para a obtenção de colônias puras. Para armazenamento, as células bacterianas foram mantidas em agitação constante de 100 rpm, a 28°C, em um agitador orbital (TE-420, Tecnal) durante 1 a 3 dias, dependendo do tempo de crescimento da cada bactéria. Tubos com as amostras foram marcados com o código da amostra e data de armazenamento e mantidos em solução 20% de glicerol a -20°C. O processo permite manter os micro-organismos por um período de pelo menos dois anos (ARAÚJO *et al.*, 2002a).

3.6 Caracterização molecular

As células bacterianas cultivadas foram submetidas à extração de DNA como descrito por Araújo *et al.* (2002a). Bactérias endofíticas isoladas foram crescidas em 1,5mL de TSB 5% (Oxoid) e incubadas a 28° C em agitador orbital (TE-420, Tecnal) a 100 rpm, por 3 dias. Inicialmente, as culturas bacterianas foram centrifugadas (16.900g por 10 min) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi ressuscitado em 1mL de TE (TRIS 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e novamente centrifugado (6.770g por 5 min). Após o descarte do sobrenadante foi adicionado, para cada meio, 500 µL de TE e 30 µL de SDS 10%. Após a homogeneização, foram adicionados 500µL de fenol e centrifugado (12000g por 10min). A fase aquosa foi extraída com fenol-clorofórmio-álcool (25:24:1) e clorofórmio-álcool (24:1). O DNA precipitado por etanol 100% (5 minutos a temperatura ambiente) foi coletado por centrifugação (12000g por 10min). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuscitado em 50 µL de TE. A qualidade do DNA total foi analisada em gel de agarose 1% (1g de agarose dissolvidos em 100 mL Tampão Tris-Ácido acético-EDTA 1X) (Invitrogen) a 70V, juntamente com o marcador de peso molecular DNA “Ladder” 1Kb (Fermentas). Após eletroforese o gel foi corado por 15 - 20 min. em solução de brometo de etídio ($1,0 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$) e fotografado sobre luz U.V.

O DNA total de fungos isolados foi extraído segundo Raeder; Broda (1985). Para a extração de DNA, os fungos endofíticos isolados foram crescidos em meio BD (caldo de 200g de batata e 20g de dextrose em 1L de água, [pH 6,0]). Cada fungo foi inoculado em tubos contendo 3 mL de BD e incubados a 28°C por um período de aproximadamente 7 - 15 dias, dependendo do tempo de crescimento do fungo. A massa micelial formada foi então removida para um funil de porcelana contendo papel filtro, lavada por duas vezes com água destilada esterilizada. Após esse processo, a massa micelial foi retirada do papel com pinça e embalada em folha de alumínio, sendo discriminado o código da amostra, conservando-se em refrigerador a 4°C por um período de até 15 dias. O papel filtro e folhas de alumínio utilizadas foram previamente autoclavadas.

A massa micelial foi triturada em N₂ líquido e 2g do pó resultante foi ressuscitado em 2 mL de solução Tampão (Tris: 1M e pH 8.0; EDTA: 0,5M; NaCl: 5M; SDS 10% e H₂O MilliQ, [pH=8,0]) e conservada a -80°C . Estas suspensões foram incubadas a 65°C por 60 min. e centrifugadas (12000g por 10 minutos). A seguir, 800 µL de sobrenadante foram

transferidos para tubos tipo eppendorf de 2,0 mL contendo 800 µL de fenol. A mistura foi homogeneizada e centrifugada (12000g por 10 minutos). Após esse processo, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo eppendorf de 1,5mL e adicionado um volume de “Clorofane” (Fenol: Clorofórmio na proporção de 1:1). O material foi novamente homogeneizado e centrifugado (12000g por 10 minutos). Novamente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL, e adicionado um volume de “Clorofil” (Clorofórmio: Álcool isoamílico na proporção de 24:1 vol/vol). Mais uma vez o material foi homogeneizado e centrifugado (12000g por 10 minutos), o sobrenadante, mais uma vez, foi transferido para outro tubo de 1,5mL e foi adicionado a este 50µL de NaCl (5M) e etanol P.A. para completar um volume total de 1,5mL. Os tubos foram levemente agitados e mantidos por 60 minutos a -20°C, sendo posteriormente centrifugados (12000g por 3 minutos). O sobrenadante foi descartado e aos tubos foram acrescentados 200µL de álcool 70% para lavagem do DNA. Esse processo foi repetido mais uma vez e os tubos foram centrifugados (12000g por 3 minutos), o sobrenadante foi descartado, o DNA foi seco 4°C por 12 horas e ressuspensionado em 50µL de TE por 15 minutos a 37°C. Posteriormente o DNA foi quantificado em gel de agarose 1% juntamente com marcador 1 Kb DNA “Ladder” (Fermentas) e visualizado por coloração com brometo de etídio, sob luz ultravioleta.

A qualidade do DNA das células bacterianas foi analisada em gel de agarose (Invitrogen) 1 % a 100 Volts, conjuntamente com o marcador 1 Kb DNA “Ladder” (Fermentas). Após o término da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($1,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), e foi fotografado (câmara Kodak Digital Science), sobre transluminador de luz UV.

Para a amplificação foi utilizado o termociclador Icyler Thermal Cycle 582 (Bio-Rad). A reação de PCR foi preparada com o DNA bacteriano com o intuito de amplificar a Região Ribossomal 16S, que resultou em um segmento de aproximadamente 430pb, em um volume final de 50µL contendo 2 µL (0,5 – 10,0ng) de DNA total, 0,2µM de iniciadores ou *primers* R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e 968F (5'-AACGCGAAGAACCCTTAC-3') (HEUER *et al.*, 1997), 200µM de cada dNTP, 3,75mM de MgCl₂ e 0,05U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em 20mM de Tris-HCl contendo 50mM KCl (pH = 8,4). Um controle negativo (Mix PCR sem DNA) foi incluído em todos os experimentos. As condições das reações foram as seguintes: 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de denaturação em 94°C por 30s, anelamento em 61°C por 1 min e extensão do iniciador em 72°C por 1 min., seguido por uma extensão final de 72°C por 7 min.

O DNA total de fungos isolados foi extraído e a região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA foi amplificada, resultando em *amplicons* de aproximadamente 605 pb, em uma reação com volume final de 50µL contendo 1µL (0.5 – 10,0ng) de DNA total, 0,2µM de iniciadores ITS1 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS4 (5'-TCCGATGGTGAACCTGCGG-3') (WHITE *et al.*, 1990), 200µM de cada dNTP, 3,75mM de MgCl₂ e 0,05U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em 20mM de Tris-HCl contendo 50mM KCl (pH8,4). Um controle negativo (Mix PCR sem DNA) foi incluído em todos os experimentos.

As condições das reações foram as seguintes: 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de denaturação em 94°C por 30s, anelamento em 55°C por 30s e extensão do iniciador em 72°C por 30s, seguido por uma extensão final em 72°C por 7 min.

A purificação do produto da PCR, do DNA de bactérias e fungos isolados, foi realizada pelo método de Polietileno glicol (PEG 8000 20%, NaCl 2,5mM). Um volume de 50µL do produto de PCR de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5mL contendo 50µL de PEG 8000, em seguida o material foi incubado a 37°C por 15 min., centrifugado (14.000 g por 15 min) a temperatura ambiente e o sobrenadante foi retirado e descartado. Em seguida, 125µL de etanol (80%) gelado foi adicionado aos microtubos, que foram incubados, em temperatura ambiente por 1 min. e o sobrenadante foi retirado e descartado, mais 125µL de etanol (80%) gelado, foi adicionado aos microtubos, em seguida, incubados em temperatura ambiente por 1 min. e o sobrenadante retirado foi descartado. A seguir, os microtubos contendo o produto de PCR purificado, foram secos, para completa evaporação do etanol e posteriormente, o DNA foi dissolvido em água ultra-pura (Milli-Q) e mantido em câmara fria a 4°C por 12 horas.

A fim de avaliar o grau de purificação, os produtos de PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (Invitrogen) a 100 Volts quantificado por meio de comparação com marcador (DNA do fago λ) λ HindIII (Fermentas) e visualizados por coloração com brometo de etídio (1,0 µg.mL⁻¹), sob luz ultravioleta. Para a realização da reação de PCR, todas as amostras foram padronizadas e diluídas para 20ng.

3.7 Identificação de isolados

O *amplicon* purificado das bactérias e fungos isolados foi sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP e no MACROGEN- Coreia. A identificação dos isolados de fungos foi realizada por meio de alinhamento básico das sequências com a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]).

As sequências obtidas a partir dos isolados bacterianos foram afinadas feneticamente por meio de comparação com o banco de dados do RDP (*Ribosomal Data Project*), na website SIMO (<http://www.simo.marsci.uga.edu/>), onde apenas sequências descritas como tipo foram utilizadas na comparação.

A identificação, em sua maioria, foi realizada em nível de gênero, a partir da classificação taxonômica de sequências de linhagens bem caracterizadas que apresentam os valores mais altos de similaridade com as sequências submetidas.

Para a construção de árvores de similaridade, foi realizado o alinhamento, edição e construção dos dendogramas através do programa MEGA 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). Alinhadas por meio de Clustal W, a similaridade foi baseada no grupamento das sequências por similaridade de acordo com o coeficiente de *Neighbor-joining*, seguindo o modelo de Jukes-Cantor e utilizando o *bootstrap* de 1000 réplicas. Para melhor visualização as árvores fenéticas foram editadas no website ITOL (<http://itol.embl.de/>).

3.8 Bactérias solubilizadoras de fosfato

Para a solubilização de fosfato inorgânico, os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura enriquecido com fosfato inorgânico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), de acordo com Verma *et al.* (2001). Os isolados foram cultivados a 28°C por até 72 horas. A presença de um halo incolor em torno das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato. As análises foram realizadas em triplicata.

3.9 Coeficiente de similaridade

Para descrever as semelhanças taxonômicas entre as comunidades de fungos endofíticos de ramos e de fungos endofíticos de folhas de *C. arabica*, assintomáticos e sintomáticos para a ARC, foi realizado o cálculo do coeficiente de similaridade de *Jaccard* (*C. Jaccard*) considerando-se os níveis de similaridade de 100% (linhagens), 99% (espécies), 97-95% (gêneros) e 90% (ordem) (SCHLOSS *et al.*, 2009). O coeficiente foi obtido a partir da fórmula abaixo onde foi projetado um dendograma para demonstração dos resultados.

$$C \text{ Jaccard} = \frac{S_{AB}}{S_A + S_B - S_{AB}}$$

Onde:

S_{AB} = número de UTOs* compartilhadas entre as comunidades A e B.

S_A = número de UTOs * na comunidade A

S_B = número de UTOs * na comunidade B.

*UTOs- Unidades Taxonômicas Operacionais

3.10 Análise estatística de diversidade, riqueza e rarefação

A riqueza (quantidade de UTOs) e a diversidade (riqueza e abundância relativa) das comunidades endofíticas fúngicas e bacterianas de *C. arabica*, cv. Bourbon Amarelo, das culturas sintomáticas e assintomáticas para a ARC, foram determinadas por meio do cálculo dos índices de *Shannon-Wiener* (H'), *Simpson*, *Ace* e *Chao*. O índice de diversidade *Shannon-Wiener* (H') é apropriado para amostras aleatórias de espécies de uma comunidade ou sub-comunidade, ou sub-comunidade de interesse, enquanto o índice *Simpson* considera não somente o número de UTO (s) e o total de números de indivíduos, mas também a proporção do total de ocorrência de cada UTO. Os estimadores de riqueza fazem estimativas sobre o número real de riqueza de espécies baseada em espécies raras compartilhadas entre grupos de amostras baseadas em incidência (*Chao 1 e 2* e *Bootstrap*) e a riqueza de espécies

raras compartilhadas entre grupos de amostras por cobertura (*Ice* e *Ace*). Os estimadores de riqueza também fazem estimativas do número de UTOs acumuladas em uma curva. Quando esta curva atinge uma assíntota é porque, virtualmente, todas as UTOs já foram isoladas.

Estes índices foram calculados utilizando o programa computacional Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009), o qual também gerou os dados de rarefação, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos fungos avaliados e os diferentes níveis de similaridade entre as sequências do gene rRNA 16S das bactérias avaliadas. As matrizes de similaridade utilizadas no programa Mothur foram geradas com o alinhamento das sequências de cada um dos grupos e posterior cálculo de matrizes aplicando as distâncias de Jukes-Cantor. Os níveis de similaridade considerados para determinar os níveis taxonômicos nas análises com isolados fúngicos foram: 100% (linhagens), 99% (espécies), 97-95% (gêneros) e 90% (ordem). As sequências para isolados bacterianos foram alocadas dentro de UTOs considerando as similaridades determinantes para diferentes isolados em concordância com os valores adotados no *Ribosomal Data Project*: 100% (linhagens), 99- 97% (espécies), 95% (gêneros) e 90% (ordem).

Análises por *heatmap* foram construídas a fim de correlacionar as UTOs compartilhadas com a quantidade de sequências presentes nas mesmas, permitindo determinar se populações dominantes (linhas vermelhas no mapa) estão presentes nos tratamentos distintos. Desta forma, é possível inferir sobre a importância de determinada população e suas influências. Para a construção do *heatmap* os dados foram calculados utilizando o programa computacional Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009), considerando diferentes níveis de similaridade. Para isolados fúngicos, foram considerados os níveis de similaridade 100, 99, 97, 95 e 90% e para bactérias foi considerado 100, 97, 95 e 90% de similaridade,

3.10.1 Análise de variância

Este teste foi utilizado para estimar a variação dos tamanhos de halos observados nos testes de solubilização de fosfato com isolados bacterianos e no experimento de antibiose com extrato bruto dos isolados fúngicos. Os dados foram analisados por meio de análise de variância, e as médias comparadas por meio do teste de Tukey. O teste de Tukey protege a análise de um aumento no nível de significância devido ao grande número de comparações

efetuadas. As análises foram realizadas através do programa SAS-*Statistical Analysis Systems*- versão 8.1 (*Copyright(c) 1989-1996 by SAS Institute, USA*).

3.11 Experimentos de antibiose

3.11.1 Produção de compostos com atividade antimicrobiana por fungos

As linhagens de bactérias e levedura patogênicas utilizadas neste trabalho foram obtidas da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE) e Centro Experimental Central do Instituto Biológico em Campinas (CEIB).

Linhagens de *Xanthomonas campestris* (ESALQ) e *Pseudomonas syringae* (CEIB 19) foram incubadas a 28°C e crescidas em placas de petri e tubos tipo penicilina (10 mL) contendo meio Nutriente Ágar (NA) (extrato de carne: 3,0g; peptona: 5,0g; ágar: 15g; água destilada: 1,0 L [pH 7,3]) por cinco dias. As bactérias *Bacillus subtilis* (DAUFPE 16), *Escherichia coli* (DAUFPE 22A; 25922 ATCC) e *Staphylococcus aureus* (DAUFE 01), foram incubadas a 37°C, crescidas em placas de petri contendo meio TSB 5% (Oxoid) por dois dias. A linhagem de *Candida albicans* (DAUFPE MC7) foi mantida a 37°C, crescida em placas de petri contendo meio BD por cinco dias. Após esse período, todo o material foi armazenado a 4°C.

A técnica para verificação da produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos fungos endofíticos foi determinada, em testes preliminares, pela modificação dos protocolos descritos por Bauer *et al.* (1966). Cada isolado foi crescido em 10 mL de meio BD por um período de 14 dias. Após este período, o meio foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferidos 2 mL para tubo e centrifugado (14000 g por 10 min). Em seguida a suspensão fúngica foi transferida para outro tubo e conservado a 4°C para experimentos posteriores.

As bactérias *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*, foram inoculadas em placas contendo meio TSB 5% (Oxoid) com auxílio de alça de vidro (50 µL de solução bacteriana). As bactérias *X. campestris* e *P. syringae*, foram inoculadas em placas contendo meio nutriente

Ágar NA (extrato de carne: 3,0g; peptona: 5,0g; ágar: 15,0g; água destilada: 1,0 L [pH 7,3]), com auxílio de alça de vidro (50µL de solução bacteriana). *C. albicans* foi inoculada em placas contendo meio BDA 100% (Oxoid) com auxílio de alça de vidro (50 µL de solução).

Cada placa inoculada com cada uma das linhagens recebeu aproximadamente 10 discos de papel filtro autoclavados, com 4 mm de diâmetro. Após, cada disco recebeu 20 µL do sobrenadante do isolado endofítico a ser testado. O cultivo de *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *C. albicans* foi realizada a 37°C por 24 horas e a de *X. campestris* e *P. syringae* foi realizada a 28°C por 72 horas. Após o cultivo, as culturas foram observadas para verificação de formação de halo de inibição. As análises foram realizadas em triplicata e os tamanhos do halo de inibição foram comparados estatisticamente utilizando o software SAS-versão 8.1 (Copyright(c) 1989-1996 by SAS Institute, USA), com a análise de variância aplicada ao procedimento de Tukey ($p < 0,05$) com delineamento inteiramente casualizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de *X. fastidiosa* em tecidos vegetais

A presença de *X. fastidiosa* foi avaliada em todas as plantas (folhas e ramos) utilizadas para isolamento de micro-organismos endofíticos. Por meio de detecção com primers específicos, foi observado que *X. fastidiosa* estava presente em todas as plantas (sintomática e assintomática para ARC) (Figura 02). Entretanto, em plantas assintomáticas a presença de *X. fastidiosa* foi detectada em ramos e folhas, enquanto em plantas sintomáticas a presença de *X. fastidiosa* foi detectada somente em ramos.

Uma forte limitação no estudo da *X. fastidiosa* em plantas é o desenvolvimento lento da doença por isso, a colonização pela bactéria só pode ser certificada após o patógeno já ter se espalhado para os tecidos vegetais. Curiosamente, em plantas assintomáticas a presença de *X. fastidiosa* foi detectada em ramos e folhas, enquanto em plantas sintomáticas a presença de *X. fastidiosa* foi detectada somente em ramos. Queiroz-Voltan *et al.* (2004) relataram a colonização preferencial de *X. fastidiosa* por ramos do cafeeiro em estudos envolvendo a avaliação da obstrução de elementos de vaso do xilema nas diferentes partes do cafeeiro com e sem sintomas externos da ARC. Estes autores constataram que o órgão que apresentou uma proporção maior de obstrução de elementos de vaso foi o caule, seguido do pecíolo, limbo e raiz. Os resultados do presente trabalho sugerem que a colonização de *X. fastidiosa* pode ocorrer em diferentes partes da planta e é um fator importante no aparecimento dos sintomas da doença. A anatomia e morfologia dos vasos do xilema podem estar associadas com resistência à *X. fastidiosa* (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998; 2005a). Além disto, o fato das plantas de *C. arabica* utilizadas neste trabalho estarem exposta a vetores de *X. fastidiosa* há muitos anos, também sugere que estes vetores mostram preferência por determinados tipos de tecidos ou ainda, poderia haver diferenças na composição química das plantas, à qual poderia estar associada ao estabelecimento da bactéria ou escolha alimentar de seus vetores, como tem sido descrito por outros autores (MEDINA-FILHO *et al.*, 1977; GUERREIRO-FILHO; MAZZAFERA, 2000; RAMIRO *et al.*, 2004; QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 2005b).

As diferenças observadas para presença de *X. fastidiosa*, neste trabalho, também podem ser atribuídas à distribuição não uniforme da bactéria nos tecidos da planta hospedeira (HOPKINS, 1989; PURCELL; HOPKINS, 1996). Plantas de café com sintomas externos da ARC resultam em um ramo com pequeno número de folhas no seu ápice, sendo que estas apresentam pecíolo e área do limbo reduzida (PARADELA FILHO *et al.* 1997; QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998), sugerindo que em plantas sintomáticas os ramos podem ser o nicho preferencial deste fitopatógeno. A bactéria *X. fastidiosa* não coloniza uniformemente os vasos do xilema da planta hospedeira, sendo encontrada normalmente na forma de agregados, que tendem a se acumular em partes específicas da planta (PURCELL; HOKPINS, 1996). Desta forma, os resultados obtidos na detecção de *X. fastidiosa* em plantas sintomáticas sugerem que *X. fastidiosa* preferencialmente colonize os ramos de *C. arabica* e que a não extensão da sua colonização para outras partes da planta pode ocasionar o bloqueio dos vasos e o aparecimento dos sintomas da doença. Newman *et al.* (2003) observaram que uma alta proporção de vasos colonizados por *X. fastidiosa* não está relacionada com bloqueios nas folhas infectadas sugerindo que o bloqueio dos vasos não é uma estratégia de colonização utilizada pelo patógeno e sim um produto causado por colonização endofítica. Os autores também propuseram que o movimento entre os vasos é o fator primordial que leva a colonização, cuja falha leva ao entupimento do vaso e o aparecimento dos sintomas da doença.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que em plantas de *C. arabica* assintomática para ARC a bactéria *X. fastidiosa* por meio de movimentos intervasos pode colonizar os pecíolos sem provocar o bloqueio dos vasos xilemáticos e os sintomas da doença. Em estudos de *C. arabica* com ausência de sintomas externos de infecção pela *X. fastidiosa* nas plantas foi observado que todos os acessos se apresentaram pouco obstruídos pela *X. fastidiosa*. Embora as diferenças entre as proporções de obstrução dos elementos de vaso não tenham sido significativas entre as diferentes partes da planta, foi observado uma tendência do pecíolo ter uma obstrução maior, seguido da nervura principal do limbo e do caule (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 2005b). Baccari; Lindow (2011) em estudo com cultivares resistentes de videiras em comparação com cultivares mais suscetíveis aos sintomas da Doença de Pierce observaram uma colonização menor com população inferior de *X. fastidiosa* no xilema do caule. Estes mesmos autores concluíram que não houve uma relação direta entre o tamanho da população de *X. fastidiosa* no caule e a proporção de vasos colonizados, levando-se em consideração que uma população muito maior do patógeno foi observada em cultivares suscetíveis. Os autores também constataram que a formação de grandes agregados

celulares em vasos não é necessária para *X. fastidiosa* se mover lateralmente no caule de vasos adjacentes. A maioria dos vasos abrigou apenas pequenos agregados, especialmente em cultivares assintomáticos, em que alguns movimentos intervasculares foram detectados (BACCARI; LINDOW, 2011).

Newman *et al.* (2003) constataram que na planta hospedeira, a maioria dos vasos xilemáticos é colonizada por *X. fastidiosa* de forma dispersa e assintomática, enquanto que os vasos colonizados densamente formando biofilme são mais raros, mas sintomáticos. Baccari; Lindow (2011) sugeriram que, em comparação com o caule, *X. fastidiosa* é relativamente livre em seu movimento e crescimento dentro do pecíolo. Estas hipóteses explicam o fato dos pecíolos em cafeeiros assintomáticos para ARC serem a região com maior acúmulo de *X. fastidiosa* e, portanto mais utilizados em trabalhos de levantamento desta bactéria em cafeeiros e em outras culturas infectadas por *X. fastidiosa* (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 2005b, ARAÚJO *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2002b; PURCINO *et al.*, 2007, BERETTA *et al.*, 1996; HOPKINS, 1981; LIMA *et al.*, 1996; RAJU *et al.*, 1983).

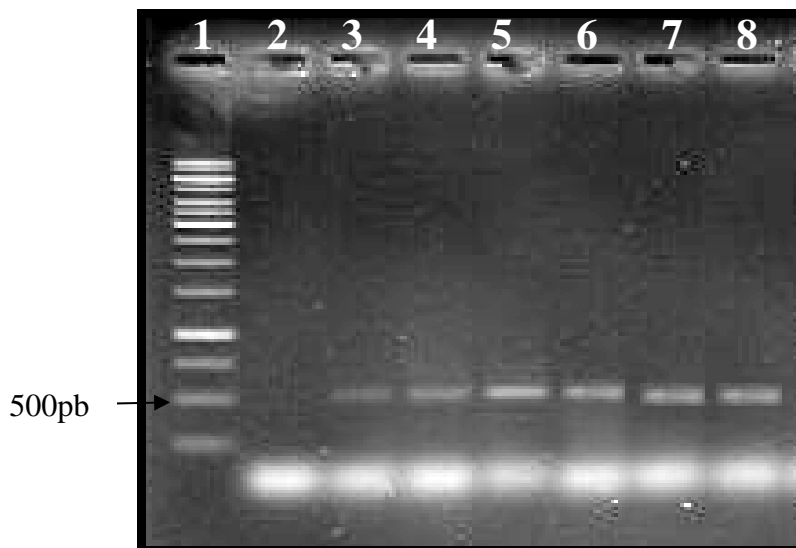


Figura 02: Detecção de *X. fastidiosa* em *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo com *primers* CVC-1 e 272-2-int, específicos para *X. fastidiosa*. Em 1- Marcador 1 Kb DNA “Ladder” (Fermentas), 2- controle negativo, 3- planta assintomática para ARC (folha), 4- planta assintomática para ARC (ramo), 5- planta assintomática para ARC (folha), 6- planta assintomática para ARC (ramo), 7- planta sintomática para ARC (ramo), 8- planta sintomática para ARC (ramo).

4.2. Isolamento e caracterização de fungos endofíticos

O isolamento de fungos endofíticos de *C. arabica* foi realizado em fevereiro de 2009. De acordo com a metodologia empregada foram obtidas 449 colônias fúngicas, as quais foram purificadas e agrupadas de acordo com as semelhanças morfológicas e planta de origem. Diferentes meios (BDA 20%, BDA 10% e ágar-água) e temperaturas (28°C e 37°C) foram utilizados para tornar maior o número de endófitos isolados. Um meio rico em temperatura ideal, como BDA 20% e 28°C seleciona micro-organismos que crescem rápido nestas condições. Já a 37°C outros endófitos podem ser isolados. No meio pobre como ágar-água há, em geral, pequeno crescimento fúngico o que pode facilitar o isolamento de outras espécies (ARAÚJO *et al.*, 2002a).

A frequência de infecção (F.I.) encontrada nos isolamentos de fungos endofíticos de *C. arabica* está apresentada na tabela 02. Foi observado que a frequência de infecção (F.I.) variou de 0,48 a 0,87 a 28°C e de 0,13 a 0,81 a 37°C, mostrando uma maior amplitude a 37°C. Na média, a F.I. obtida após cultivo a 28°C foi maior que a 37°C. Neste contexto, é importante salientar que no local de coleta, a temperatura ambiente varia entre 11°C e 30°C e a média da região é 22°C (CIIAGRO, 2009), de modo que os isolados mantidos a 28°C são beneficiados pela temperatura mais próxima do que ocorre em seu ambiente. Foram observados valores de F.I. de fungos endofíticos de folhas mantidos a 37°C, maiores nas folhas de plantas sintomáticas comparado à F.I. de folhas de plantas assintomáticas, possivelmente a temperatura de 37°C favoreceu o crescimento de fungos endofíticos de folhas de plantas sintomáticas, porém este ponto deverá ser estudado mais detalhadamente para confirmação desta hipótese. Ressalta-se que em fungos endofíticos de folhas de plantas sintomática e assintomática para a ARC não ocorreram diferenças significativas nos valores da F.I. quando mantidos a 28°C.

Tabela 02: Valores de frequência de infecção (F.I.) de fungos endofíticos isolados de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo, em plantas assintomática e sintomática para ARC, parte da planta e as diversas condições de isolamento dos fungos (meio de cultura e temperatura).

Parte da planta	Sintomas da ARC	Meio de cultura	Temperaturas	
			28°C	37°C
			F.I. / DVPAD	F.I. / DVPAD
Ramo	Sintomático	Ágar -água	0,87 ± 0,00	0,57 ± 0,14
		BDA (10%)	0,80 ± 0,06	0,80 ± 0,12
		BDA (20%)	0,85 ± 0,02	0,81 ± 0,04
	Assintomático	Ágar -água	0,85 ± 0,02	0,71 ± 0,26
		BDA (10%)	0,87 ± 0,00	0,74 ± 0,14
		BDA (20%)	0,84 ± 0,04	0,58 ± 0,15
Folha	Sintomático	Ágar -água	0,69 ± 0,13	0,73 ± 0,24
		BDA (10%)	0,74 ± 0,11	0,81 ± 0,04
		BDA (20%)	0,71 ± 0,09	0,81 ± 0,04
	Assintomático	Ágar -água	0,48 ± 0,20	0,13 ± 0,11
		BDA (10%)	0,52 ± 0,10	0,26 ± 0,24
		BDA (20%)	0,49 ± 0,18	0,27 ± 0,27

F.I. Frequência de infecção;
DVPAD desvio padrão.

Dos 449 fungos isolados, 246 foram isolados de plantas assintomáticas e 203 de plantas sintomáticas para a ARC. Dos isolados obtidos, 181 isolados fúngicos de ramos e folhas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo, de plantas sintomática e assintomática para ARC foram identificados. A seleção destes isolados tentou manter a proporcionalidade e representatividade da diversidade de cada tratamento. É importante salientar que, a seleção de isolados fúngicos a partir do agrupamento por semelhanças morfológicas permite uma visão geral da estrutura dessas populações, mas não suporta deduções sobre pequenas variações, pois estas estão mais sujeitas aos erros de amostragem. Foram analisados 108 isolados de plantas assintomáticas para a ARC e 73 isolados de plantas sintomáticas para ARC.

Os resultados mostraram que nas condições avaliadas a comunidade fúngica de ramos e folhas de *C. arabica* é composta por 2 filos, sendo aproximadamente 93% Ascomycota e 7%

Basidiomycota. A predominância de Ascomycota na comunidade fúngica isolada de plantas já foi reportada anteriormente, inclusive em isolados de cultura de *C. arabica* (VEGA *et al.*, 2010). Esta maior frequência de Ascomicetos se deve ao fato de ser utilizada uma análise dependente de cultivo, a qual pode ter selecionado estes fungos que apresentaram um crescimento mais rápido. Do total de isolados fúngicos 88,96% foram classificados em nível de ordem, 81,21% em nível de gênero, 62,98% em espécie e 12,7% até o nível de linhagem. A comunidade fúngica associada à *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo mostrou ser composta por fungos pertencentes a pelo menos 22 gêneros diferentes (Tabela 03; Figura 03). Os isolados M06 e N43 foram identificados apenas em nível de família (Meruliaceae), apresentando 97% de similaridade com fungos não cultivados (Tabela 03). Dessa forma, tendo em vista que estes isolados estão sendo cultivados, poderiam ser usados para a descrição taxonômica deste grupo. As sequências com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos isolados M06 e N43 podem ser visualizadas no Apêndice C.

A tabela 03 mostra a identificação taxonômica dos 181 isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA comparadas feneticamente por meio do banco de dados do *GenBank*, a partir dos resultados gerados pela ferramenta BLAST.

Tabela 03: Identificação molecular dos isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC.

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
X07	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	FJ810517.1	100%	97%
P14	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	EU314999.1	96%	79%
R07*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	GU183169.1	97%	58%
U05	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	GU594735.1	98%	99%
P03*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	GU172440.1	99%	53%
R02	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus flavus</i>	HQ010119.1	99%	96%
O06*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594752.1	72%	43%
S15*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus fumigatus</i>	HQ248184.1	86%	92%
X09*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus fumigatus</i>	HQ398235.1	90%	62%
M10*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus fumigatus</i>	FM999056.1	94%	53%
P33	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EF134624.1	98%	97%
S04*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus niger</i>	GU256750.1	85%	94%
S03*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus niger</i>	GQ259131.1	86%	90%
P01*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus oryzae</i>	EU409806.1	95%	60%
P26*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus oryzae</i>	EU409806.1	98%	55%
G15	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus peyronelii</i>	EF669715.1	95%	94%
Q15	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus peyronelii</i>	EF669715.1	96%	98%
I12*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus sydowii</i>	GU244528.1	99%	63%
I03*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus sydowii</i>	EF652451.1	99%	90%
P47*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	AM158227.1	89%	92%
L13*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	EU191029.1	96%	75%
P43*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	FJ904814.1	96%	78%
O01	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	EF652480.1	96%	91%
A06	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	DQ347500.1	97%	92%
L03	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	DQ335982.1	97%	98%
I11*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	DQ347500.1	99%	87%
A04	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	DQ347500.1	99%	93%
I21	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	DQ347500.1	99%	95%
L05	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	EU709775.1	99%	95%
I21	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	EU586040.1	99%	97%
D02	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Aspergillus versicolor</i>	EF652480.1	99%	100%

(continua na próxima página)

Tabela 03: Identificação molecular dos isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
Q20*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	GU966505.1	76%	52%
Q21*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	GU966505.1	97%	53%
S11	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	HM003682.1	99%	94%
O04	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ836800.1	99%	96%
Q16	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ836800.1	99%	99%
P57*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ836800.1	100%	49%
P34*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ836800.1	100%	57%
M08*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968593.1	66%	62%
Q10*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AJ311883.1	78%	91%
Z05*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066620.1	87%	94%
G02	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ453999.1	96%	93%
A02	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968591.1	97%	98%
G06*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ264182.1	98%	81%
M05	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066701.1	98%	94%
N37	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ264183.1	98%	94%
T14	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ454000.1	98%	94%
E02	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ264183.1	98%	97%
T27	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968591.1	98%	97%
P09*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016792.1	99%	49%
P02*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM016792.1	99%	70%
I16*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ454000.1	99%	88%
P20	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM042309.1	99%	93%
I09	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ453999.1	99%	95%
G03	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ264182.1	99%	97%
B01	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AY791887.1	99%	98%
Z07	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968591.1	99%	98%
Z03	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968591.1	99%	99%
N19	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ453999.1	99%	100%
P46*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM042309.1	100%	57%
N24*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066620.1	100%	71%

(continua na próxima página)

Tabela 03: Identificação molecular dos isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
N27	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM999897.1	100%	92%
G32	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AY791887.1	100%	93%
P50	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM042309.1	100%	93%
A05	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AY791887.1	100%	94%
I18	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DQ454000.1	100%	94%
Q05	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ968591.1	100%	95%
P04*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum hymenocallidis</i>	GQ485601.1	92%	68%
P22*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum hymenocallidis</i>	GQ485601.1	98%	66%
L04*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum hymenocallidis</i>	GQ485601.1	99%	68%
M12*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum hymenocallidis</i>	GQ485601.1	100%	76%
G01*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Colletotrichum</i> sp.	FJ418194.1	71%	15%
R11	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum</i> sp.	GQ334417.1	92%	93%
P05*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Colletotrichum</i> sp.	GU951768.1	99%	68%
R10*	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Coprinellus radians</i>	AB470820.1	83%	94%
Q14	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Coprinellus radians</i>	AB470820.1	99%	100%
S14	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Corioloropsis polyzona</i>	FJ904854.1	98%	98%
S13	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Curvularia affinis</i>	EF187909.1	97%	99%
R08	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Cyttaria darwinii</i>	EU107253.1	99%	52%
P06*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	GU066615.1	95%	51%
P39	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Fomes meliae</i>	DQ491421.1	98%	95%
P15*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium equiseti</i>	EF611087.1	99%	47%
P48*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium equiseti</i>	EU910588.1	99%	51%
L18*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ115683.1	88%	72%
X13*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ603748.1	89%	82%
T19*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ121321.1	90%	83%
Z09	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	HM756257.1	96%	94%
G11	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	GU371875.1	97%	96%
Q05	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	EU442588.1	97%	97%
I04	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF495237.1	98%	93%
L16	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	AF443071.1	98%	96%

(continua na próxima página)

Tabela 03: Identificação molecular dos isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
G31*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	HM152532.1	99%	72%
Q09	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	AF443071.1	99%	93%
G09	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ008888.1	99%	94%
T11	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	HM179532.1	99%	96%
V01*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ121304.1	100%	54%
T23*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium oxysporum</i>	DQ780422.1	100%	85%
Z11	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	95%	99%
M11*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	HM769953.1	97%	89%
O11*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU723438.1	98%	70%
V07	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	98%	98%
R15	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	98%	99%
T26	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU594758.1	98%	99%
N18*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	EU151488.1	99%	66%
P13*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ924905.1	99%	75%
Q11*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU951805.1	99%	86%
T06*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU951805.1	99%	86%
Z01	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU723438.1	99%	95%
Z08	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	HM769953.1	99%	95%
G04	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU066714.1	99%	96%
V13	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	99%	96%
R14	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	99%	97%
Q11	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	99%	98%
V11	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	99%	98%
X01	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	M769953.1	99%	98%
N38	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	99%	99%
R13	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ167233.1	99%	99%
P07*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ924905.1	100%	68%
P10*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GQ924905.1	100%	69%
T17*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU363955.1	100%	85%
T08*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Fusarium proliferatum</i>	GU951805.1	100%	86%

(continua na próxima página)

Tabela 03: Identificação molecular dos isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
P28*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Fusarium sacchari</i>	EF453121.1	98%	73%
T07*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Gibberella moniliformis</i>	GQ168841.1	100%	88%
S09*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella acutata</i>	GQ924900.1	100%	88%
I02*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066659.1	93%	73%
Q22	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066710.1	94%	95%
P44*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GQ924906.1	99%	80%
I08	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066710.1	99%	95%
G10	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	HM235993.1	99%	96%
R19	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066659.1	99%	96%
P30	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066659.1	99%	98%
R03	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066703.1	99%	98%
R06	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Glomerella cingulata</i>	GU066710.1	99%	99%
G12	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Glomerella</i> sp.	GU066625.1	99%	94%
A03	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Guignardia camelliae</i>	GU595026.1	100%	99%
G22	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Guignardia mangiferae</i>	FR667998.1	99%	96%
Z13*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Hypocrea lixii</i>	EF113586.1	85%	89%
U07*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Hypocrea lixii</i>	GU176478.1	92%	52%
N44	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Hypocrea lixii</i>	AY857214.1	98%	98%
T15	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Hypocrea lixii</i>	AB570246.1	100%	95%
Q17*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Lecythophora aff. Decumbens</i>	FN428890.1	97%	88%
N43	Ramo Assintomático	Basidiomycota	Meruliaceae sp.	HM997119.1	97%	97%
M06	Folha Sintomática	Basidiomycota	Meruliaceae sp.	HM997119.1	97%	100%
B02	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	HM132881.1	88%	96%
I20*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Nodulisporium</i> sp.	AF201756.1	95%	54%
I20	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Nodulisporium</i> sp.	AF201756.1	95%	90%
H01*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Penicillium citrinum</i>	EU330184.1	79%	87%
N25	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Penicillium citrinum</i>	GU446643.1	98%	98%
P29*	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Peniophora</i> sp.	FR717228.2	92%	50%
O08*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Pezicula subcarnea</i>	AF141171.1	95%	35%
D04*	Folha Assintomática	Basidiomycota	<i>Phanerochaete hiulca</i>	AY219342.1	84%	84%

(continua na próxima página)

Tabela 03: Identificação molecular dos isolados fúngicos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
Q18	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Phellinus tropicalis</i>	AF534077.1	93%	100%
Q08	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Phomopsis longicolla</i>	EU236702.1	97%	97%
T25	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Phomopsis</i> sp.	FJ009548.1	94%	96%
I01*	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Phomopsis theicola</i>	DQ286288.1	96%	52%
S16	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Pichia caribbica</i>	FN428931.1	99%	98%
I13	Folha Sintomática	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ969194.1	93%	97%
X10*	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ969194.1	97%	89%
P42*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ527876.1	98%	55%
S08	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	DQ088676.1	98%	93%
E01	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	HM037942.1	99%	96%
V12	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	HM037942.1	99%	97%
X07	Ramo Sintomático	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ969194.1	99%	99%
E03	Folha Assintomática	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ969194.1	99%	100%
S02	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Pichia guilliermondii</i>	FJ969194.1	99%	100%
O03*	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Schizophyllum commune</i>	AF249387.1	99%	89%
O07	Ramo Assintomático	Basidiomycota	<i>Schizophyllum commune</i>	AF280759.1	99%	99%
O02*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	82%	71%
O05*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	92%	82%
N36*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	93%	84%
N36'	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	AY857230.1	95%	90%
N30	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	95%	99%
N40	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	95%	99%
R16	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	95%	99%
N21	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	HM192931.1	98%	99%
N35	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	AY857230.1	98%	99%
P18*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	AY857230.1	99%	69%
P54*	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	AY857230.1	99%	72%
N41	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	AY857230.1	100%	97%
Q14	Ramo Assintomático	Ascomycota	<i>Valsaria ceratoniae</i>	EU040213.1	84%	75%

Dados obtidos a partir das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA comparadas feneticamente por meio do banco de dados do *GenBank*, a partir dos resultados gerados pela ferramenta BLAST.

*Isolados fúngicos não identificados no nível de espécie.

Os gêneros mais frequentes representam aproximadamente 85,5% da comunidade, deste total 25,9% pertencem ao gênero *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*), 23,20% *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*), 17,12% *Aspergillus*, 8,8% *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*), 6,07% *Pichia* (anamorfo *Meyerozyma*), 4,4% *Curvularia* (teleomorfo *Cochliobolus*). Os outros gêneros foram observados em frequências baixas (<1,6%) sendo que 09 deles (*Corioloopsis*, *Cyttaria*, *Diaporthe*, *Fomes*, *Lecythophora*, *Peniophora*, *Pezicula*, *Phellinus* e *Valsaria*) foram representados por apenas um isolado. Esses dados sugerem que a comunidade fúngica associada a *C. arabica* é composta por poucos gêneros com muitos representantes e muitos gêneros com poucos representantes.

Na tabela 04 estão relacionados os dados obtidos sobre a comunidade fúngica deste trabalho comparados com os obtidos em outros trabalhos, relacionados às comunidades fúngicas isoladas de plantas de gênero *Coffea*. Esta comparação de dados revelou a presença de gêneros fúngicos cosmopolitas nessa cultura. Em cafeeiros fungos do gênero *Colletotrichum* já foram observados anteriormente como sendo os mais frequentes nas comunidades fúngicas associadas à *C. arabica* e *C. robusta*, depositada na Coleção Brasileira de Micro-organismos Ambiental e Industrial (CBMAI) (SETTE *et al.*, 2006). Os gêneros *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia* foram observados com maior frequência na comunidade fúngica associada à *C. arabica* em Porto Rico (SANTAMARIA; BAYMAN, 2005). Santamaria; Bayman, (2005) sugerem que *Xylaria* e *Guignardia*, em uma associação positiva, estabeleceriam uma posição de antagonismo contra fungos do gênero *Colletotrichum*. Neste trabalho, foi observada, uma baixa frequência de fungos do gênero *Guignardia* e não foi observada a presença de *Xylaria*, sugerindo que um dos fatores responsáveis pela grande frequência de *Colletotrichum* (Tabela 03) estaria correlacionado à baixa colonização de *Guignardia* e ausência de *Xylaria* entre os isolados obtidos neste trabalho.

Isolados fúngicos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium* também foram descritos em folhas, raízes, caules e frutos de *C. arabica* cultivadas na Colômbia, Hawai, México e Porto Rico, onde a frequência de *Colletotrichum* e de *Fusarium* foi de 29,7 e 20,9%, respectivamente (VEGA *et al.*, 2010). Os resultados do presente estudo indicam que sete isolados que apresentaram similaridade para os gêneros *Corioloopsis*, *Cyttaria*, *Lecythophora*, *Peniophora*, *Phellinus*, *Pezicula* e *Valsaria* não foram descritos como isolados endofíticos de plantas do gênero *Coffea* em outros trabalhos, sendo descritos pela primeira vez no presente trabalho, como endófitos do café.

A característica mais evidente da comunidade fúngica associada a *C. arabica*, neste trabalho, é a predominância dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Aspergillus*. O gênero *Colletotrichum* é frequentemente relatado em diferentes espécies de plantas cultivadas em todo o mundo causando doenças e/ou de forma saprófita (LOPEZ, 2001). Espécies de *Colletotrichum* estão presentes em todos os órgãos do cafeeiro. A importância desses fungos para a cultura do cafeeiro ainda é muito discutida, pois tratam-se de populações de espécies de *Colletotrichum* ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma endofítica. Em alguns casos são relatados como patógenos em cafeeiros produzindo a antracnose das bagas verdes do café, conhecida como Coffee Berry Disease (CBD) provocada pelo *Colletotrichum kahawae* (GRIFFITHS *et al.*, 1971). Segundo Paradela Filho *et al.* (2001), as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas nas quais o fungo (*Colletotrichum* spp.) incide sobre gemas, flores e chumbinho, provocando sua morte e queda, bem como o enegrecimento e morte dos ramos. Estudos associados à contaminação do café com ocratoxina A revelaram que esta micotoxina com efeitos nefrotóxicos, imunossupressivos e carcinogênicos, ocorre como contaminante natural do café e pode ser produzida pelos fungos do gênero *Aspergillus*. As espécies de *Aspergillus* contaminantes de grãos de café e potencialmente produtoras de ocratoxina A, foram: *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* (SARTORI, 2005). Estas toxinas estão presentes no cafeeiro bebida e muitas delas são carcinogênicas podendo ser encontradas nos frutos, passar para a fase de preparo dos grãos no terreiro e até no café pronto. Desta forma, foi observado que estudos relacionados aos isolamentos de fungos a partir de frutos e sementes de *Coffea* poderiam apontar uma melhora na qualidade do café e inclusive, ao contrário do que se relatou anteriormente, apontar alguns isolados fúngicos que poderiam ter papel positivo no aroma do café bebida aumentando o valor do agregado do fruto pelo uso e introdução de endófitos apropriados.

Tabela 04: Isolados fúngicos de plantas do gênero *Coffea*.

Identificação dos isolados fúngicos	Este Trabalho	Vega et al., 2010	Sette et al., 2006
<i>Agaricomycetes</i>	-	11	-
<i>Ascomycota</i>	-	18	-
<i>Aspergillus (Emericella)</i>	31	35	1
<i>Beauveria</i>	-	17	-
<i>Bipolaris (Cochliobolus)</i>	8	-	1
<i>Biscogniauxia</i>	-	1	-
<i>Botryosphaeria</i>	-	4	-
<i>Cercosporia</i>	-	1	-
<i>Cladosporium (Davidiella)</i>	-	17	4
Clavicipitaceae (família)	-	3	-
<i>Clonostachys (Bionectria)</i>	-	-	1
<i>Clonostachys (Bionectria)</i>	-	2	2
<i>Colletotrichum (Glomerella)</i>	47	251	8
<i>Corioloopsis</i>	1	-	-
<i>Cryptococcus</i>	2	1	-
<i>Cyttaria</i>	1	-	-
<i>Diaporthe</i>	1	-	-
<i>Engyodontium</i>	-	1	-
<i>Epicoccum</i>	-	-	1
<i>Exobasidiomycetes</i>	-	2	-
<i>Fomes (fotopisis)</i>	1	-	-
<i>Fusarium (Gibberella)</i>	42	177	3
<i>Gongronella</i>	-	-	1
<i>Guignardia</i>	2	-	-
Hymenochaetaceae (família)	-	1	-
Hypocreales (ordem)	-	2	-
<i>Irpex</i>	-	5	-
<i>Lecythophora</i>	1	-	-
Leptosphaeriaceae (família)	-	1	-
<i>Leptosphaerulina</i>	-	2	-
<i>Meira</i>	-	3	-
Meruliaceae (família)	2	-	-
<i>Mycosphaerella</i>	-	5	1
Mycosphaerellaceae (família)	-	1	-
<i>Nemania</i>	-	1	-
<i>Neosartorya</i>	-	2	-
<i>Nodulisporium</i>	2	1	-
<i>Paecilomyces</i>	-	4	-
<i>Peniophora</i>	1	-	-
<i>Pestalotiopsis</i>	-	2	-
<i>Petriella</i>	-	2	-

(continua na próxima página)

Tabela 04: Isolados fúngicos de plantas do gênero *Coffea*.
(continuação)

Identificação dos isolados fúngicos	Este Trabalho	Vega <i>et al.</i> , 2010	Sette <i>et al.</i> , 2006
<i>Pezicula</i>	1	-	-
<i>Pezizomycotina</i>	-	1	-
<i>Phanerochaete</i>	2	-	-
<i>Phellinus</i>	1	-	-
<i>Phlebiopsis</i>	-	2	-
<i>Phomopsis</i>	3	29	5
<i>Pichia (Meyerozyma)</i>	11	-	-
Pleosporaceae (família)	-	2	-
<i>Pleosporales</i>	-	8	-
<i>Pseudozyma</i>	-	1	-
<i>Schizophyllum</i>	2	2	-
<i>Sordariales</i>	-	1	-
<i>Sordariomycetes</i>	-	6	-
<i>Sporobolomycetes</i>	-	9	-
<i>Stagonospora</i>	-	1	-
<i>Stererum</i>	-	2	-
<i>Talatomyces (Penicillium)</i>	2	128	3
<i>Tilletia</i>	-	3	-
<i>Tilletiopsis</i>	-	1	-
<i>Trametes</i>	-	5	-
<i>Trichoderma (Hypocrea)</i>	16	3	4
<i>Valsaria</i>	1	-	-
<i>Xylaria</i>	-	4	1
Xylariaceae (família)	-	62	-

A precisão da identificação taxonômica de isolados fúngicos foi comparada por meio da construção de árvores fenéticas dos isolados fúngicos de plantas sintomática e assintomática para ARC e sequências similares disponíveis no banco de dados *Genbank* (Figura 03). A comparação foi baseada na sequência parcial do gene utilizando a região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA, computadas com o banco de dados *GenBank*. Para fins de organização dos dados, foi selecionado um isolado por grupo a que pertence.

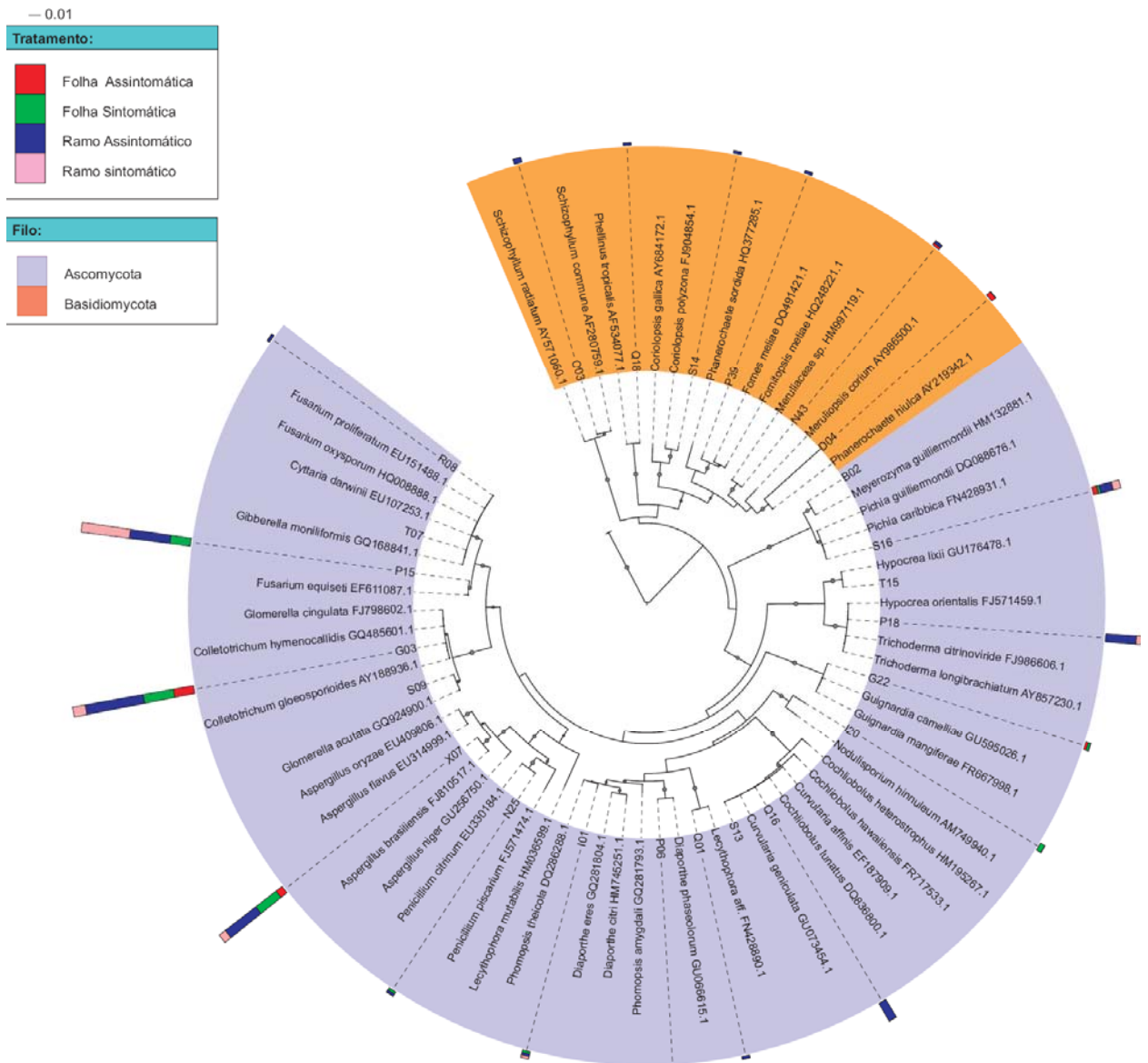


Figura 03: Árvore fenética dos isolados fúngicos de plantas sintomática e assintomática para ARC. A comparação foi baseada na sequência parcial do gene utilizando a região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA, computadas com o banco de dados *GenBank* e correlacionadas com base no agrupamento por *Neighbor-joining*. Sequências do gênero *Cyllamyces* foram utilizadas como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* foram estabelecidos a partir da amostragem feita com 1000 réplicas, sendo os valores acima de 50% representados por círculos nos ramos. O tamanho das barras indica a quantidade de sequência e suas cores as partes da planta e o tratamento ao qual pertencem (sintomático e assintomático para ARC).

Na análise realizada, por meio do programa Mothur, foi construído o dendograma baseado no coeficiente de similaridade de *Jaccard* (*C. Jaccard*), representado na figura 04. Entre as sequências com 100% de similaridade foi observado um agrupamento entre isolados obtidos de plantas sintomáticas para ARC, independente do órgão (folha e ramo). Entretanto quando analisados as sequências com níveis de 97, 95 e 90% de similaridade, foi observado um agrupamento preferencial de isolados obtidos de folhas tanto sintomáticas quanto assintomáticas para ARC. Isolados obtidos de ramos de plantas sintomáticas e assintomáticas para ARC não se agruparam, indicando haver uma comunidade distinta destes isolados (Figura 04).

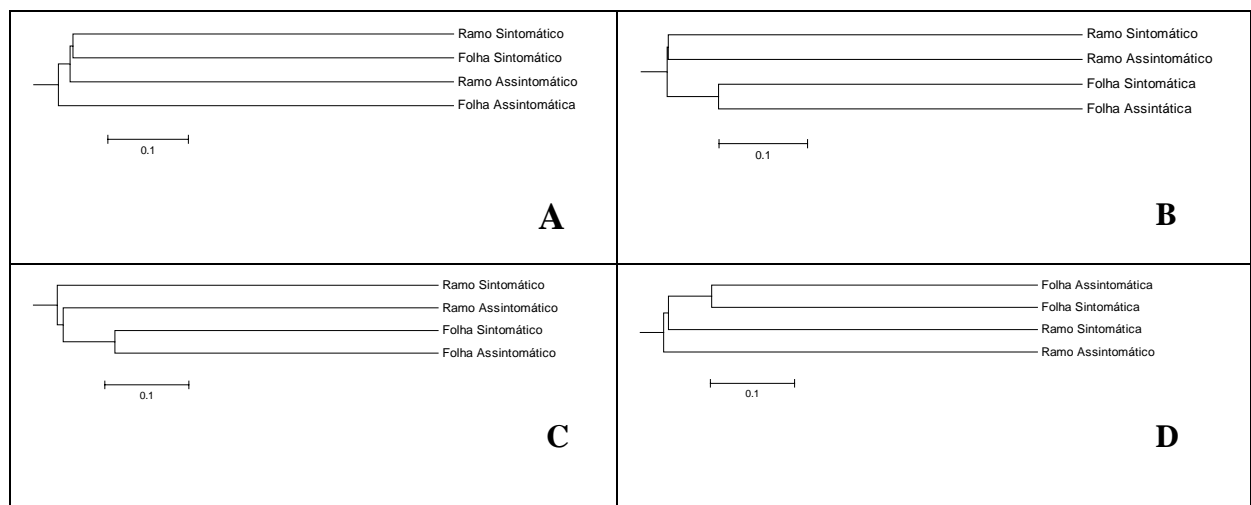


Figura 04: Dendograma baseado na similaridade por meio do índice *C. Jaccard* para a sequência da região ITS1–5.8S–ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos endofíticos. Os painéis A, B, C e D mostram o dendograma baseado no coeficiente de similaridade de *Jaccard* (*C. Jaccard*) considerando-se a composição de 100, 97, 95 e 90%, respectivamente.

A determinação das curvas de rarefação foi realizada pelo programa Mothur, a partir das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos. Os níveis de similaridade considerados para determinar os níveis taxonômicos para análises com isolados fúngicos foram: 100% (linhagens), 99% (espécies), 97-95% (gêneros) e 90% (ordens). Estas análises foram obtidas dos isolados considerando as diferentes partes das plantas e a diversidade da comunidade bacteriana associada a *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo. As curvas de rarefação foram construídas com o objetivo de verificar se a amostragem populacional adotada no presente trabalho permitiu acessar a diversidade das populações estudadas. De maneira geral, a análise das curvas de rarefação, obtida a partir da população fúngica identificada revelou que a amostragem adotada foi suficiente para representar as

diversidades das populações fúngicas nos níveis de similaridades de 90%, que podem ser representativas no nível de ordem (Figura 05).

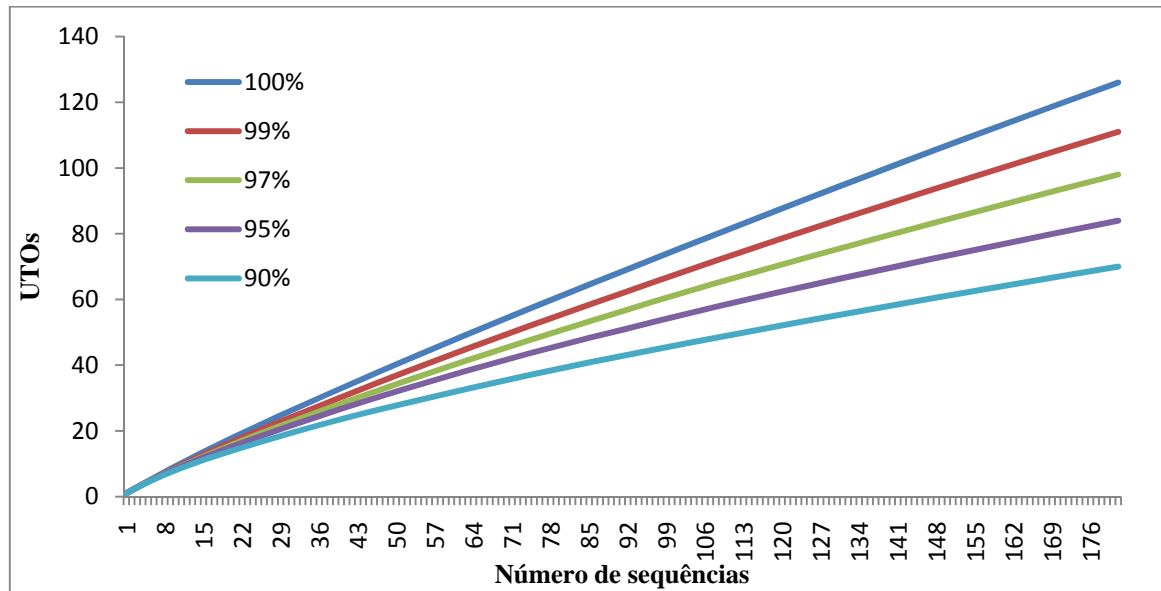


Figura 05: Análise de rarefação das UTOs correspondentes das comunidades fúngicas isoladas de *C. arabica*, cv. Bourbon Amarelo. As análises são baseadas em sequências parciais da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos. As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos.

Entretanto, quando foram analisados somente isolados obtidos de folhas assintomáticas foi observado que houve uma sobreposição de linhas nos níveis de similaridade. As curvas não apresentaram tendência de estabilização, indicando que a amostragem precisaria ser ampliada para conseguir acessar apropriadamente a diversidade nesses níveis (Figura 06). Para análise de isolados obtidos de folhas sintomáticas, a curva começou a se estabilizar, aproximando-se da assíntota horizontal para os níveis de similaridade de 90%, que podem ser representativos em nível de ordem. Para as análises baseadas nas sequências obtidas de isolados fúngicos de ramos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pode-se notar uma diferença no padrão das curvas de rarefação entre isolados de ramos sintomáticos e assintomáticos para a ARC (Figura 06). Os isolados fúngicos obtidos de ramos assintomáticos apresentam em média de 36,8% a mais UTOs, quando comparados ao mesmo número de sequências de isolados de ramos sintomáticos, representadas no eixo das abscissas (sequências de 1 a 34). Além disso, a curva de rarefação começou a se aproximar da assíntota horizontal nos níveis de similaridade de 97% em isolados fúngicos obtidos de ramos assintomáticos, já os isolados fúngicos obtidos de ramos sintomáticos, as curvas começam a se estabilizar ao nível de similaridade de 90%.

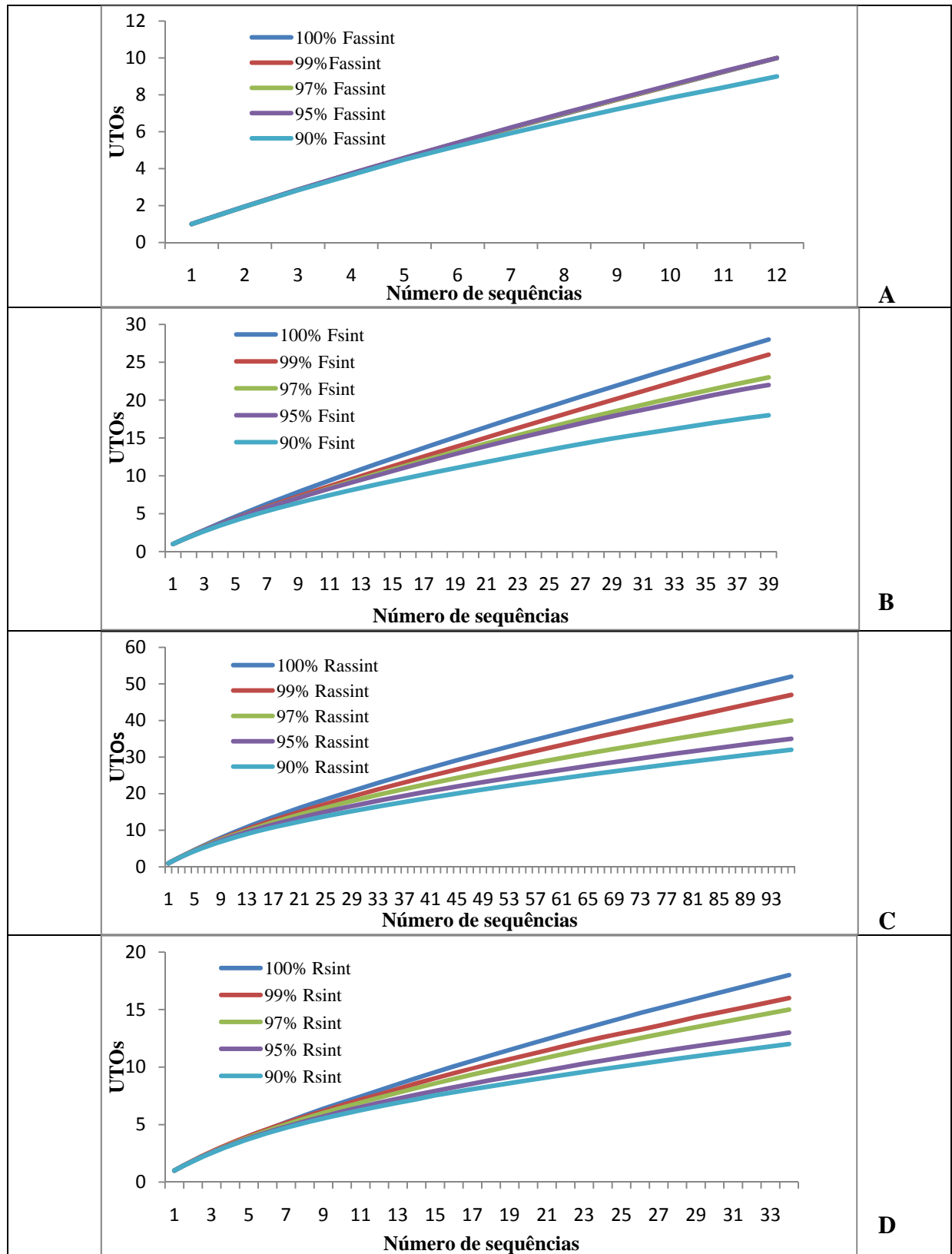


Figura 06: Curva de rarefação das UTOs correspondentes as comunidades fúngicas isoladas de Fassint - folhas assintomáticas (A), Fsint - folhas sintomáticas (B), Rassint - ramos assintomáticos (C) e Rsint - ramos sintomáticos (D), de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo. As análises são baseadas em seqüências parciais da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos. As similaridades consideradas são indicadas pelas linhas coloridas em cada gráfico e determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos.

Os números de sequências representados nos eixos das abscissas em todos os gráficos da figura 06 divergem devido a uma seleção dos isolados, onde foi mantido a proporcionalidade e representatividade de cada tratamento.

O resultado dos dados de isolamento fúngico permitiu a construção do diagrama de Venn (Figura 07) com níveis de similaridade de 100, 99, 97, 95 e 90%. Observando o diagrama de Venn, pode ser observado um número reduzido de UTOs compartilhadas na maioria dos grupos estudados (parte da planta e sintomas da ARC), para todos os níveis de similaridade analisadas. Em média, os maiores números de UTOs compartilhadas entre todos os grupos analisados foram aqueles encontrados entre ramos sintomáticos e assintomáticos (Figura 07), que correspondem aos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Pichia* e *Trichoderma* (Tabela 12 - em Apêndice). Para os níveis de similaridade de 97, 95 e 90% as comparações entre UTOs de folhas sintomáticas e assintomáticas (*Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Guignardia* e *Pichia*) e UTOs de folhas sintomáticas e ramos assintomáticos (*Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phomopsi* e *Pichia*) também obtiveram um maior número de UTOs compartilhadas (Figura 07 - Tabela 12 - em Apêndice). De uma maneira geral, estes resultados podem sugerir que existam diferenças nas comunidades fúngicas de folhas e ramos sintomático e assintomático para ARC, quando comparadas em níveis de similaridade 100, 99, 97, 95 e 90%.

Os resultados dos dados de isolamentos fúngicos permitiram a construção do *heatmap* (Figura 08) através do programa Mothur nos níveis de 100, 99, 97, 95 e 90%. Estas análises indicaram pequenas variações nos níveis de linhagem e espécie (100-99%); entre os níveis de gênero (97-95%) os *heatmaps* apresentaram padrões semelhantes. No nível de ordem (90%) foi observado um padrão distinto de dados quando comparados a outros níveis de similaridade estudados.

Na figura 08 observa-se que apesar de poucas UTOs compartilhadas foi possível notar uma população dominante tanto em folhas sintomáticas e assintomáticas como em ramos assintomáticos. Foi observada, em todos os níveis de similaridade, outra população maior somente em ramos sintomáticos para a ARC. Este fato sugere que em ramos sintomáticos existem padrão de populações dominantes diferentes de populações de ramos assintomáticos e de populações de folhas. A comparação dos dados pode também ser visualizada na figura 09 e principalmente na tabela 12 (Apêndice), onde foi constatada uma maior frequência de fungos com similaridade para o gênero *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*) somente em isolados de ramos sintomáticos.

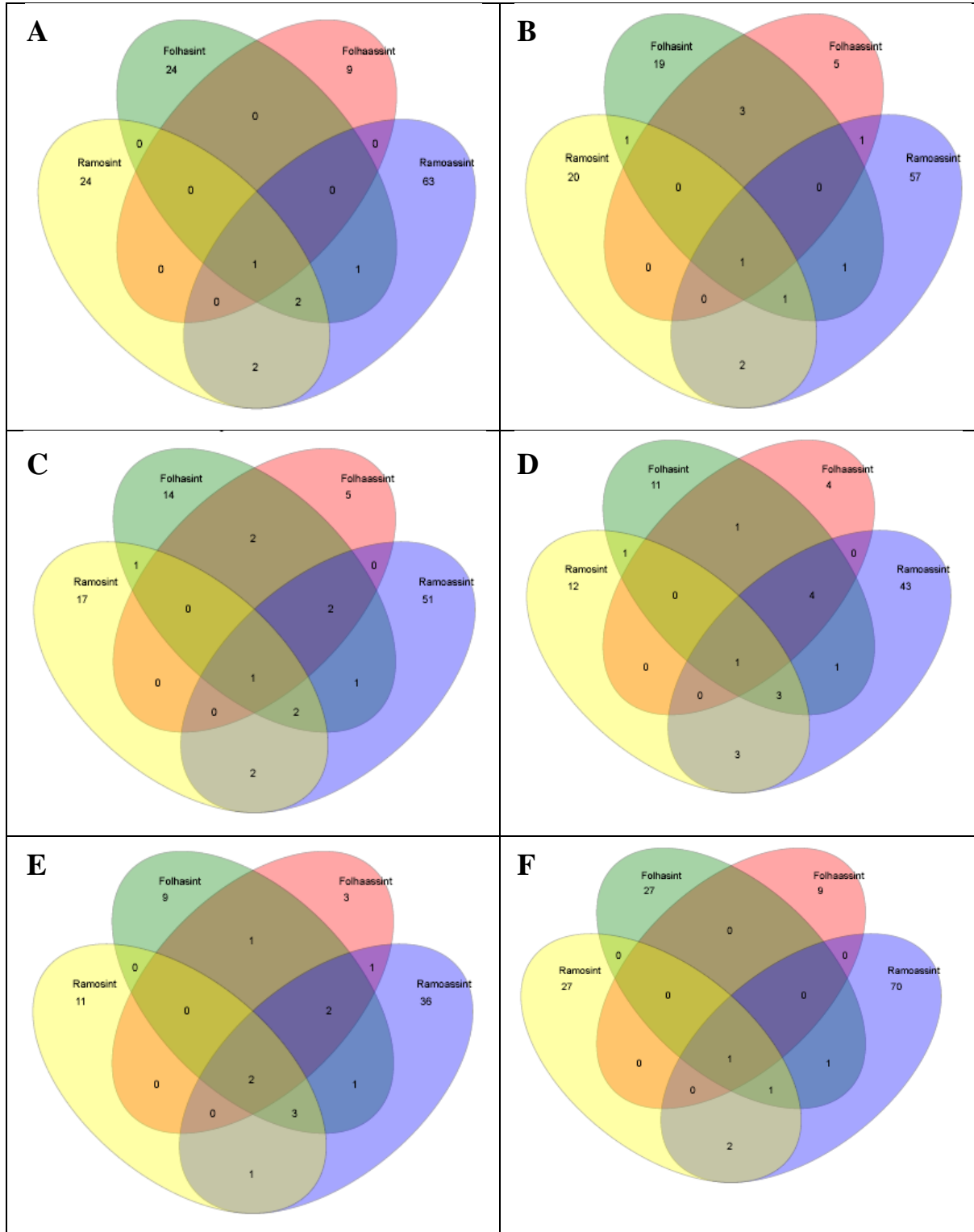


Figura 07: Diagrama de Venn representando cálculos de UTOs compartilhados e exclusivos de isolados fúngicos de folhas e ramos de plantas sintomática e assintomática para ARC. Os diagramas indicam o número de UTOs para os níveis de similaridade 100% (painel A), 99% (painel B), 97% (painel C), 95% (painel D), 90% (painel E). No painel F estão representadas as sequências idênticas. Os índices foram calculados pelo programa Mothur, a partir das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA.

Folhasint - folhas sintomáticas, Folhaassint.- folhas assintomáticas, Ramoassint - ramos assintomáticos, Ramosint - ramos sintomáticos.



Figura 08: *Heatmap* apresentando relação entre UTOs e o número de seqüências fúngicas correspondentes.

Os índices de riqueza (*Ace* e *Chao*) para as diferentes populações de fúngicas (folhas e ramos associadas a *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo sintomática e assintomática para a ARC) mostraram que os isolados fúngicos obtidos de ramos de plantas assintomáticas para ARC apresentaram os maiores índices de riqueza (Tabela 05). Também, a comparação destes índices entre as populações de fungos isolados de folhas e ramos indicou uma forte tendência de que os ramos sejam o local de maior riqueza e diversidade fúngica em *C. arabica*, embora os valores obtidos para riqueza só fossem significativos no intervalo de 95% em estudos com isolados de ramos. Esta tendência também foi descrita em isolamentos de fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme e córtex do caule e folha) de plantas de milho sadias, onde foi constatado que fungos endofíticos colonizam preferencialmente as partes aéreas da planta hospedeira e os espaços intercelulares (FISHER *et al.*, 1992).

Os índices de diversidade (*Shannon-Wiener* e *Simpson*) para as diferentes populações fúngicas (folhas e ramos associadas a *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo sintomática e assintomática para a ARC), estão listados na tabela 06. As comparações destes índices mostraram que isolados de ramos assintomáticos apresentaram maiores índices de diversidade quando comparados com isolados obtidos de ramos sintomáticos. Em folhas, o mesmo não foi observado, pois foi verificado um maior índice de diversidade para as diferentes populações fúngicas de folhas sintomáticas do que assintomáticas.

Tabela 05: Índices de riqueza (*Chao* e *Ace*) obtidos a partir da análise das sequências da região ITS1-5,8-ITS2 do rRNA dos grupos de isolados fúngicos associados a *C. arabica* correspondentes aos diferentes tratamentos, nas diferentes similaridades consideradas.

Ramo	Similaridade de	n° sequências	UTOs	<i>Chao</i>	<i>Ace</i>
Sintomático	100%	34	29	407 (211,41±812,30)	2987,40 (1874,40±4771,67)
	99%		25	77,5 (41,71±189,96)	396,02 (258,56±614,37)
	97%		23	65,75 (36,18±161,56)	503,51 (354,80±718,88)
	95%		20	55 (29,68±146,49)	186,4 (122,10±291,21)
	90%		17	108 (49,94±268,38)	227,00 (125,03±425,21)
Assintomático	100%	96	69	344,5 (185,49±720,52)	798,40 (592,50±1085,30)
	99%		63	252,42 (144,07±505,56)	666,11 (474,87±946,13)
	97%		59	304 (156,76±672,99)	670,39 (445,94±1025,05)
	95%		55	184 (108,30±367,17)	310,49 (207,30±483,61)
	90%		46	116,85 (73,36±229,45)	188,35 (131,28±283,62)
Folha	Similaridade de	n° sequências	UTOs	<i>Chao</i>	<i>Ace</i>
Sintomática	100%	39	28	120 (57,26±317,22)	601,50 (415,45±876,89)
	99%		26	152,5 (64,74±439,05)	203,01 (69,28±749,91)
	97%		23	50,2 (31,26±112,53)	58,60 (33,69±141,53)
	95%		22	39,5 (27,11±81,83)	46,23 (33,95±71,09)
	90%		18	27,16 (20,2±54,65)	66,68 (40,89±121,51)
Assintomática	100%	12	10	46 (20,31±135,66)	117,65 (42,73±364,07)
	99%		10	46 (20,31±135,66)	117,65 (42,73±364,07)
	97%		10	46 (20,31±135,66)	117,65 (42,73±364,07)
	95%		10	46 (20,31±135,66)	117,65 (42,73±364,07)
	90%		9	19,5 (11,0±63,18)	26,79 (12,32±104,25)
Total	100%	181	126	804,33 (462,39±1493,84)	4090,51 (3404,33±4920,31)
	99%		111	459,83 (289,83±791,41)	789,50 (565,73±1123,39)
	97%		98	341,83 (219,94±585,54)	350,90 (234,283±567,39)
	95%		84	244,90 (160,18±423,87)	328,34 (247,93±448,19)
	90%		70	206,11 (130,36±376,89)	404,24 (305,87±543,64)

Tabela 06: Índices de diversidade (*Shannon-Wiener* e *Simpson*) obtidos a partir da análise das sequências da região ITS1-5,8-ITS2 do rRNA dos grupos de isolados fúngicos associados à *C. arabica* correspondentes aos diferentes tratamentos, nas diferentes similaridades consideradas.

Ramo	Similaridade	n° sequências	UTOs	<i>Shannon-Wiener</i>	<i>Simpson</i>
Sintomático	100%	34	29	3,21 (2,89±3,52)	0,0267 (-0,0107±0,0642)
	99%		25	3,00 (2,67±3,33)	0,0427 (-0,0037±0,0893)
	97%		23	2,82 (2,45±3,19)	0,0695 (0,0017±0,1372)
	95%		20	2,66 (2,31±3,02)	0,0784 (0,0129±0,1438)
	90%		17	2,35 (1,96±2,74)	0,126 (0,0423±0,21073)
Assintomático	100%	96	69	4,02 (3,84±4,22)	0,0138 (0,0054±0,02213)
	99%		63	3,8 (3,59±4,03)	0,0271 (0,0101±0,0442)
	97%		59	3,64 (3,41±3,89)	0,0372 (0,0170±0,0574)
	95%		55	3,58 (3,35±3,82)	0,0383 (0,0184±0,0583)
	90%		46	3,37 (3,14±3,60)	0,0460 (0,0254±0,0666)

Folha	Similaridade	n° sequências	UTOs	<i>Shannon-Wiener</i>	<i>Simpson</i>
Sintomática	100%	39	28	3,08 (2,76±3,40)	0,0445 (0,0003±0,0886)
	99%		26	2,86 (2,49±3,24)	0,0796 (0,0090±0,1501)
	97%		23	2,7 (2,40±3,11)	0,0836 (0,0145±0,1527)
	95%		22	2,72 (2,37±3,07)	0,085 (0,0164±0,1535)
	90%		18	2,46 (2,11±2,80)	0,1093 (0,0420±0,1766)
Assintomática	100%	12	10	2,21 (1,77±2,64)	0,0454 (-0,0357±0,1267)
	99%		10	2,21 (1,77±2,64)	0,0454 (-0,0357±0,1267)
	97%		10	2,21 (1,77±2,64)	0,0454 (-0,0357±0,1267)
	95%		10	2,21 (1,77±2,64)	0,0454 (-0,0357±0,1267)
	90%		9	2,09 (1,67±2,51)	0,0606 (-0,0191±0,1403)

	Similaridade	n° sequências	UTOs	<i>Shannon-Wiener</i>	<i>Simpson</i>
Total	100%	181	126	4,46 (4,284±4,64)	0,0176 (0,0084±0,0267)
	99%		111	4,17 (3,96±4,38)	0,0342 (0,0178±0,0506)
	97%		98	3,96 (3,75±4,176)	0,0426 (0,0249±0,0603)
	95%		84	3,79 (3,59±3,99)	0,046 (0,0284±0,0644)
	90%		70	3,49 (3,28±3,69)	0,0597 (0,0403±0,0792)

4.2.1. Correlação da diversidade da comunidade fúngica endofítica isolada de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo com o aparecimento de sintomas da ARC

Considerando as análises realizadas, o isolamento seguido de caracterização dos isolados fúngicos foi construído um gráfico levando em consideração a frequência relativa dos táxons componentes das comunidades fúngicas de plantas assintomática e sintomática para ARC. O perfil da comunidade fúngica mostrou uma frequência de gêneros distintos entre plantas sintomática e assintomática para ARC, sugerindo que o desenvolvimento da ARC é resultado da alteração da comunidade endofítica, a qual interage de forma ativa com *X. fastidiosa*. Interações da comunidade endofítica com *X. fastidiosa* já foram relatadas em estudos relacionados a diversidade de micro-organismos de *Citrus* spp. (ARAÚJO *et al.*, 2001, ARAÚJO *et al.*, 2002b). Foi observado que esta comunidade endofítica pode interagir com o fungo endofítico *Guignardia mangiferae* (ARAÚJO *et al.*, 2001) ou com o fitopatógeno *X. fastidiosa* (ARAÚJO *et al.*, 2001, LACAVA *et al.*, 2006b).

Neste particular, os resultados aqui apresentados corroboram com os encontrados em outros casos mostrados que o conceito de doença, pelo menos em vegetais, parece resultar de um efeito sinérgico entre a comunidade endofítica e patógenos. Neste sentido deve-se ter uma visão holística do processo que leva a doença em plantas, em lugar de se considerar apenas o aspecto reducionista, na qual um único agente é responsável pela doença.

A figura 09 mostra a diversidade de gêneros de fungos endofíticos isolados de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC. A comunidade fúngica endofítica de plantas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo de plantas sintomáticas da ARC é composta pelos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*), *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*), *Guignardia*, *Nodulisporium*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Pichia* (anamorfo *Meyerozyma*) e *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*). Destes, somente isolados do gênero *Nodulisporium* foram encontrados exclusivamente em plantas sintomáticas, embora em pequeno número (2). Os resultados confirmaram a maior ocorrência dos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Trichoderma* nas duas condições estudadas. O gênero *Fusarium* foi mais isolado a partir de plantas sintomáticas, enquanto *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Trichoderma* foram encontrados com maior frequência em plantas assintomáticas.

O gênero *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*) é cosmopolita e tem sido descrito tanto em plantas herbáceas como em plantas lenhosas como importante patógeno causador de grandes perdas econômicas. *Fusarium* pode produzir micotoxinas em cereais e grãos estocados, o que pode afetar a saúde de humanos e animais (MARTINS, 2005). As principais toxinas produzidas por *Fusarium* são as fumosinas, conhecidas por causar câncer esofágico em humanos. A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos de solo ativos na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo alguns parasitas destas (MARTINS, 2005). Segundo Sônego *et al.* (2001), os fungos de solo são de difícil controle e os tratamentos com fungicidas são muito dispendiosos, principalmente pelo alto custo da incorporação do produto ao solo. Outra desvantagem do controle com substâncias xenobióticas é que, além dos problemas de deposição no meio ambiente e impacto que causam, sua utilização não é completamente eficaz, pelo fato do *Fusarium* se alojar no sistema vascular do vegetal. Alves *et al.* (1996) observaram maior incidência do gênero *Fusarium* nos frutos de café na fase cereja, passa, seco no pé e no chão. A relação entre os fungos *Fusarium*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* está associada com bebida de qualidade ruim (CHAULFON *et al.*, 1997). *Fusarium* se aloja no sistema vascular do vegetal e há espécies que são comprovadamente danosas ao cafeeiro e à qualidade final da bebida, podendo tornar o cafeeiro susceptível a outras doenças como a ARC. Este é o primeiro estudo que sugere a associação de sintomas da ARC com a presença de fungos do gênero *Fusarium*.

Foi observado que 95,65% dos táxons estão presentes em plantas assintomáticas: *Aspergillus*, *Cochliobolus* (Teleomorfo *Curvularia*), *Colletotrichum* (Teleomorfo *Glomerella*), *Coprinellus*, *Corioloropsis*, *Cyttaria*, *Diaporthe*, *Fomes* (Fotopisis), *Fusarium* (Teleomorfo *Gibberella*), *Guignardia*, *Lecythophora*, Meruliaceae (família), *Penicillium*, *Peniophora*, *Pezizula*, *Phanerochaete*, *Phellinus*, *Phomopsis*, *Pichia* (anamorfo *Meyerozyma*), *Schizophyllum*, *Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) e *Valsaria*. Estes resultados corroboram com outras metodologias, utilizadas neste trabalho, os índices de riqueza (*Ace* e *Chao*) para as diferentes populações de fungos confirmaram que os isolados fúngicos obtidos de ramos de plantas assintomáticas para ARC apresentaram os maiores índices de riqueza (Tabela 05). O gênero *Cochliobolus* (Teleomorfo *Curvularia*) é o mais frequente, quando comparados aos isolados exclusivos de plantas assintomáticas para a ARC (Figura 09).

Entre os gêneros que aparecem tanto em plantas sintomáticas quanto em plantas assintomáticas para a ARC, os resultados mostraram uma frequência maior de isolados com

similaridade com os gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum* (Teleomorfo *Glomerella*) e *Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) em plantas assintomáticas.

O gênero *Aspergillus* é encontrado como patógeno geralmente sem muita importância econômica e também como endófitos de diferentes hospedeiros (AGUSTA *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2007). No cafeeiro, as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* foram identificadas nos frutos passas, seco no pé e chão, mas a maior incidência ocorreu em grãos beneficiados (ALVES *et al.*, 1996; CHAULFON *et al.*, 1999). Embora *Aspergillus* tenha sido encontrado com maior frequência em plantas assintomáticas, é interessante salientar que várias espécies deste gênero produzem, à semelhança de *Fusarium*, toxinas que poderiam influenciar a qualidade da bebida produzida com estes grãos. Neste trabalho a frequência de isolados com similaridade com o gênero *Aspergillus* apontaram flutuações distintas para as condições estudadas, sugerindo que a presença deste gênero em plantas de café pode estar interferindo nos sintomas da doença.

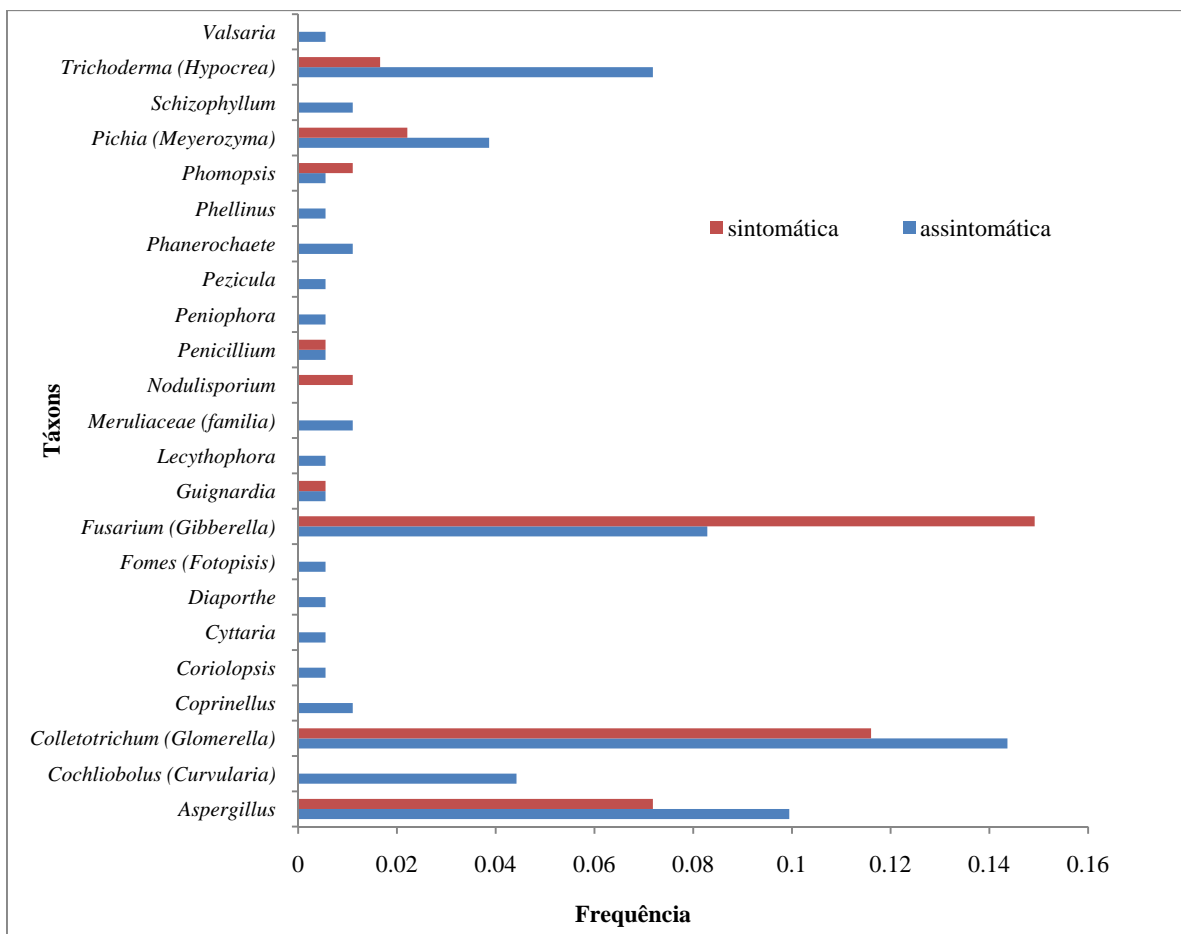


Figura 09: Diversidade de gêneros de fungos endófitos isoladas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.

O gênero *Colletotrichum* (Teleomorfo *Glomerella*) é frequentemente relatado em diferentes espécies de plantas cultivadas em todo o mundo e sua associação com *X. fastidiosa* está sendo estudada em outros trabalhos onde foi sugerido que, em de plantas de cafeeiro, a mancha manteigosa, provocada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, pode ter etiologia complexa ocasionada por *C. gloeosporioides* e *X. fastidiosa*, os quais podem interagir por meio de enzimas, toxinas ou metabólitos, mesmo tendo sítios de colonização diferentes. Relatou-se pela primeira vez a associação de *X. fastidiosa*, agente da Atrofia dos Ramos de Cafeeiro, com pecíolo de folhas e hipocótilos obtidos a partir de sementes de plantas com sintomas da mancha manteigosa (LINS *et al.*, 2008). Os resultados encontrados neste trabalho mostraram uma frequência maior de *Colletotrichum* em plantas assintomáticas, (Figura 09) o que sugere que várias espécies distintas de *Colletotrichum* estejam em interação com *X. fastidiosa* no interior da planta hospedeira e desta forma atuariam para o não aparecimento de sintomas da ARC.

O gênero *Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) foi encontrado com uma frequência cerca de três vezes maior em plantas assintomáticas, quando comparada à sua frequência em plantas sintomáticas. Este gênero abrange fungos de solo, raízes e folhas (KUBICEK *et al.*, 2004), porém em *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo este fungo foi isolado exclusivamente de ramos, sugerindo que o nicho preferencial deste endófito pode variar de acordo com a planta hospedeira. Fungos pertencentes a este gênero crescem rapidamente, produzindo enzimas e antibióticos eficazes (KUBICEK *et al.*, 2004). Desta forma, é possível sugerir que *Trichoderma* esteja atuando como agente de controle biológico e em contato com *C. arabica* infectada pelo fitopatógeno *X. fastidiosa*, provoque uma diminuição na evolução dos sintomas da doença. Alguns mecanismos utilizados pelos antagonistas a fim de inibir o desenvolvimento do patógeno ainda são desconhecidos, porém esses micro-organismos são capazes de metabolizar substâncias como compostos antibióticos (peptídeos, lipopeptídeos e fenilpropanol) e compostos fosfolipídicos. Sabe-se que a mistura de antagonistas tais como *Trichoderma*, *Pseudomonas* e outros, como fertilizantes é capaz de potencializar o controle da doença e incrementar o rendimento da planta. Neste trabalho, dentre outros isolados, foi observado também um maior número de bactéria do gênero *Pseudomonas* em plantas assintomáticas (Figura 15), sugerindo que as flutuações encontradas entre comunidade endofítica de *C. arabica* sintomática e assintomática para ARC podem estar associadas ao aparecimento de sintomas da doença.

A análise da comunidade fúngica, permitiu observar um perfil distinto entre as comunidades fúngicas nas duas situações estudadas. De maneira geral, esses resultados

permitem sugerir que micro-organismos endofíticos podem estar induzindo resistência em cafeeiros e, dessa forma constituir uma alternativa de controle biológico da ARC e de outras doenças. Os dados aqui apresentados mostram que a comunidade fúngica em plantas assintomáticas é de certa forma mais equilibrada do que a encontrada em cafeeiros sintomáticos o que as torna mais suscetíveis aos sintomas causados por *X. fastidiosa*.

4.3 Caracterização da comunidade de bactérias

A comunidade bacteriana endofítica de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo de ramos de três plantas sintomáticas e três plantas assintomáticas foi avaliada por meio de dois isolamentos, em TSB 5%, realizados em fevereiro e julho de 2009. Foi observado que a desinfecção superficial foi eficiente, visto que o controle negativo permaneceu livre de contaminantes por 30 dias, descartando a possibilidade da ocorrência de organismos epifíticos nos isolamentos. Em uma avaliação inicial foi constatado que a frequência total de bactérias endofíticas em ramos é maior que em folhas (dados não mostrados), sugerindo que ramos seja o nicho preferencial para bactérias endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo. Deste modo, os isolamentos de bactérias endofíticas foram realizados apenas em ramos. Deve-se destacar que, o mesmo não foi observado em isolamentos de laranja doce, tangerinas (LACAVA *et al.*, 2004) onde a frequência maior de bactérias endofíticas foi encontrada em folhas. Também deve ser considerado que o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico em que muitos fatores afetam a estrutura e a composição da comunidade bacteriana que coloniza várias partes da planta.

No primeiro isolamento o número de bactérias endofíticas isoladas cultivadas em meio TSA 5% não foi significativamente diferente nas duas categorias de plantas (sintomática e assintomática para a ARC), chegando a 10^5 CFU g⁻¹. No segundo isolamento houve variação no número de bactérias isoladas variando entre 10^5 CFU g⁻¹ a 10^6 CFU g⁻¹ sendo que, esta variação ocorreu tanto no número de bactérias isoladas de plantas sintomáticas quanto de plantas assintomáticas para a ARC (Tabela 07). O mesmo foi descrito por Araújo *et al.* (2002b) ao estudar a população de bactérias endofíticas em suas interações com *X. fastidiosa* em citros, onde a frequência de infecção de bactérias endofíticas de citros em culturas sintomáticas e assintomáticas para a CVC não foi significativamente diferente. Porém, o

número de bactérias endofíticas cultiváveis isoladas de plantas assintomática e sintomática para CVC foi menor do que a obtida neste trabalho, variando entre 10^3 CFU g^{-1} a 10^4 CFU g^{-1} . Estes autores também observaram que a frequência de infecção de bactérias isoladas de citros foi significativamente maior do que bactérias isoladas de tangerinas, mostrando que pode haver variação do número de bactérias isoladas em função da espécie de planta estudada.

Tabela 07: Unidades Formadoras de Colônias de bactérias endofíticas por gramas de tecidos de ramos frescos isoladas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.

Sintomas de ARC	Amostras	UFC g^{-1} de tecido	UFC g^{-1} de tecido
		(1° isolamento)	(2° isolamento)
assintomática	Planta 1	$8,67 \times 10^5 \pm 8,29^*$	$7,60 \times 10^5 \pm 2,47^*$
assintomática	Planta 2	$2,75 \times 10^5 \pm 1,56^*$	$1,06 \times 10^6 \pm 1,24^*$
assintomática	Planta 3	$3,42 \times 10^5 \pm 2,03^*$	$1,75 \times 10^5 \pm 1,69^*$
sintomática	Planta 4	$3,23 \times 10^5 \pm 2,43^*$	$1,51 \times 10^6 \pm 0,98^*$
sintomática	Planta 5	$2,36 \times 10^5 \pm 1,34^*$	$4,93 \times 10^5 \pm 4,80^*$
sintomática	Planta 6	$6,94 \times 10^5 \pm 8,52^*$	$1,15 \times 10^6 \pm 0,85^*$

Amostras foram realizadas em triplicatas.

*Desvio padrão em porcentagem.

Para análise de crescimento bacteriano, além de determinada a frequência de bactérias endofíticas morfologicamente diferentes isoladas em plantas sintomática e assintomática para a ARC, também foi observada a pigmentação da colônia em meio sólido, bem como a forma, superfície, consistência, elevação e borda destas colônias. A partir da definição dos grupos morfológicos, foram selecionados 105 isolados bacterianos abrangendo amostras proporcionais e representativas da diversidade de cada tratamento. No primeiro isolamento foram selecionados 40 isolados bacterianos, sendo que 62,5% destes são isolados provenientes de plantas sintomáticas e 37,5% de assintomáticas para a ARC. No segundo isolamento foram selecionados 65 isolados bacterianos, destes 41,5% provenientes de plantas assintomáticas e 58,5% provenientes de plantas sintomáticas para ARC. A figura 10 ilustra as frequências dos gêneros observadas no primeiro e segundo isolamentos.

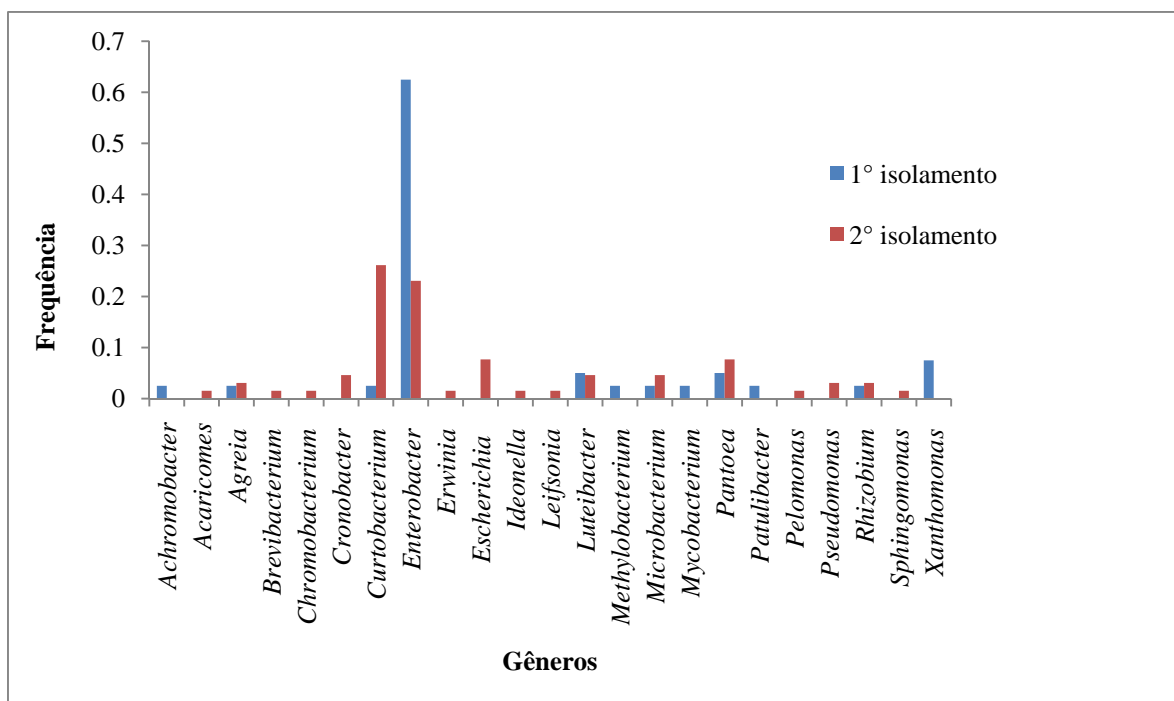


Figura 10: Frequências de gêneros bacterianos observados no primeiro e segundo isolamentos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo.

A análise da diversidade de gêneros de isolados bacterianos obtidos no primeiro e segundo isolamento apontou uma variação na frequência dos isolados. Os resultados obtidos mostraram uma maior riqueza de isolados bacterianos no segundo isolamento, que foi representada por 18 gêneros sendo que 11 deles foram somente observados no segundo isolamento (*Acaricomes*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Cronobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ideonella*, *Leifsonia*, *Pelomonas*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*). Já os gêneros *Achromobacter*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Patulibacter* e *Xanthomonas* foram isolados exclusivos do primeiro isolamento, que apresentou um total de 12 gêneros. Entre os isolados observados nos dois isolamentos, flutuações apontaram uma frequência dez vezes maior de *Curtobacterium*, no segundo isolamento, e uma frequência três vezes maior de *Enterobacter*, no primeiro isolamento. Estes dados sugerem que a comunidade bacteriana associada a *C. arabica* apresenta variações segundo a época em que foi realizado o isolamento.

A riqueza de gêneros apresentadas no primeiro isolamento, realizado no mês de fevereiro (verão), foi menor comparado ao valor obtido no mês de julho (inverno). O aumento do número total de isolados endofíticos ao longo do tempo tem correlação com a sazonalidade e a idade da planta, como já descrito para outras plantas (BERNSTEIN; CARROLL, 1977;

BROWN *et al.*, 1998; BUSSABAN *et al.*, 2001; RODRIGUES; SAMUELS, 1990). Os fatos que podem contribuir para estas mudanças estão relacionados a mudanças fisiológicas nos tecidos das mesmas (ESPINOSA-GARCIA; LONGENHEIM, 1990). Em tecidos dos ramos de *C. arabica*, as flutuações nas frequências dos gêneros bacterianos encontrados podem estar relacionadas as mudanças fisiológicas na planta, que culminaram com a perda das folhas no período de inverno. Desta maneira mudanças locais de temperatura provavelmente provoquem flutuações e distinções nas comunidades bacterianas de *C. arabica* e isto poderia explicar as diferenças encontradas no primeiro e segundo isolamentos. Entretanto, é importante ressaltar que as variações observadas podem ter ocorrido a partir de vários fatores, uma vez que comunidades microbianas associadas às plantas podem sofrer efeitos de inúmeras fontes de variação, bióticas e abióticas.

A identificação da população bacteriana obtida de *C. arabica*, nas duas condições estudadas, mostrou que nas condições avaliadas a comunidade bacteriana é composta por pelo menos 2 filos, sendo eles por Proteobacteria (70,5%), por Actinobacteria (26,7%) e 2,9% não identificados. Classificadas em nível de classe, 100% das sequências do filo Actinobacteria pertenciam à classe *Actinobacteria*, enquanto no filo Proteobacteria, 5,4% pertenciam às classes *Alphaproteobacteria*, 5,4% *Betaproteobacteria* e 86,5% *Gammaproteobacteria*. Entre estes grupos, 77,14 % dos isolados foram identificados em nível de gênero, enquanto 60% foi identificado ao nível de espécie. Foi observado que a comunidade bacteriana de *C. arabica* é composta por pelo menos 23 gêneros, incluindo em maior número os gêneros *Enterobacter* (36,6%), *Curtobacterium* (16,6%), *Pantoea* (6,3%), *Luteibacter* (4,5%) e *Escherichia* (4,5%). Entre os outros gêneros menos frequentes incluem-se *Agreia* (2,7%), *Microbacterium* (3,6%), *Cronobacter* (2,7%), *Pseudomonas* (1,8%), *Rhizobium* (2,7%) e *Xanthomonas* (2,7%), e finalmente 12 gêneros (*Acaricomes*, *Brevibacterium*, *Leifsonia*, *Mycobacterium*, *Patulibacter*, *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Ideonella*, *Methylobacterium*, *Pelomonas*, *Sphingomonas*) foram representados por apenas um isolado (Tabela 08). Esses dados sugerem que a comunidade bacteriana e fúngica (Veja ítem, 4.2) associada à *C. arabica* tenha como característica ser composta por poucos gêneros com muitos representantes e muitos gêneros com poucos representantes.

Tabela 08: Identificação molecular dos isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
145*	Sintomática	Actinobacteria	<i>Acaricomus phytoseiuli</i>	AJ812213	84,16%	99,77%
55*	Assintomática	Proteobacteria	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Y14908	88,67%	99,24%
58	Assintomática	Actinobacteria	<i>Agreia pratensis</i>	AJ310412	97,69%	100%
124	Sintomática	Actinobacteria	<i>Agreia pratensis</i>	AJ310412	98,25%	98,75%
138	Sintomática	Actinobacteria	<i>Agreia pratensis</i>	AJ310412	99,60%	100%
191*	Assintomática	Actinobacteria	<i>Brevibacterium album</i>	EF158852	89%	100%
127	Sintomática	Proteobacteria	<i>Chromobacterium violaceum</i>	AE016825	94,91%	97,92%
206	Assintomática	Proteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	EF088379	95,12%	99,51%
208	Assintomática	Proteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	EF088379	95,79%	99,01%
209	Assintomática	Proteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	EF088379	92,77%	100%
190	Assintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium citreum</i>	X77436	95,43%	97,14%
131	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209	99,80%	100%
132	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209	100%	100%
134	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209	99,80%	100%
200	Assintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium herbarum</i>	AJ310413	96,01%	99,39%
180	Assintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	99%	100%
181	Assintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	99,80%	100%
184	Assintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	98,59%	100%
186	Assintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	94,85%	99,80%
2	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	99,75%	99,75%
128	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	99,75%	99,75%
129	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	92,84%	95,82%
130	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	99,70%	100%
133	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	96,05%	99,80%
135	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	97,58%	99,80%
154	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium luteum</i>	X77437	100%	100%
114	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium pusillum</i>	AJ784400	99,26%	99,75%

(continua na próxima página)

Tabela 08: Identificação molecular dos isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
147	Sintomática	Actinobacteria	<i>Curtobacterium pusillum</i>	AJ784400	98,60%	99,16%
47	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	91,27%	100%
49	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	94,10%	100%
53	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	95,55%	100%
59*	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	87,37%	98,45%
67	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	91,08%	100%
193*	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	88,47%	91,59%
211*	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	90,53%	95,39%
12	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	Z96079	97,96%	100,26%
45	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	Z96079	98,25%	99,75%
115	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	97,22%	100%
116	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	97,49%	100,25%
117	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	97,04%	99,51%
120	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	97,77%	99,50%
121	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	96,81%	99,75%
125	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	95,97%	98,88%
126	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	AJ251469	98,49%	99,50%
48	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	94,71%	99,76%
52	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	88,43%	100%
57	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	94,96%	100%
60	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	95,98%	100%
68	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	93,07%	99,31%
187	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	93,63%	97,06%
192	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	95,48%	99,50%
198	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,24%	99,50%

(continua na próxima página)

Tabela 08: Identificação molecular dos isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
199	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	97,57%	99,51%
212	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	95,07%	99,22%
1	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,68%	99,74%
4	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,97%	100%
6	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,73%	100%
9	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,98%	100%
10	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	96,30%	100%
17	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,47%	100%
18	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	99%	100%
20	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,23%	100%
38	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,73%	100%
41	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,96%	100%
42	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	96,74%	100%
43	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	98,96%	100%
118	Sintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i>	AJ508303	96,77%	98,51%
54	Assintomática	Proteobacteria	<i>Enterobacter radicincitans</i>	AY563134	97,47%	100%
210	Assintomática	Proteobacteria	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	AM055716	90,18%	99,80%
137	Sintomática	Proteobacteria	<i>Escherichia vulneris</i>	AF530476	94,76%	98,10%
139	Sintomática	Proteobacteria	<i>Escherichia vulneris</i>	AF530476	97,47%	99,75%
140	Sintomática	Proteobacteria	<i>Escherichia vulneris</i>	AF530476	98,04%	99,02%
141	Sintomática	Proteobacteria	<i>Escherichia vulneris</i>	AF530476	98,03%	98,77%
142	Sintomática	Proteobacteria	<i>Escherichia vulneris</i>	AF530476	97,69%	99,16%
119	Sintomática	Proteobacteria	<i>Ideonella azotifigens</i>	EU542576	97,35%	99,45%
123	Sintomática	Actinobacteria	<i>Leifsonia ginsengi</i>	DQ473536	98,47%	99,49%
56	Assintomática	Proteobacteria	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	AJ580498	94,57%	99,75%

(continua na próxima página)

Tabela 08: Identificação molecular dos isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
188	Assintomática	Proteobacteria	<i>Luteibacter rhizovicius</i>	AJ580498	97,51%	99,64%
203	Assintomática	Proteobacteria	<i>Luteibacter rhizovicius</i>	AJ580498	97,29%	98,77%
3	Sintomática	Proteobacteria	<i>Luteibacter rhizovicius</i>	AJ580498	99,75%	100%
156	Sintomática	Proteobacteria	<i>Luteibacter rhizovicius</i>	AJ580498	98,77%	99,26%
21*	Sintomática	Proteobacteria	<i>Methylobacterium oryzae</i>	AY683045	92,60%	99,73%
44	Sintomática	Actinobacteria	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Y17230	97,23%	100%
136	Sintomática	Actinobacteria	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	AJ491806	98,42%	100%
148	Sintomática	Actinobacteria	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	100%	100%
150	Sintomática	Actinobacteria	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	99,75%	99,75%
46	Sintomática	Actinobacteria	<i>Mycobacterium fluoranthenivorans</i>	AJ617741	97,20%	99,75%
50	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	92,84%	100%
182	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	98,47%	100%
183	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	98,52%	99,26%
204	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	96,26%	97,51%
205	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	96,50%	100%
207	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	98,99%	100%
15	Sintomática	Proteobacteria	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196	98,65%	100%
34*	Sintomática	Actinobacteria	<i>Patulibacter americanus</i>	AJ871306	87,65%	100%
122	Sintomática	Proteobacteria	<i>Pelomonas puraquae</i>	Ps10g	96,32%	98,85%
195	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	AJ575816	99,49%	99,49%
197	Assintomática	Proteobacteria	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	AJ575816	99,49%	99,49%
152	Sintomática	Proteobacteria	<i>Rhizobium alamii</i>	AM931436	95,79%	100%
151	Sintomática	Proteobacteria	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	DQ855276	97,77%	99,75%
36	Sintomática	Proteobacteria	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	Z30542	99,72%	100%
149	Sintomática	Proteobacteria	<i>Sphingomonas trueperi</i>	X97776	99,26%	99,75%

(continua na próxima página)

Tabela 08: Identificação molecular dos isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.
(continuação)

Isolado	Tratamento	Filo	Identificação	Acesso GenBank	Similaridade	Cobertura
16	Sintomática	Proteobacteria	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Y10761	98,97%	99,74%
33	Sintomática	Proteobacteria	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Y10761	98,97%	99,74%
13	Sintomática	Proteobacteria	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Y10761	98,77%	99,75%

Dados obtidos a partir das sequências da região 968-1401 pb do gene 16S rRNA comparadas feneticamente por meio do banco de dados do RDP (*Ribosomal Data Project*), na website SIMO (<http://www..simo.marsci.uga.edu/>).

*Isolados bacterianos não identificados no nível de espécie.

A precisão da identificação taxonômica de isolados bacterianos foi comparada por meio da construção de árvores fenéticas com 23 sequências de bactérias isoladas de *C. arabica* e sequências similares disponíveis no banco de dados do RDP. Para fins de organização dos dados, foi selecionado um isolado por grupo a que pertence. Assim, foi construída uma árvore fenética incluindo os filos Actinobacteria e Proteobacteria com uma sequência para cada gênero (*Acaricomes*, *Achromobacter*, *Agreia*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Cronobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ideonella*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Pantoea*, *Patulibacter*, *Pelomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Xanthomonas*) (Figura 11).

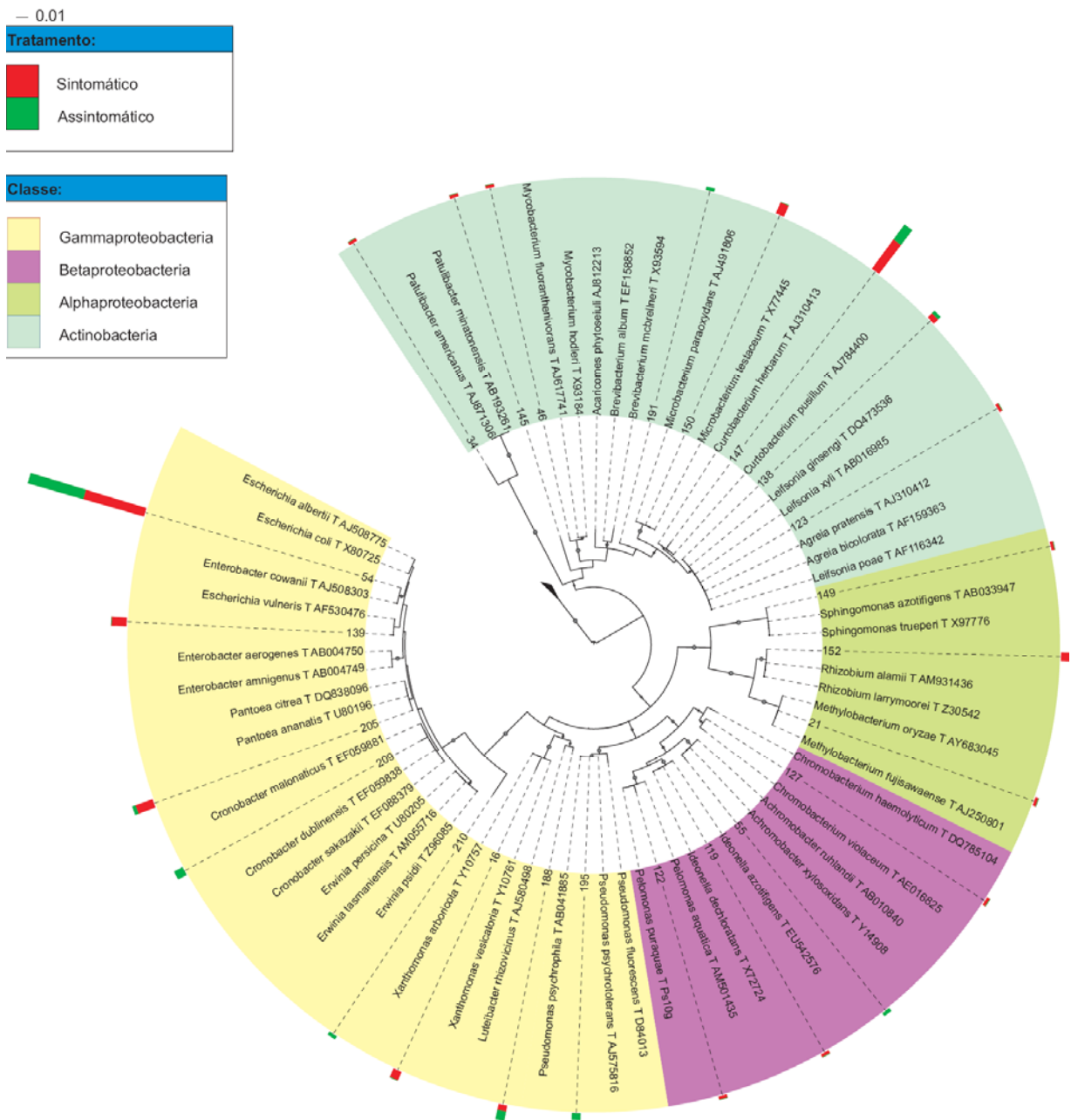


Figura 11: Árvore fenética dos isolados de plantas sintomática e assintomática para ARC. A comparação foi baseada na sequência parcial do gene 16S rRNA, computadas com o banco de dados RDP e correlacionadas com base no agrupamento por *Neighbor-joining*. Sequências do gênero *Marinitoga* foram utilizadas como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* foram estabelecidos a partir da amostragem feita com 1000 réplicas, sendo os valores acima de 50% representados por círculos nos ramos. O tamanho das barras indica a quantidade de sequências e suas cores o tratamento ao qual pertencem (sintomático e assintomático para ARC).

A tabela 09 compara os dados sobre a comunidade bacteriana do cafeeiro, obtidos neste trabalho, com a literatura disponível a respeito das comunidades bacterianas isoladas de plantas de gênero *Coffea*.

Tabela 09: Isolados bacterianos de *Coffea* obtidos no presente trabalho e já descritos anteriormente.

Identificação dos isolados bacterianos	VEGA <i>et al.</i> , 2005	Este trabalho
<i>Acaricomes</i>	0	1
<i>Achromobacter</i>	0	1
<i>Agreia</i>	0	3
<i>Bacillus</i>	6	0
<i>Brevibacterium</i>	0	1
<i>Burkholderia</i>	13	0
<i>Cedecea</i>	1	0
<i>Chromobacterium</i>	2	1
<i>Clavibacter</i>	2	0
<i>Cronobacter</i>	0	3
<i>Curtobacterium</i>	4	18
<i>Enterobacter</i>	2	40
<i>Erwinia</i>	0	1
<i>Escherichia</i>	1	5
<i>Gordona</i>	1	0
<i>Ideonella</i>	0	1
<i>Klebsiella</i>	3	0
<i>Leifsonia</i>	0	1
<i>Luteibacter</i>	0	5
<i>Methylobacterium</i>	1	1
<i>Microbacterium</i>	0	4
<i>Micrococcus</i>	3	0
<i>Mycobacterium</i>	0	1
<i>Pantoea</i>	4	7
<i>Patulibacter</i>	0	1
<i>Pelomonas</i>	0	1
<i>Pseudomonas</i>	14	2
<i>Rhizobium</i>	0	3
<i>Rhodococcus</i>	1	0
<i>Salmonella</i>	1	0
<i>Serratia</i>	1	0
<i>Sphingomonas</i>	0	1
<i>Stenotrophomonas</i>	9	0
<i>Variovorax</i>	1	0
<i>Xanthomonas</i>	0	3
Desconhecido	17	0
Total	87	105

A classificação dos isolados selecionados revelou uma diversidade de gêneros (*Enterobacter*, *Pantoea* e *Methylobacterium*) que também foram encontrados em isolamentos de *Coffea arabica* coletadas em três ilhas do Havaí (Oahu, Hawaii, and Kauai – Janeiro a março de 2003), no México (Cacahoatán, Chiapas – Fevereiro de 2003), e Colombia (Centro Nacional de Investigações de Café, CENICAFÉ, Chinchiná – Julho 2003) (VEGA *et al.*, 2005). Posteriormente, *Curtobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Methylobacterium*, *Pantoea* e *Pseudomonas* também foram relatadas em isolamento bacteriano de tecidos de café coletadas no Colômbia, Havaí e México (VEGA *et al.*, 2005). A comparação dos dados sobre comunidade bacteriana deste trabalho com a literatura disponível para *C. arabica*, mesmo que ainda muito escassa, revelou a presença de gêneros bacterianos comuns aos obtidos em isolamentos de *C. arabica* em outros países, indicando que a associação deles com plantas de *C. arabica* deve ser um fenômeno comum na natureza.

Para a determinação das curvas de rarefação (Figura 12), dos índices de diversidade (*Shannon-Wiener e Simpson*) e estimadores de riqueza (*Ace e Bootstrap*) (Tabela 10) foi utilizado o programa Mothur, a partir das sequências da região 968 - 1401 pb do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências 100% (linhagens), 99- 97% (espécies), 95% (gêneros) e 90% (ordem).

As curvas de rarefação mostraram que a amostragem populacional adotada neste trabalho permitiu acessar a diversidade da comunidade bacteriana associada à *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo considerando os níveis de similaridade de 90%, o qual pode ser considerado representativo do nível taxonômico de ordem (Figura 12). Isso porque a curva começou a se estabilizar, aproximando-se da assíntota horizontal, indicando que a amostragem adotada está próxima da amostragem adequada. Entretanto, para níveis maiores de similaridade (100, 97 e 95%), as curvas não apresentaram tendência de estabilização, indicando que a amostragem precisaria ser ampliada para conseguir acessar apropriadamente a diversidade nesses níveis. Também, nos níveis de 100, 97 e 95%, observa-se que os isolados bacterianos de plantas assintomáticas apresentam um maior número de UTOs quando comparados com os isolados bacterianos de plantas sintomáticas. Estas comparações foram realizadas apenas da sequência 1 até a 42, representadas no eixo da abscissa (Figura 12). O mesmo não foi observado para o nível de similaridade de 90% onde o número de UTOs dos isolados bacterianos de plantas sintomáticas foram maiores quando comparados com os isolados bacterianos de plantas assintomáticas.

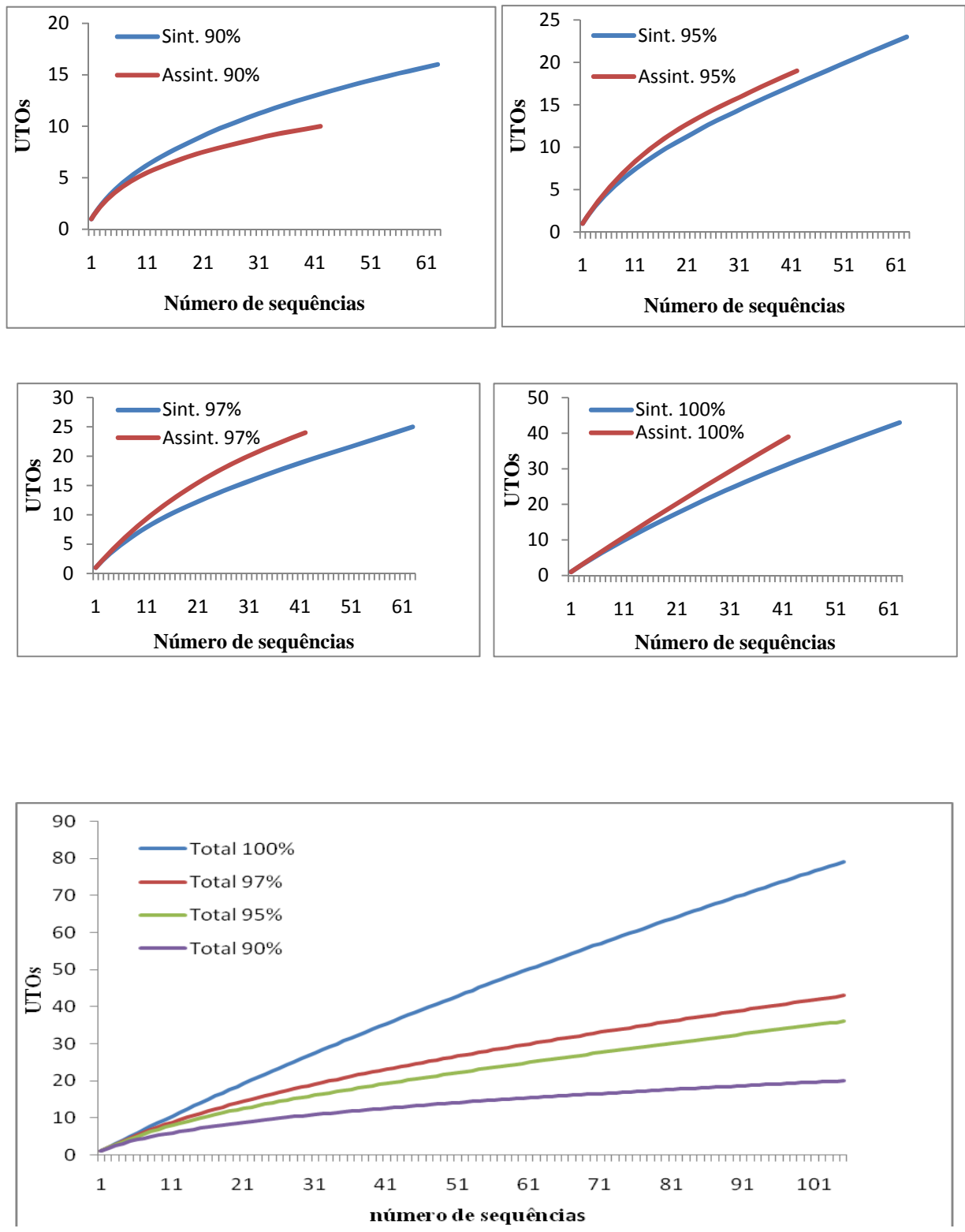


Figura 12: Análise de rarefação mostrando o número esperado de UTOs correspondentes das diferentes populações bacterianas, para os níveis de similaridade 100%, 97%, 95% e 90% entre as sequências. Sint.- sintomática/ Assint. - assintomática.

Os índices de diversidade (*Shannon-Wiener* e *Simpson*) e riqueza (*Ace* e *Bootstrap*), para as diferentes populações de bactérias associadas a *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo sintomática e assintomática para a ARC, estão apresentados na tabela 10. Os resultados mostraram que isolados obtidos de plantas sintomáticas para ARC apresentaram os maiores índices de riqueza. Enquanto os índices de diversidade mostraram ser similares nas duas condições testadas.

Tabela 10: Índices de riqueza (*Ace* e *Bootstrap*) e de diversidade (*Shannon-Wiener* e *Simpson*) obtidos a partir da análise das sequências da região 968 - 1401 pb do gene rRNA dos isolados bacterianos.

	Sim.	nseqs	UTOs	<i>Bootstrap</i>	<i>Ace</i>	<i>Shannon-Wiener</i>	<i>Simpson</i>
Assint	100%		39	52	273,0 (60±591)	3,6 (3,4±3,8)	0,0034 (0,001±0,008)
	97%	42	24	30	39,2 (28±73)	3,0 (2,7±3,2)	0,032 (0,01±0,04)
	95%		19	23	33,5 (23±70)	2,6 (2,4±2,9)	0,059 (0,03±0,08)
	90%		10	12	14,2 (10±33)	1,8 (1,5±2,1)	0,2 (0,1±0,22)
Sint.	100%		43	56	295,0 (200±449)	3,5 (3,3±3,7)	0,023 (0,005±0,04)
	97%	63	25	32	102,0 (67±168)	2,7 (2,4±3,0)	0,084 (0,44±0,12)
	95%		23	29	145,3 (96±225)	2,5 (2,3±2,8)	0,099 (0,05±0,14)
	90%		16	19	35,3 (23±66)	2,1 (1,8±2,4)	0,161 (0,15±0,23)
Total	100%		79	103	611,6 (426±895)	4,2 (4,0±4,3)	0,0097 (0,002±0,01)
	97%	105	43	54	191,8 (139±274)	3,2 (2,0±3,4)	0,052 (0,03±0,07)
	95%		36	46	202,1 (133±320)	2,9 (2,7±3,1)	0,072 (0,05±0,1)
	90%		20	24	44,0 (29±79)	2,1 (1,9±2,4)	0,183 (0,12±0,23)

Assint.- assintomática / Sint.- sintomática.

Sim. – nível de similaridade / nseqs – número de sequências.

A combinação dos dados de isolamento permitiu a construção de diagrama de Venn (Figura 13) por meio do programa Mothur nos níveis de 100, 97, 95 e 90%. Foi observado que os isolados bacterianos de plantas assintomáticas apresentam um menor número de UTOs quando comparados com os isolados bacterianos de plantas sintomáticas. Também foi observado que existe uma diversidade distinta de UTOs em plantas sintomática e assintomática em todos os níveis (linhagem, espécie, família e gênero) sendo que, para 97, 95 e 90% o número de UTOs compartilhado entre plantas sintomática e assintomática para ARC permaneceu constante.

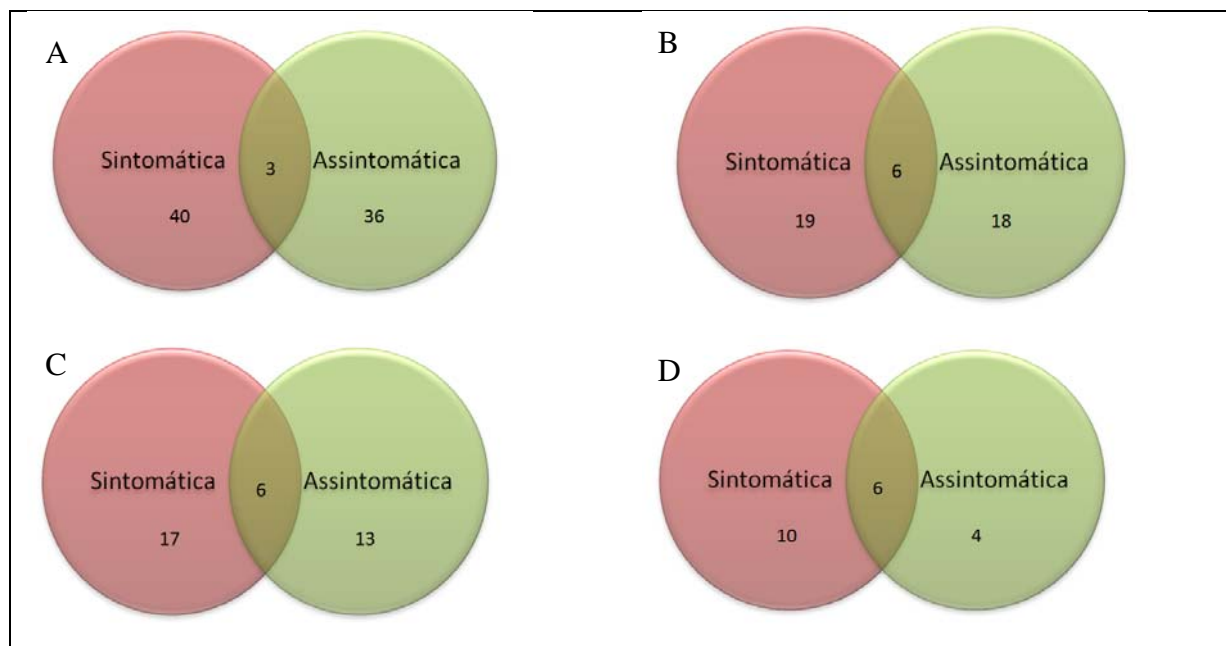


Figura 13: Diagrama de Venn representando cálculos de UTOs compartilhados e exclusivos de isolados bacterianos de plantas sintomática e assintomática para a ARC. Os diagramas indicam o número de UTOs correspondentes às diferentes populações bacterianas (sintomática e assintomática para ARC), para os níveis de similaridade 100% (painel A), 97% (painel B), 95% (painel C) e 90% (painel D). Os índices foram calculados pelo programa Mothur, a partir das sequências da região 968- 1401 pb do gene rRNA dos isolados bacterianos.

Os resultados dos dados de isolamentos bacterianos permitiram a construção do *heatmap* (Figura 14) por meio do programa Mothur nos níveis de 100, 97, 95 e 90%. Estas análises indicaram a existência de variação ao nível de linhagem (100%), visto que foi observado um padrão distinto em plantas sintomática e assintomática para ARC. O *heatmap* no nível de similaridade de 100% apresentou três populações dominantes (linhas vermelhas) em plantas assintomáticas que estão ausentes em plantas sintomáticas. No nível de espécie (97%) foi observada uma população dominante em plantas assintomáticas que não é observada em plantas sintomáticas, representadas por bactérias do gênero *Pantoea* (Figuras 14 e 15). Já no nível de similaridade de 95% duas populações dominantes foram apresentadas distintas nos tratamentos realizados, sendo representadas pelos gêneros *Curtobacterium* e *Pantoea* (Figuras 14 e 15). No nível de similaridade de 90% observa-se um maior número de UTOs em plantas sintomáticas para ARC. De maneira geral, os padrões de UTOs do *heatmap* mostraram que as comunidades bacterianas de plantas sintomática e assintomática para ARC são distintas, sugerindo que estas bactérias podem estar associadas aos sintomas da ARC.

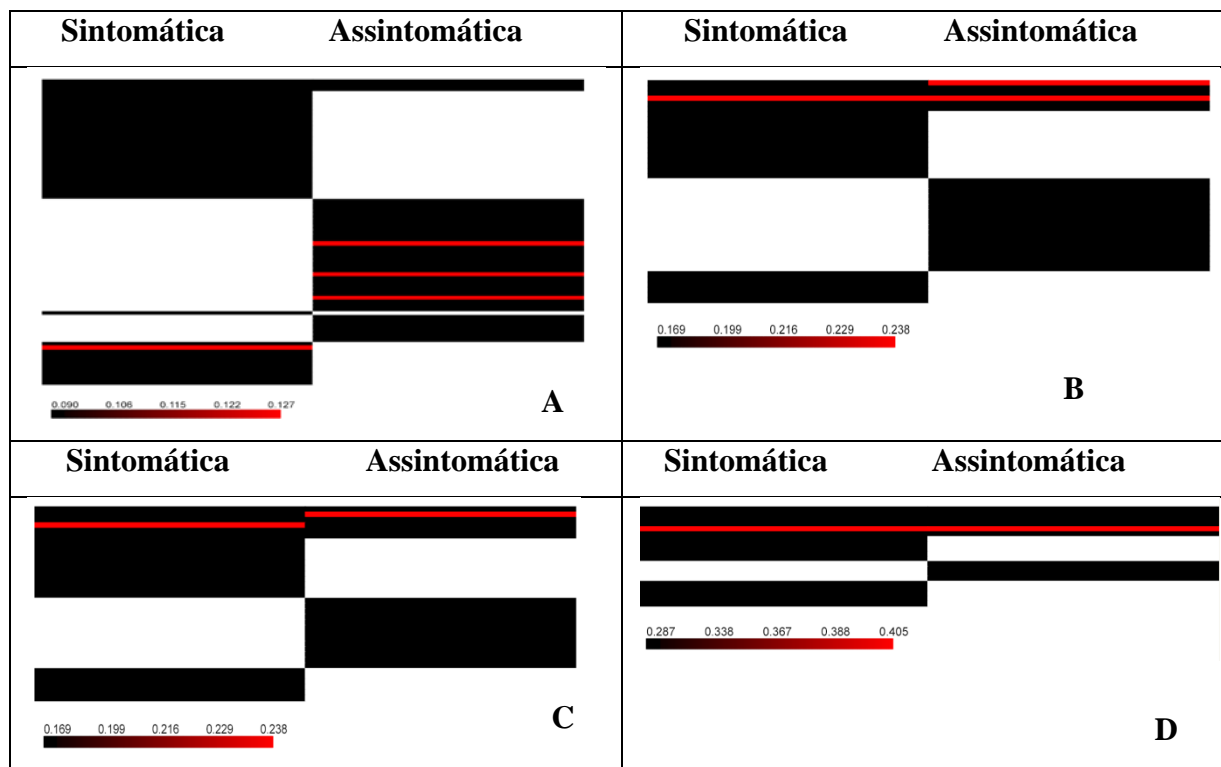


Figura 14: *Heatmap* apresentando relação entre UTOs e o número de seqüências bacteriana correspondentes. Em vermelho estão representadas as UTOs com maior número de seqüências. Os painéis A, B, C e D correspondem aos níveis de similaridades de 100, 97, 95 e 90%, respectivamente.

4.3.1 Correlação das comunidades bacterianas endofíticas isoladas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.

Os resultados mostraram que as comunidades bacterianas de plantas sintomática e assintomática para a ARC são distintas, sugerindo-se que ou desenvolvimento da ARC é resultado da alteração da comunidade bacteriana endofítica ou os sintomas da ARC geram uma alteração na comunidade bacteriana, indicando que estes endófitos interagem de forma ativa com *X. fastidiosa*. Estudos apontam que a interação entre *X. fastidiosa* e bactérias endofíticas possa contribuir para o surgimento de sintomas típicos da doença. Foram estabelecidas hipóteses a respeito da interação entre bactérias endofíticas e *X. fastidiosa* suportadas por experimentos *in vitro* e *in planta* (ARAÚJO *et al.*, 2002b; SANTOS, 2005; LACAVA *et al.*, 2006a; LACAVA *et al.*, 2007). Segundo os autores mencionados anteriormente, a CVC poderia desempenhar um papel no estabelecimento de

Methylobacterium spp. na planta hospedeira. Esta hipótese seria endossada pela análise da diversidade de *Methylobacterium* spp. pois este gênero foi o mais frequentemente isolado de plantas sintomáticas (ARAÚJO *et al.*, 2002b). Além disso, foi observado um efeito sinérgico de *Methylobacterium* spp. no crescimento de *X. fastidiosa in vitro* (LACAVA *et al.*, 2004). *Curtobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Methylobacterium* sp. também foram detectados em estudos de caracterização da comunidade bacteriana endofítica de Citros em plantas assintomáticas e afetadas pela CVC (LACAVA *et al.*, 2006b).

A figura 15 ilustra o perfil no nível de gêneros da comunidade bacteriana de plantas sintomática e assintomática para a ARC, baseado na sequência parcial do gene 16S rRNA computadas com o banco de dados RDP. Foi observado um padrão distinto na frequência de gêneros relacionados às duas condições estudadas neste trabalho. A comunidade bacteriana endofítica das plantas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo é composta de pelo menos 23 gêneros, incluindo *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Acaricomes*, *Agreia*, *Brevibacterium*, *Cronobacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Ideonella*, *Luteibacter*, *Methylobacterium*, *Patulibacter*, *Pantoea*, *Pelomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Xanthomonas*.

Destes, aproximadamente 56,5% (*Acaricomes*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Ideonella*, *Methylobacterium*, *Patulibacter*, *Pelomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Xanthomonas*) foram encontrados somente em plantas sintomáticas para ARC (Tabela 08) enquanto que 21,7% (*Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Cronobacter*, *Erwinia* e *Pseudomonas*) foram encontrados apenas em assintomáticas (Tabela 08). Os gêneros *Agreia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Luteibacter* e *Pantoea* foram encontrados em plantas sintomática e assintomática para a ARC.

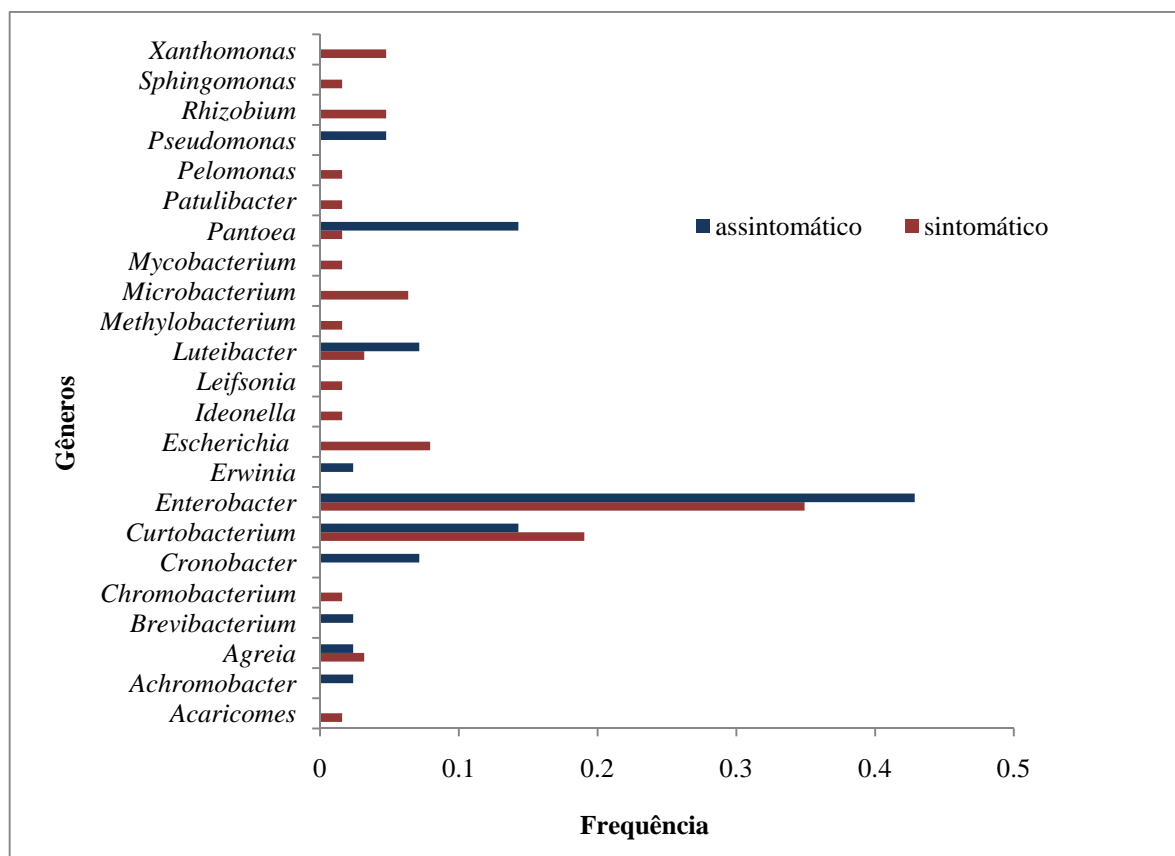


Figura 15: Diversidade de gêneros de bactérias endofíticas isoladas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática e sintomática para a ARC.

Por meio da análise dos resultados foi constatado que, quando comparados, os gêneros *Escherichia*, *Microbacterium*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* são os mais frequentes entre os exclusivos de plantas sintomáticas (Figura 15), sugerindo que estes endófitos poderiam interagir com *X. fastidiosa* no interior da planta hospedeira.

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são muito próximas geneticamente a *X. fastidiosa* sendo ambas, gamaproteobactérias, gram negativas, além de patógenos de alto poder invasivos, especialmente *X. campestris*, e de rápida propagação e virulência (WELLS *et al.*, 1987). A colonização de *X. fastidiosa* depende do sistema *quorum –sensing rpf* e do Fator de Sinal Difusível (DSF) (NEWMAN *et al.*, 2004). Exceto o sistema de inoculação, que é distinto entre bactérias do gênero *Xanthomonas* e *X. fastidiosa*, ambas possuem um padrão semelhante de infecção vascular, onde regulam este processo com o sistema de sinalização DSF para o controle da virulência e interações com a planta hospedeira (GROSSMAN; DOW, 2004). Wang *et al.* (2004) propuseram que os DSFs de bactérias do gênero *Xanthomonas* e de *X. fastidiosa* podem ser semelhantes ou idênticos. Em bactérias do gênero *Xanthomonas* o

DSF é percebido através do *rpfC* que controla a atividade de *rpfG* (DOW *et al.*, 2003). *RpfG* está envolvido no processo de regulação da superfície da célula em muitos aspectos e, portanto, possui influência na formação de biofilme (RYAN *et al.*, 2006). Em *X. fastidiosa*, os homólogos, sinal DSF e *rpf*, estão envolvidos na transmissão da Doença de Pierce pelo inseto vetor, bem como a eventual planta hospedeira (NEWMAN *et al.*, 2004). Estudos com *X. fastidiosa* mutante em *rpfF*, que não podem sintetizar DSF, são mais virulentas quando inoculadas em plantas manualmente que o tipo selvagem, mas não são transmitidas efetivamente a partir do inseto vetor. Supostamente, as enzimas degradantes de membrana de *X. fastidiosa* selvagem ajudam o movimento de *X. fastidiosa* para os vasos do xilema adjacentes. Se assim for, a DSF mutante pode preencher densamente os vasos do xilema, provocando sintomas reforçado porque é incapaz de atravessar a membrana do vasos (NEWMAN *et al.*, 2004).

A produção de exopolissacarídeo também é um importante fator de virulência para o *X. fastidiosa*. Bactérias se anexam aos vasos do xilema na ausência do exopolissacarídeo, enquanto que na sua presença, estes micro-organismos aparecem principalmente em áreas densamente colonizadas (LEIGH; COPLIN, 1992; LEITE *et al.*, 2002). O polissacarídeo goma xantana juntamente com as exoenzimas de degradação, ambos produzidos por bactérias do gênero *Xanthomonas*, são determinantes primários de virulência, os quais regem o bloqueio vascular e a migração de bactérias através da vascularização. Por outro lado, a goma fastidiana produzida por *X. fastidiosa* apresenta algumas características comuns à goma xantana (TANG *et al.*, 1991). Tanto para bactérias do gênero *Xanthomonas* como para *X. fastidiosa*, o equilíbrio entre a formação de biofilme e a dispersão intravascular é um fator determinante da progressão da doença. Em função da capacidade patogênica destas bactérias, pode ser sugerida uma associação entre *X. fastidiosa* e bactérias do gênero *Xanthomonas* em *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo sintomáticas para ARC.

Bactérias do gênero *Rhizobium* desempenham um papel muito importante na agricultura como fixadoras de nitrogênio nas raízes das leguminosas como ervilha, feijão, trevo e alfafa. Dentro do meristema, estas bactérias induzem genes especializados necessários para a fixação do nitrogênio e produtos vegetais, incluindo a síntese de glicoproteínas e glicolípídeos. Em estudos sobre os efeitos de bacterias do gênero *Rhizobium* em cultivares de feijão foram constatadas diferenças significativas na concentração de nitrogênio na seiva do xilema (RODRIGUEZ-NAVARRO *et al.*, 1999). Tendo em vista que a função do xilema é transportar água e nutrientes inorgânicos da raiz para todas as partes aéreas da planta, a

composição do fluido xilemático foi sempre considerada de baixa complexidade para sustentar o crescimento de micro-organismos em seu interior. Bactérias do gênero *Rhizobium* e outras bactérias diazotróficas como *Methylobacterium* e *Pseudomonas*, embora não formem nódulos em cafeeiros, poderiam aumentar a concentração de nitrogênio no interior de vasos xilemáticos e favorecerem a disponibilidade de nutrientes no xilema o que poderia proporcionar um aumento no ritmo de crescimento de *X. fastidiosa*. Em estudos do metabolismo do nitrogênio de *C. sinensis* cv. 'Pêra' (*C. sinensis* L. Osbeck) infectadas com *X. fastidiosa*, foram observados: os teores de compostos de nitrogênio, as enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio e as proteases na seiva do xilema de folhas de plantas sintomáticas para CVC e plantas saudáveis, que não foram infectadas por *X. fastidiosa*. Os resultados mostraram que ocorreram mudanças significativas no metabolismo do nitrogênio em plantas sintomáticas, provavelmente em resposta às alterações na absorção, assimilação e distribuição de nitrogênio na planta. Em alguns casos, foi constatado que a disponibilidade de nitrogênio tende a aumentar o crescimento de *X. fastidiosa*. Além disto, foram detectados níveis elevados da atividade de protease somente em plantas sintomáticas, que mostraram que a migração radial pode ocorrer pelo alargamento dos poros nos vasos do xilema (PURCINO *et al.*, 2007). Desta forma, a presença de bactérias do gêneros *Rhizobium* poderiam estar influenciando o aparecimento dos sintomas da ARC.

Além disso, o processo de adesão de *X. fastidiosa* supostamente envolve a presença de íons cálcio. A presença de cristais contendo cálcio foi demonstrada nos vasos do xilema de citros (TYSON *et al.*, 1985) e na superfície de culturas de *X. fastidiosa* (ALVES *et al.*, 2000). Em cafeeiros uma maior concentração de cristais de oxalato de cálcio parece reduzir o número de cloroplasto em células do mesófilo das folhas de cafeeiros sintomáticos (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1998). O envolvimento de adesina dependente de cálcio já foi relatado em bactérias do gênero *Rhizobium*, fixadoras de nitrogênio, que precisam estabelecer ligação física com as raízes das plantas (SMIT *et al.*, 1989; AUSMEES *et al.*, 2001), sugerindo que *X. fastidiosa* e bactérias do gênero *Rhizobium* poderiam estar atuando mutualisticamente para uma melhor adesão às paredes do xilema. O mecanismo de adesão é o primeiro passo e constitui um fator importante para a manifestação dos sintomas de patogênias provocadas por *X. fastidiosa*. A bactéria depois de instalada (aderida) passa a se multiplicar e produz substâncias extracelulares. Entre estas substâncias, uma grande quantidade de polissacarídeos extracelulares é secretada (goma fastidiana), que contribui para a formação de biofilme na superfície dos vasos do xilema. Sobre esse material depositam-se

mais bactérias que resultam em grandes agregados que podem interromper o fluxo regular de água e nutrientes através dos vasos, fato que pode refletir nos sintomas da doença.

Uma questão fundamental envolve o processo de formação de biofilme no sentido de promover impactos na dinâmica das interações planta-micróbio e interação de patógenos, simbiontes e comensais dentro das plantas hospedeiras. O número, conformação e viabilidade das bactérias associadas a formação e crescimento de biofilmes demonstram ser importante., tendo em vista que biofilmes são notoriamente resistentes à lavagem e outros tratamentos comuns antibacterianos. Desta forma, bactérias do gênero *Escherichia* e *Microbacterium* poderiam estar se beneficiando comensalmente da presença de biofilme nos vasos xilemáticos de *C. arabica* sintomática para ARC. Em brotos de alfafa foram encontradas populações tanto de *Escherichia coli* como de *Salmonella*. Foi observado que a remoção completa destes micro-organismos nunca foi alcançada para aqueles que residiam dentro de biofilmes e foram necessários tratamentos muito mais consistentes que a lavagem simples com água para reduzir o número de microorganismos aderidos ao biofilme (FETT, 2002; FETT, *et al.*, 2003).

Araújo *et al.* (2002b) avaliaram a ocorrência do gênero *Methylobacterium*, descrito como um importante endófito de citros, onde foi diretamente associado à ocorrência da Clorose Variegada de Citros, causada por *X. fastidiosa*. Embora os resultados obtidos neste trabalho mostrassem uma frequência de isolados com similaridade com bactérias do gênero *Methylobacterium* em plantas sintomáticas para a ARC, a proporção de isolados encontrada foi pequena, mas pode indicar que associações podem também estar ocorrendo em culturas de *C. arabica* associado à ocorrência da ARC.

Dentre os gêneros encontrados exclusivamente em plantas assintomática para ARC, *Cronobacter* e *Pseudomonas* são encontrados com maior frequência. *Pseudomonas* está entre os gêneros mais estudados como agente de controle biológico (DESNOUES *et al.*, 2003). Em estudos com endófitos de cebola, Barka *et al.* (2002) estudaram *Pseudomonas* sp. que demonstrou controlar o patógeno *Botrytis cinerea*, assim como levar à promoção de crescimento em plantas de videira. Em batata, o endófito *Pseudomonas* sp induziu o aumento do sistema radicular e do tamanho do caule (HUREK *et al.*, 2002). Bactérias podem ser de extrema importância na suplementação nutricional das plantas e na interação direta com fitopatógenos que coexistem neste ambiente (ANDREOTE *et al.*, 2006). A promoção de crescimento por bactérias endofíticas pode também ser resultado da redução da comunidade bacteriana, deletéria á planta, a qual poderia ser inibida pelos endófitos sugerindo que estas bactérias poderiam estar interagindo com *C. arabica* e com as comunidades bacterianas que

colonizam esta planta, conferindo-lhe maior resistência ao aparecimento dos sintomas da ARC.

Entre os gêneros encontrados nas duas condições estudadas (*Agreia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Luteibacter* e *Pantoea*), as bactérias encontradas com maior frequência em plantas assintomáticas mostraram similaridade com as do gênero *Pantoea* e *Enterobacter*. Estudos com a diversidade de enterobactéria endofíticas associadas a citros, eucaliptos, cana e soja sugerem que espécies de plantas podem selecionar os genótipos de bactérias endofíticas, sendo que gêneros *Pantoea* e *Enterobacter* estão entre as bactérias endofíticas mais frequentes em plantas, sugerindo que *Pantoea* e *Enterobacter* podem ser necessários a planta (TORRES *et al.*, 2008). São muitos os exemplos que citam como endófitos os gêneros *Pantoea* e *Enterobacter*. Assis; Adachi (2004) relataram o isolamento de *P. agglomerans* e *E. asburiae* como endófitos de batata doce. Araújo *et al.* (2001) isolaram bactérias endofíticas de porta enxerto de citros, dentre as quais predominaram as espécies *P. agglomerans* e *E. cloacae*. Lacava *et al.* (2004) também isolaram *P. agglomerans* e *E. cloacae* endofíticas de citros. Embora as bactérias do gênero *Pantoea* sejam consideradas cosmopolitas, elas apresentaram, neste trabalho, uma frequência expressiva em plantas assintomáticas. Estudos indicam que bactérias deste gênero são produtoras de antibiótico, como por exemplo, *Pantoea* sp. isoladas de folhas de soja produziram uma média estável de antibióticos que é ativo contra uma variedade de patógenos bacterianos. As características desta substância antibiótica não são idênticas com os antibióticos conhecidos produzidos por *Pantoea agglomerans*. Além disso, produziu dois sideróforos diferentes, sendo um identificado como ferrioxamina e um sideróforo não identificado (VÖLKSCH; SAMMER, 2008). Em um outro estudo, a proteção das mudas de macieiras antes do plantio com um isolado antagonista de *Pantoea agglomerans* foi proposta para reduzir a incidência da podridão branca da raiz da macieira, causada por *Rosellinia necatrix* (CAMATTI-SARTORI *et al.*, 2008). Assim, pode ser sugerido que bactérias do gênero *Pantoea* poderiam estar envolvidas na inibição de *X. fastidiosa* nos vasos xilemáticos de *C. arabica* porém, serão necessários estudos posteriores que confirmem esta afirmação com detalhe.

A utilização de endófitos para o controle de doenças fúngicas e bacterianas tem sido consistentemente descrita na literatura. Entretanto, até o presente momento pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na interação entre estes micro-organismos que infectam plantas. Os resultados obtidos neste trabalho são de grande importância nos estudos para o controle da doença, sugerindo a interação de uma microbiota diversa relacionada ao surgimento ou não dos sintomas da ARC.

Uma vez que micro-organismos estão envolvidos em uma série de processos que afetam a transformação de fosfato no solo e são, portanto, parte integrante do ciclo desse mineral foram realizados testes de solubilização de fosfato com as bactérias endofíticas de *C. arabica*. Micro-organismos solubilizadores de fosfato têm atraído a atenção dos agricultores como inóculo do solo para melhorar o crescimento da planta e rendimento (YOUNG, 1994; YOUNG *et al.*, 1998; GOLDSTEIN *et al.*, 1986; FASIM *et al.*, 2002). A capacidade de solubilização do fósforo pelos micro-organismos é considerada um dos traços mais importantes associados com fosfato para a nutrição da planta. O fósforo é um elemento essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente a parte aérea (GONÇALVES *et al.*, 2000). Em estágios mais avançados de crescimento a falta de fósforo pode levar a atrofia dos caules e a morte das folhas (RAVEN *et al.*, 2001). Sua função além de estrutural e funcional é imprescindível na transferência de energia. Portanto, estudo envolvendo isolados endofíticos capazes de solubilizar fosfatos pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas. A solubilização de fosfato foi verificada pela formação de halo de degradação indicativo do fósforo previamente na forma insolúvel (Figura16).

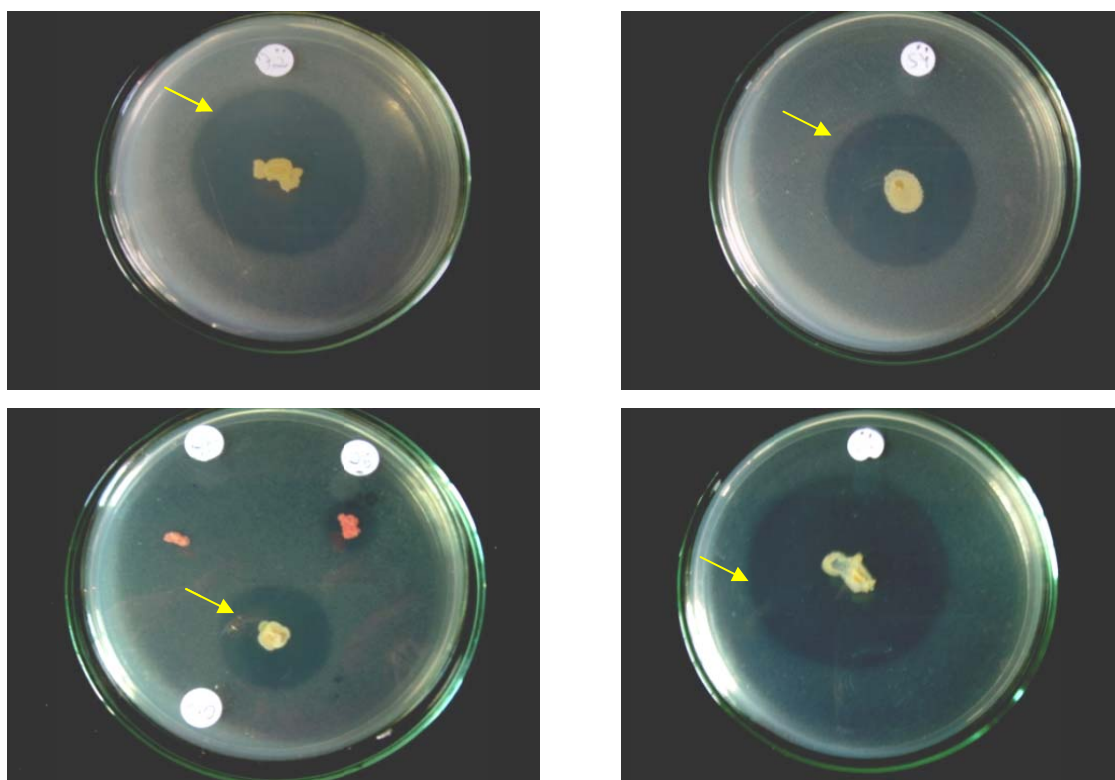


Figura 16: Formação de halo de degradação indicativo do fósforo previamente na forma insolúvel por isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo. As setas indicam os halos de solubilização de fosfato formado pela presença de isolados bacterianos.

As bactérias, provenientes do primeiro e segundo isolamento, foram submetidas ao teste de solubilização de fosfato. Os resultados mostraram que de maneira geral, não houve diferenças estatísticas entre os testes realizados com isolados obtidos no primeiro e segundo isolamentos, porém houve diferenças significativas ($P < 0,05$) na frequência de solubilizadores de fosfato entre as populações de plantas assintomática e sintomática para ARC (Tabela 11). Foi observado que 21,9% dos isolados bacterianos obtidos de plantas assintomáticas e aproximadamente 16,2% dos isolados bacterianos obtidos de plantas sintomáticas para a ARC apresentaram halo para solubilização de fosfato (Tabela 11). De maneira geral, os resultados mostram que a sintomatologia associada à ARC gera uma variação fisiológica em relação a esta população, porém este ponto deverá ser estudado mais detalhadamente para confirmação desta hipótese. Não foram observadas diferenças entre os isolados segundo a época em que foi realizado o isolamento. Dos 38,1% de isolados bacterianos que apresentaram halo para solubilização de fosfato, 47,5% foram obtidos no primeiro isolamento e 52,5% no segundo isolamento. A análise estatística apresentada na tabela 11, utilizando o teste de Tukey, para a variável “*Tamanhos dos halos de solubilização de fosfato*” determinou que os tamanhos dos halos de solubilização de fosfato foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), indicadas pelas letras representadas na tabela 11. Os índices de solubilização de fosfato para isolados bacterianos mostraram valores entre 0,5 e 5 cm, sendo que os isolados 212 e 208 apresentaram os maiores halos de solubilização de fosfato (5cm). Estes isolados revelaram similaridade com as espécies *Enterobacter cowanii* (isolado 212) e *Cronobacter sakazakii* (isolado 208), ambos obtidos de plantas assintomáticas para ARC.

Em solos, a solubilização de fosfato por bactérias é responsável por até 50% do total de fosfato disponível as plantas, enquanto que a solubilização de fosfato por fungos representa 0,1% a 0,5% do total (VAZQUEZ *et al.*, 2000). Desta forma, o estudo de isolados bacterianos obtidos de *C. arabica*, capazes de solubilizar fosfatos e aptos a colonizar à rizosfera, pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas.

Tabela 11: Índices de solubilização de fosfato por bactérias endofíticas do cafeeiro.

Isolados bacterianos	Índice	Isolados bacterianos	Índice
212*	3.83333 ^a	42**	2.1 ^{ij}
208*	3.83333 ^a	119**	2.06667 ^{kij}
206*	3.5 ^{ba}	121**	2.05 ^{kj}
138**	3.43333 ^b	45**	1.93333 ^{klj}
139**	3.33333 ^{bc}	197*	1.7 ^{klm}
49*	3 ^{dc}	44**	1.56667 ^{nlm}
67*	2.86667 ^{de}	20**	1.55667 ^{nlm}
48*	2.86667 ^{de}	47*	1.53333 ^{nm}
52*	2.76667 ^{def}	207*	1.5 ^{nm}
182*	2.76667 ^{def}	199*	1.46667 ^{nm}
68*	2.66667 ^{def}	55*	1.36667 ^{nom}
54*	2.66667 ^{def}	200*	1.26667 ^{nop}
53*	2.6 ^{gef}	34**	1.19 ^{nop}
50*	2.56667 ^{ghef}	122**	1.03333 ^{qop}
38**	2.43333 ^{ghif}	180*	0.93333 ^{qrp}
209*	2.23333 ^{ghij}	4**	0.66667 ^{qrs}
12**	2.20667 ^{hij}	149**	0.63333 ^{rs}
117**	2.2 ^{hij}	195*	0.56667 ^{rs}
192*	2.16667 ^{ij}	152**	0.56667 ^{rs}
41**	2.13333 ^{ij}	188*	0.5 ^s

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de comparação de média TuKey, a 5% de significância. Os valores indicados representam média de três repetições.

* isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas assintomática para ARC.

** isolados bacterianos de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em plantas sintomática para ARC.

4.4 Fungos endofíticos produtores de antimicrobianos

Experimentos para avaliar a produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos isolados endofíticos foram realizados em triplicata com o extrato bruto de cada um dos 218 fungos endófitos selecionado, provenientes do isolamento de plantas assintomática e sintomática para ARC, parte da planta e as diversas condições de isolamento dos fungos (meio de cultura e temperatura). Deste total, 71,1% dos isolados apresentaram reações contra uma ou mais linhagens testadas, sendo que 38,53% dos isolados apresentaram reação contra

E. coli, 22,5% contra *P. syringae*, 28,44% contra *S. aureus*, 13,3% contra *X. campestris*, 22,5% contra *C. albicans* e 7,8% dos isolados apresentaram reação contra *B. subtilis*. A partir da análise de variância, utilizando o teste de Tukey, foi possível determinar estatisticamente que os tamanhos dos halos de inibição foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dependendo do extrato bruto do fungo utilizado.

As linhagens bacterianas, *S. aureus* e *B. subtilis*, são gram positivas pertencentes ao filo *Firmicutes*. Foram comparados os resultados dos testes de antibiose, realizados com estas duas linhagens e o número de antagonismo de fungos endofíticos apresentou somente quatro reações positivas com os mesmos isolados (I6, P39, P44 e X7). Foi observado que *B. subtilis* foi menos inibido pelo sobrenadante da cultura de fungos endofíticos do cafeeiro. Porém, os resultados de inibição dos isolados fúngicos E1, L18, M10, P28, P33, P39 e M10 contra *B. subtilis* foram mais intensos, caracterizados pela produção de halos maiores, enquanto para *S. aureus* os maiores halos foram aqueles produzidos pelas linhagens P39, P44 e L16 (Tabela 12, em Apêndices).

Comparações também foram realizadas relacionando as reações positivas de antagonismo dos fungos endofíticos contra as bactérias classificadas no filo Proteobacterias gram negativas (*X. campestris*, *P. syringae* e *E. coli*). Os resultados mostraram que os isolados B2, I12, M4, P12, P39, Q13, e S7 apresentaram capacidade de antagonizar todas as três bactérias gram negativas testadas. Já os isolados P5, P47, P51, T14, W3, X7, Z1 e Z5 apresentaram reações de antagonismo positiva apenas contra *X. campestris* e *E. coli*, os isolados O6, I1 e S6 apresentaram reações positivas contra *X. campestris* e *P. syringae* e os isolados I13, N25, O2, O3, O8, P14, P33, P41, Q9, Q11, R13, S10 e S14 apresentaram reações positivas contra *P. syringae* e *E. coli*. Estes resultados permitem notar uma maior similaridade de reações positivas dos mesmos isolados fúngicos testados contra *P. syringae* e *E. coli*.

Um fator evidente foi a interpretação dos dados, os quais mostraram que, em todos os testes, o isolado endofítico de ramos de *C. arabica* assintomática para ARC, identificado por P39, apresentou forte reação inibitória, sendo capaz de inibir fortemente o crescimento de bactérias Gram positiva, Gram negativa e da levedura patogênica humana *C. albicans*. Os outros isolados testados apresentaram um halo de inibição com diâmetros menores e tamanhos variados (Tabela 13, em Apêndices). Algumas das reações de antagonismo apresentadas pelos fungos endofíticos isolados de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo contra *X. campestris*, *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus* estão representadas na figura 17.

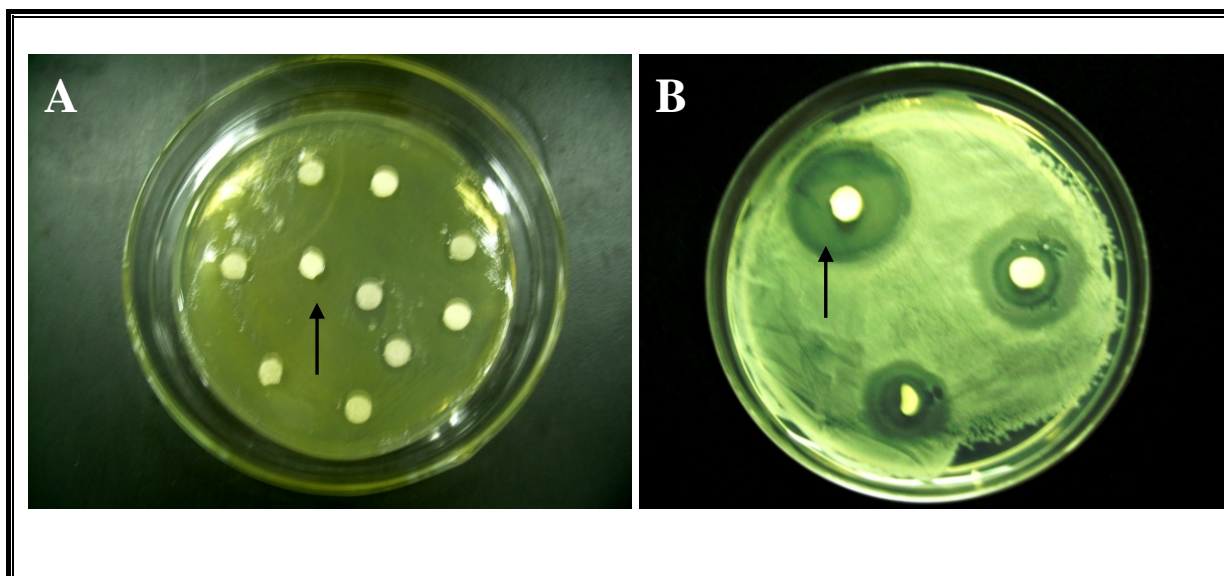


Figura 17: Halos de inibição provocados pela produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos isolados endofíticos. As setas indicam as zonas de inibição de crescimento provocada por extratos de fungos isolados contra crescimento bacteriano. Em A: teste de antibiose da amostra L19 sobre a bactéria *X. campestris*, B: amostra P39 sobre a bactéria *E.coli*.

Entre todos os isolados testados, o isolado P39 que produziu um potente composto antimicrobiano, foi identificado como *Fomes* sp. (Sin.: *Fomitopsis*), sendo possivelmente da espécie *Fomes meliae* (linhagem CBS 179.34) (Figura 18).

Fomitopsis é um gênero cosmopolita (Polyporaceae, Aphyllophorales, Hymenomycetes, Basidiomycota) e a maioria de suas espécies ocorrem nas boreais e zonas temperadas (RYVARDEN 1991, RYVARDEN; GILBERTSON, 1993). O gênero é colocado no grupo *Daedalea* entre os 12 grupos da Polyporaceae (RYVARDEN, 1991) e está agrupado filogeneticamente no grupo *Fomitopsis-Daedalea-Piptoporus* caracterizada por podridão parda (HIBBETT; THORN, 2001). O gênero é caracterizado por basidiocarpos sésseis com superfície dos poros de cor branca para cor de rosa, sistemas de hifas com braçadeiras nas hifas generativas e caracteriza-se por apresentar atividade de podridão parda em madeira viva ou morta (CARRANZA MORSE; GILBERTSON, 1986; GILBERTSON; RYVARDEN 1986) (Figura 19).

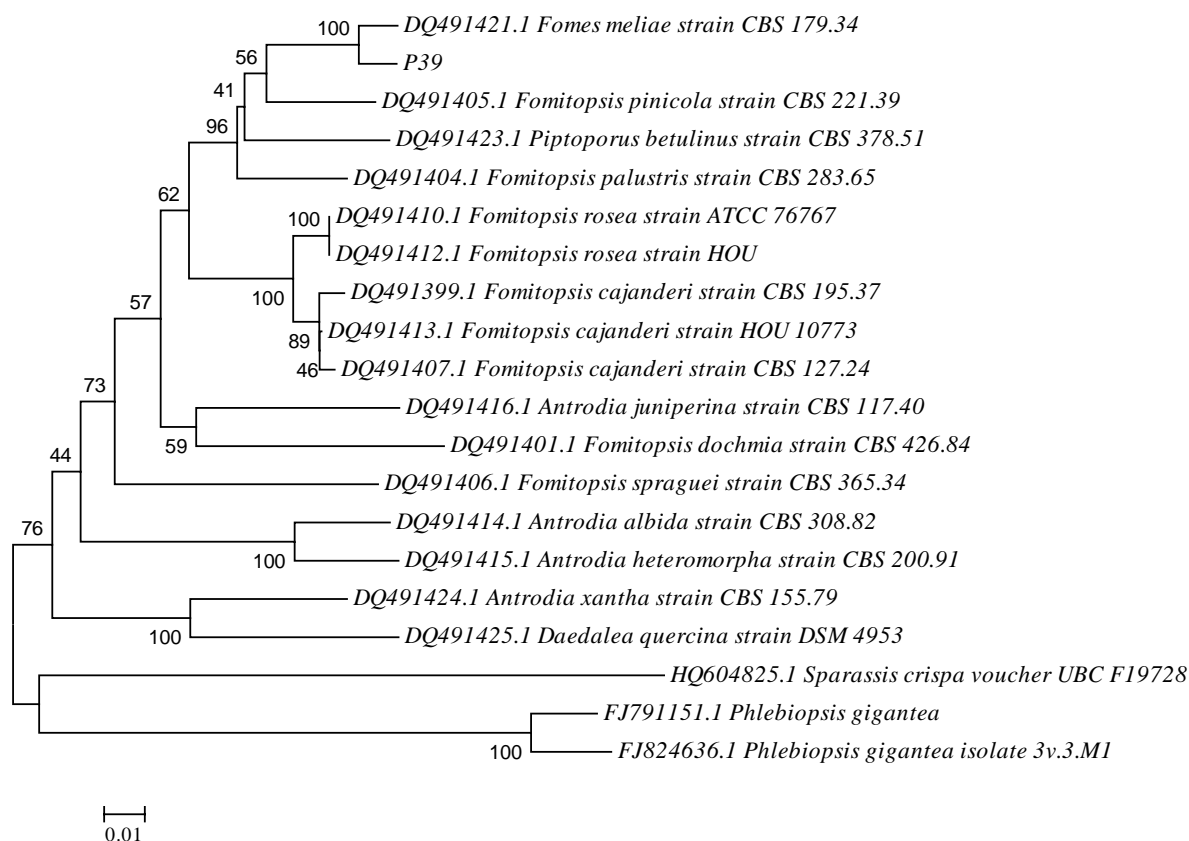


Figura 18: Árvore fenética consenso do isolado P39, *Fomes* sp. e grupos próximos, demonstrando a relação entre os grupos. A comparação foi baseada na sequência parcial do gene utilizando a região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA, computadas com o banco de dados *GenBank* e correlacionadas com base no agrupamento por *Neighbor-joining*. Sequências dos gêneros *Sparassiss* e *Phlebiopsis* foram utilizadas como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* foram estabelecidos a partir da amostragem feita com 1000 réplicas.

Este fungo não apresenta esporos e nem estruturas de reprodução, sendo que em observação microscópica são somente visualizadas hifas externas. As hifas são muito importantes para a delimitação genérica em Polyporaceae, já que muitos gêneros incluem somente espécies com o mesmo tipo de configuração de hifas. Foi possível observar que este isolado apresenta sistema hifálico dimítico (Figura 19). As hifas podem ser de dois tipos principais: generativas e somáticas, com as últimas diferenciadas em esqueléticas e conectivas. De acordo com os tipos de hifas presentes, uma espécie apresenta sistema hifálico monomítico (se com apenas hifas generativas), dimítico (se além das generativas há esqueléticas ou conectivas) ou trimítico (quando as hifas generativas, esqueléticas e conectivas estão presentes) (RYVARDEN; JOHANSEN, 1980; RYVARDEN, 1991). Hifas generativas são sempre septadas, com septo simples ou com ansa, geralmente hialinas, de parede fina e ramificadas em vários graus, próximo ou a partir do septo. As hifas somáticas

não apresentam septos. As hifas esqueléticas apresentam parede grossa a quase sólida, são longas, não ramificadas e geralmente dominantes no contexto. As hifas conectivas são, ao contrário das esqueléticas, ramificadas em vários graus dependendo do gênero e têm ápice afinado (RYVARDEN; JOHANSEN, 1980, TEIXEIRA, 1995).

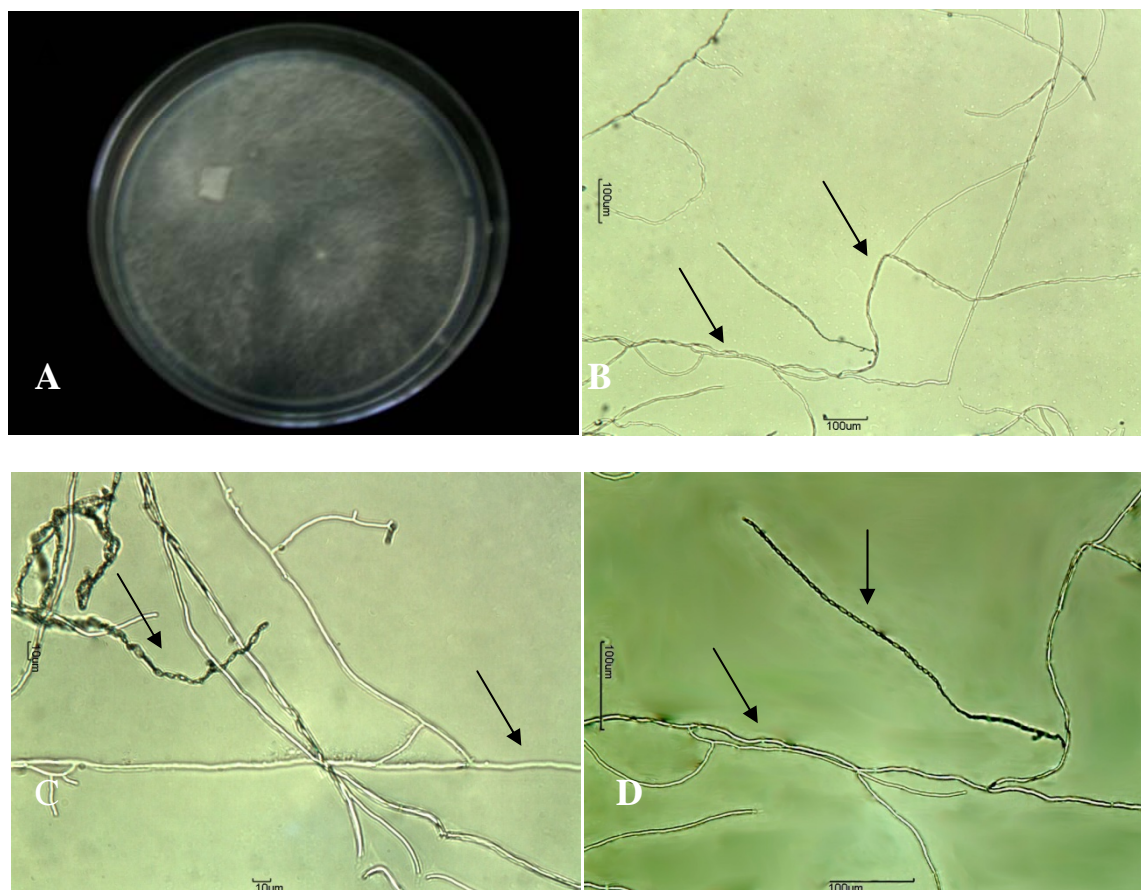


Figura 19: Aspectos morfológicos de *F. meliae*. Em A é possível observar *F. meliae* cultivado em BDA (oxoid) por 14 dias. Em B, C e D a seta indica a presença de sistema hifálico dimítico do fungo com 14 dias de crescimento. Os valores das barras de escala estão indicados na respectiva figura.

Em estudos envolvendo as mudanças na traqueídes da madeira do pinheiro durante o decaimento do fungo do gênero *Fomitopsis*, foi verificado que *F. pinicola* normalmente causa a degradação dos carboidratos da parede celular, mas raramente foi capaz de atingir uma degradação completa da parede celular, incluindo a lamela média e os cantos da célula. Isso indica que algumas de suas hifas podem ter um sistema de enzimas ligninolíticas (MESSNER; STACHELBERGER, 1984).

Algumas espécies do gênero *Fomitopsis* tem sido estudada quanto a sua capacidade em atuar como controle biológico. A análise fitoquímica do extrato em diclorometano produzido por *F. pinicolada*, revelaram a presença de cinco esteróides com atividade

antimicrobiana contra *B. subtilis* (KELLER, *et al.*, 1996). Estudos envolvendo extrato biologicamente ativo do fungo do Gênero *Fomitopsis*, espécie *F. rosea*, demonstraram a presença de um composto com atividade antibacteriana sobre *S. aureus* (TRUSHEVA, *et al.*, 2009). A capacidade de produzir compostos relacionados à regulação de processos inflamatórios por fungos do gênero *Fomitopsis* também foi estudada. Na Ásia, *F. pinicola* é usado como um fungo medicinal e sua capacidade em atuar como produtor de substâncias reguladoras do processo inflamatório foi alvo de estudo por parte dos pesquisadores (CHENG *et al.*, 2008). As análises químicas dos polissacarídeos extraídos deste fungo revelaram a presença de mio-inositol, galactose, glicose, manose e frutose. Seis compostos de nucleosídeo, incluindo citidina, monofosfato de adenosina (AMP), a adenosina difosfato (ADP), adenosina, inosina e timidina foram identificados no extrato etanólico. Estes resultados sugerem que diferentes extratos deste fungo desempenham diversos papéis na regulação do processo de angiogênese e inflamação (CHENG *et al.*, 2008).

F. pinicola também tem sido citado em estudos de biodegradação, relacionados a capacidade de degradação do 1,1,1-tricloro-2, 2-bis (4-clorofenil) etano (DDT), onde cerca de 63% do DDT total em meio de caldo batata dextrose (BDA) foi degradado por este fungo, sendo produzido somente um produto metabólico, o 1,1-dicloro-2, 2-bis (4-clorofenil) etano (DDD) (PURNOMO *et al.*, 2008; PURNOMO *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Fomitopsis* também têm sido relatados em processos de captação de ouro por biomassa fúngica, onde foi constatada uma remoção de 80% de ouro e ainda uma menor resistência à transferência de massa quando comparado com a utilização da imobilização em esferas de alginato (KHOO; TING, 2001).

O isolado endofítico P39, que apresentou forte reação inibitória contra bactérias patogênicas, foi isolado de plantas assintomáticas para a ARC, sugerindo que a produção de compostos com atividade antimicrobiana por este isolado seja um dos diversos fatores que possa contribuir para o não aparecimento dos sintomas da ARC em *C. arabica*. Muitos micro-organismos endofíticos são capazes de sintetizar compostos bioativos, estes metabólitos secundários podem ser utilizados pela planta na defesa contra fungos e bactérias fitopatogênicas. Os resultados indicam que este fungo endófito poderia ser uma fonte promissora de compostos bioativos necessitando de estudos futuros.

5 CONCLUSÕES

O objetivo geral do presente trabalho foi o de estudar a diversidade dos micro-organismos endofíticos em *C. arabica* e verificar a existência de interações positivas ou negativas entre a comunidade endofítica do cafeeiro com os sintomas de Atrofia dos Ramos de Cafeeiro (ARC). Uma amostra significativa da microbiota endofítica do cafeeiro foi isolada, caracterizada e pela primeira vez, alguns gêneros de bactérias foram identificadas como endófitas de cafeeiro. As diferenças encontradas entre a microbiota endofítica em plantas sintomática e assintomática demonstrou mais uma vez como alias já relatado pela primeira vez por Araújo *et al.*, (2002b) que o conceito de doença, em pelo menos algumas circunstâncias pode ser considerado muito mais o resultado de interações entre o principal agente causal da doença e a atuação de micro-organismos endofíticos em um sistema holístico e não reducionista como se pensava até recentemente. A presença de determinados micro-organismos endofíticos pode reduzir os efeitos de um patógeno em uma interação com benefícios mútuos entre o patógeno que continua a sobreviver em seu hospedeiro sem causar morte a planta e os endófitos que também por reduzir os efeitos do patógenos, continuam a habitar o hospedeiro usufruindo de vantagens tais como nutrição e abrigo. O próprio hospedeiro também leva vantagem desta interação, não sucumbindo ao patógeno.

Foi demonstrado também no presente trabalho, que vários endofíticos produzem agentes antimicrobianos e também são solubilizadores de fosfato, o que condicionam uma maior aptidão ao hospedeiro vegetal para desenvolver-se e ter reduzida a atuação de patógenos e predadores sensíveis aos agentes antimicrobianos. Finalmente, pode ser acrescentado que certos endófitos isolados do cafeeiro, tais como produtores de toxinas podem levar a problemas posteriores na produção de café bebida, mas pode ser sugerido também que o uso apropriado de certos endófitos, como produtores de aromas favoráveis, podem agregar valores ao fruto do cafeeiro.

REFERÊNCIAS

AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from the tea plant *Camellia sinensis*. **Journal of Natural Medicine**, v.60, p.268-272, 2006.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as na endophyte in tissue culture banana (*Musa* ssp.) **Journal Invertebrate Pathology**, v.96, p.34-42, 2007.

ALMEIDA, R. P. P.; NASCIMENTO, F.E.; CHAU, J.; PRADO, S.S.; TSAI, C.; LOPES, S.A.; LOPES, J.R.S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, p.3690-3701, 2008.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos Endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira Cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.467 - 470, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and Psi-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

ALVES, E.; MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; LEITE, B. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.291-297, 2004.

ALVES, E.; MARUCCI, R.C.; PACHOLATE, S.F.; LEITE, B. Microscopia de varredura, com microanálise de raio X, como ferramenta para estudos de cristais sobre a superfície de colônias de *Xylella fastidiosa*: relação com a adesão. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.318, 2000

ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v.24, p.4-7, 1998.

ALVES, E.; CASTRO, H.A.; GIANASE, L. Dinâmica de população fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós colheita, na região de Lavras e sua relação com a

qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXIX, Campo Grande. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 21 (suplemento), p. 345, 1996.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, p.419-426, 2006.

ANTHONY, F.; BERTRAND, B.; QUIROS, O.; WILCHES, A.; LASHERMES, P.; BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L) using molecular markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.118, p.53-65, 2001.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K. ; LACAVA, P.T. **Manual**: isolamento de micro-organismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002a, 86 p.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002b.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

ASIS, C.A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Applied Microbiology**, v.38, p.19-23, 2004.

AUSMEES, N.; JACOBSSON, K.; LINDBERG, M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. **Microbiol SGM**, v. 147, p.549-559, 2001.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and Applications of Endophytic Fungi Isolated from Tropical Plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K.. **Fungi**: Multifaceted Microbes: Nova Delhi: Anamaya Publishers, 2007.v.18, p.207-218.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I. S.; Azevedo, J.L. **Ecologia microbiana**, p. 445-461, 1998.

BACCARI, C.; LINDOW, S.E. Avaliação do Processo de Circulação de *Xylella fastidiosa* dentro de cultivares de uva suscetíveis e resistentes. **Fitopatologia**, v.1, p.77-84, 2011.

BACON, C.W.; WHITE, J.F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON, C.J.; WHITE, J.F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000, p.237-261.

BACON, C.W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.44, p.123-141, 1973.

BAILEY, J.K.; DECKERT, R.; SCHWEITZER, J.A.; REHILL, B.J.; LINDROTH, R.L.; GEHRING, C.; WHITHAM, T.G. Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. **Canadian Journal of Microbiology**, v.83, p.356-361, 2005.

BALOTA, R.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1265-1276, 1999.

BARBIERI, P.; ZANELLI, E.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasiliense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.87-90, 1986.

BARKA, E.A.; GOGNIES, S.; NOWAK, J.; AUDRAN, J.C.; BELARBIB, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, v.24, p.135-142, 2002.

BARROS, I.A. **Isolamento e biodiversidade de bactérias endofíticas de *Dicksonia sellowiana* e seu potencial biotecnológico**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia: Universidade de Mogi das Cruzes, 2003.

BARY, A. Morfologie und physiologie der Pilze, Flecheten und Myxomyceten: **Engelman**, 1866.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S.K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal of Potato Research**, v.75, p.145-152, 1998.

BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, C.M.; CHAGAS, K.S.; DERRICK, G.A.; BARTHE, T.L.; CECCARDI, M.; PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J. A first report of *Xylella fastidiosa* in coffee. **Plant Disease**, v.68, p.821, 1996.

BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G.C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.644-653, 1977.

BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R.J.; MACRAE, R. (Eds.) Coffee. London: **Elsevier Applied Science**, 1988. v.4, p.1-42.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biologic. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.v.1, p.761-785.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.1, p.15-94, 2005.

BRLANSKY, R.H.; HARTUNG J.S. Transmission of the Citrus Variegated Chlorosis Bacterium *Xylella fastidiosa* with the Sharpshooter *Oncometopia nigricans*. **Plant Disease**, v.86, p.1237-1239, 2002.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**. 6^o ed. New Jersey – USA: Prentice Hall, 1991. 874p.

BROWN, K.B.; HYDE, K.D.; GUEST, D.I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, v.1, p. 27-51, 1998.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.; HYDE, K.D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p.943-948, 2001.

CAMATTI-SARTORI, V.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; RIBEIRO, R.T.S. Desenvolvimento de *Pantoea agglomerans* em diversas temperaturas, pH e concentrações de carboxi-metil-celulose e o seu impacto no controle de *Rosellinia necatrix*. **Summa phytopathology**, v.34, p.138-142, 2008.

CARRANZA-MORSE, J.; GILBERTSON, R.L. Taxonomy of the *Formitopsi rosea* complex (Alphyllophorales; Polyporaceae). **Mycotaxon**, v.25, p.469-486, 1986.

CARROLL, G.C. Forest Endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.1316-1324, 1995.

CARROLL, G.C. **The foraging ascomycete**. Abstracts, XVI International Botanical Congress, St Louis, MO , 1999.

CARROLL, G.C. Fungal Endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiotic. **Ecology**, v.69, p.2-9, 1988.

CARROLL, G.C.; WICKLOW, D.T. The fungal community: its organization and role in the ecosystem. Switzerland: **Marcel Dekker**, 1992.

CARROLL, G. **The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials**. In: Microbiology of the phylloplane, FOKKEMA, N.J.; VAN DER HEAVEL, J.: London, UK: ed. Cambridge University Press, 1986. p.205-222.

CARVALHO, V.D. de; CHALFOUN, S.M.; CHAGAS, S.J. de R. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15,1989, Maringá, **Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química e química do grão beneficiado**. Resumos. Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989.

CHANWAY, C.P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.321-322, 1996.

CHAULFON, S.M.; CHAGAS, S.J.R.; PEREIRA, M.C. Determinação da microbiota associada externa e internamente a grãos beneficiados de café. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p.369-372, 1999.

CHAULFON, S.M.; CHAGAS, S.J.R.; CARVALHO, V.L.; SILVA, R.A.; PEREIRA, M.C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 23, 1997, Manhuaçu **Microflora associada a grãos beneficiados de café (*Coffea arabica* L.) com e sem desinfecção**. Anais., Rio de Janeiro, MARA/PROCAFE/PNFC, 1997.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Coffea* berries.** 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2002.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.13, p.234-237, 1995.

CHEN, J.; CHANG, C.J.; JARRET, R.L.; GAWEL, N. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**, v.82, p.973-977, 1992.

CHENG, J.J.; LIN, C.; LUR, H.S.; CHEN, H.P.; LU, M.K. Properties and biological Functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*. **Process Biochemistry**, v.43, p.829-834, 2008.

CIIAGRO Centro Integrado de Informações Agropecuárias. Disponível em; www.ciiagro.org.br. Acesso em: março e julho, 2009.

CIRAULO, M.B.; SANTOS, D.S.; RODRIGUES, A.C.F.O.; OLIVEIRA, M.V.; RODRIGUES, T ; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R. Transcriptome Analysis of the Phytobacterium *Xylella fastidiosa* Growing under Xylem-Based Chemical Conditions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, 18p., 2010.

COHEN, S.D. Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection pathogenicity and mycelial compatibility. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.713-721, 2004.

COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; DE SOUZA, A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4091-4095, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: janeiro, 2011.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.73, p.1510-1515, 1981.

DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.;

MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p.867-875, 2003.

DESNOUES, N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; CARREÑO-LOPEZ, R.; ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, v.149, p.2251-2262, 2003.

DONADIO, L.C; MOREIRA, C.S. **Clorose Variegada dos Citrus**. Araraquara: ed. Fundecitrus, 1997. 162p.

DOW, J.M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y.Q.; FENG, J.X.; TANG, J.L. **Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants**. USA: Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. p.10995-11000.

DURAN, E. L.; PLOPER, L.D.; RAMALHO, J.C.; PICCOLO GRANDI, R.A.; HUPPER GIANCOLI, A.C.; AZEVEDO, J.L. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p.350-355, 2005.

ESAU, K. Anatomic effects of the viruses of pierce's disease and phony peach. **Hilgardia**, Berkeley, v.18, p.423-482, 1948.

ESPINOSA-GARCIA, F.J.; LONGENHEIN, J.H. The leaf fungal endophytic community of a coastal red wood population - diversity and spatial patterns. **New Phytologist**, v.116, p.89-98, 1990.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; DA SILVA, C.F.; STEFANELO, D.R.; DA ROCHA, E.K. Fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on cucumber grown in greenhouse. **Fitopatologia brasileira**, v.30, p.127-133, 2005.

EVANS, H.C.; HOLMES, K.A.; THOMAS, S.E. Endophytes and myoparasites associated with an indigenous Forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa disease. **Mycology Program**, v.2, p.149-160, 2003.

FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.B.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARLSON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study in industry. In: **Microbial Ecology of Leaves**. Springer-Verlag, New York, p.402-411, 1991.

FASIM, N.A.; PARSON, R.; GADD, G.M. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology**, v.213, p.1-6, 2002.

FEIL, H.; PURCEL, A.H. Temperature-dependent growth and survival of *X. fastidiosa* *in vitro* and in Potted Grapevines. **Plant Disease**, v.85, p.1230-1234, 2001.

FETT, W.F.; COOKE, P.H. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on laboratory-inoculated alfalfa seed with commercial citrus-related products. **Journal of Food Protector**, v.66, p.1158-1165, 2003.

FETT, W.F. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. on laboratory-inoculated Mung bean seed by chlorine treatment. **Journal of Food Protector**, v.65, p.848-852, 2002.

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, p.299-305, 1992.

FREITAG, J.H. Host range of the Pierce's disease of virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, v.41, p.920-934, 1951.

FRENCH, W.J.; STASSI, D.L. Response of phony - infected peach trees to gibberellic acid. **HortScience**, v.13, p.158-159, 1978.

GILBERTSON, R.L.; RYVARDEN, L. North American Polypores. **Synopsis Fungorum**, v.1, p.1-433, 1986.

GOLDMAN, R.N.; KIRÁLY, A.; WOOD, K.R. **The Biochemistry and Physiology of Plant Disease**. Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433 p.

GOLDSTEIN, A.H.; BRAVERMAN, K.; OSORIO, N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) bacterium, **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology**, v.3, p.295-300, 1986.

GONÇALVES, J.L.M; BENEDETTI, V.(Ed.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p.310-350

GOODWIN, P.H.; DEVAY J.; MEREDITH, E.C.P. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of grapevine. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.32, p.1-15, 1988.

GRIFFITHS, E.; GIBBS, J.N.; WALLER, J.M. Control of coffee berry disease. **Annual Applied Biology**, v.67, p.45-74, 1971.

GROSSMAN, M.; DOW, J.M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, v.6, p.623-629, 2004.

GUERREIRO-FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner, *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, p.1447-1464, 2000.

HAHLBROCK, K.; BEDNAREK, P.; CIOLKOWSKI, I.; HAMBERGER, B.; HEISE, A.; LIEDGENS, H.; LOGEMANN, E.; NURNBERGER, T.; SOMSSICH, I.E.; TAN, J. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.25, p.14569-14576, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; OEPPER, J.W. Bacterial Endophytes In: Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HARVEY, P.J.; CAMPANELLA, B.F.; CASTRO, P.M.; HARM, H.; LICHTFOUSE, E.; SCHAFFNER, A.R.; SMRCEK, S.; WERCK-REICHHART, D. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.9, p.29-47, 2002.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied Environmental Microbiology**, v.8, p.3233-3241, 1997.

HIBBETT, D.S.; THORN, R.G. **Homobasidiomycetes**. In: MC LAUGHLIN, D.J.; MC LAUGHLIN, E.G.; LEMKE, PA; eds. Systematics and Evolution. Part B. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v.7, p.121-170.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v.85, p.209-212, 1995.

HOITINK, H.A.J.; BOEHM, M.J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.427-446, 1999.

HOPKINS, D.L.; ADLERZ, W.C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, v.72, p.429-431, 1988.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, v.75, p.713-717, 1985.

HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, v.71, p.415-418, 1981.

HOPKINS, D.L.; PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v.86, p.1056-1066, 2002.

HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v.179, p.298-300, 1973.

HUREK, B.R.; DÖRR, J.; EGENER, T.; MARTIN, D.; HUREK, T. Interactions of Diazotrophic *Azoarcus* spp. with rice **Plant Scienc and Biotechnology in Agriculture**, v.38, p.405-408, 2002.

ISHIDA, M.L.; ANDERSEN, P.C.; LEITE, B. Effect of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay xylem fluid on cecropin B activity against *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.64, p.73-81, 2004.

ITOL Interactive tree of life. Disponível em (<http://itol.embl.de/>). Acesso em: novembro, 2010.

JONES, K.D. **Aspects of the biology and biological control of the European corn borer in North Carolina**. Tese doutorado- Departamento of Entomology, North Caroline State University, p.127, 1994.

KELLER, A.C; MAILLARD, M.P.; HOSTETTSMANN, K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. **Ecological biochemistry**, v.41, p.1041-1046, 1996.

KHOO, K.M.; TING, Y.P. Biosorption of gold by immobilized fungal biomass **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.51-59, 2001.

KRUG, H.P. Cafés duros I. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v.15, n.159, maio 1940a.

KRUG, H.P. Cafés duros II. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v.15, n.163, setembro 1940b.

KRUG, H.P. Cafés duros III. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v.15, n.165, novembro 1940c.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. p.46-95, 1995.

KUBICEK, C.P.; BISSETE, J.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRADINGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, v.17, p.69-90, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v.273, p.91-99, 2005.

LACAVAL, P.T.; SILVA-STENICO, M.E.; ARAÚJO, W.L.; SIMIONATO, A.V.C.; CARRILHO, E.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L. Detection of siderophores in Endophytic bacteria *Methylobacterium spp.* associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.521-528, 2008.

LACAVAL, P.T.; LI, W.B.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Evaluation of Endophytic Colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* Seedlings by Endophytic Bacteria. **Journal of Microbiology**, v.45, p.11-14, 2007.

LACAVAL, P.T.; LI, W.B.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium

Methylobacterium mesophilicum in plants. **Journal of Microbiological Methods**, v.65, p.535-541, 2006a.

LACAVA, P.T.; LI, W.B.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.637-642, 2006b.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.55-59, 2004.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M.R.; MORENO, V. Isolation and analysis of endophytic micro-organisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.683-686, 2002.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus Variegated Chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as casual agent. **Summa Phytopathology**, v.19, p.123-125, 1993.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; HOOKER, M.E. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis - a new disease of citrus in Brazil. **Proceeding of the Florida State for Horticultural Society**, v.105, p.32-35, 1992.

LEE, R.F.; RAJU, B.C.; NYLAND, G.; GOHEEN, A.C. Phytotoxin (s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.72, p.886-888, 1982.

LEIGH, J.A.; COPLIN, D.L. Exopolysaccharide in plant-bacterial interactions. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.307-346, 1992.

LEITE, B.; ISHIDA, M.L.; ALVES, E.; CARRIER, H.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W. Genomic and X-raymicroanalysis indicate that Ca^{++} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v.35, p.645-650, 2002.

LEITE JUNIOR, R.P.; NUNES, L.M. **Avanços nas pesquisas sobre *Xylella fastidiosa* do café no Brasil**. In L. Zambolim (Ed.), Viçosa: Produção integrada de café, DFP, 2003. 709 p.

LEITE JUNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com Clorose Variegada dos Citrus. **Summa Phytopathology**, v.22, p.58-63, 1991.

LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; BRLANSKY, R.H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R.; CARLOS, E.F. Coffea leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v.82, p.135-136, 1995.

LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R.; CARLOS, E.F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.392-393, 1996.

LINS, S.R.O.; ABREU, M.S.; ALVES, E.; BARBOSA, J.F.; SOUZA, R.M. Report of *Xylella fastidiosa* in petioles and hypocotyls of coffee plants with symptoms of Buttery spot. **Ciência Agrotecnológica**, v.32, p.42-47, 2008.

LIU, C.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v.88, p.277-282, 2001.

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP**, v.9, p.291-338, 2001.

MÀRQUES, L.M.; REDMAN, R.S.; RODRIGUES, R.J.; ROOSSINCK, M.J. A virus in a fungus in a plant - three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, v.315, p.513-515, 2007.

MARTINS, M.K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira.** Tese de Doutorado: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

MARUCCI, R.C.; GIUSTOLIN, T.A.; MIRANDA, M.P.; FERRAZ, P.C.; LOPES, J.R.S. In: II SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 2001, Vitória, **Transmissão de *Xylella fastidiosa* para café pela cigarrinha *Dilobopterus costalimai*.** Anais. Brasília: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2001

MC ELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal Experiment Botany**, v.54, p.106-108, 2003.

MEDINA-FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Melhoramento do cafeeiro. XXXVII. Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho mineiro. **Bragantia**, Campinas, v.36, p.131-137, 1977.

MEHNAZ, S.; MERZA, M.S.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; BANO, A.; MALIK, K.A. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.110-117, 2001.

MEHTA, A.; ROSATO, Y.B. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rRNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.311-318, 2001.

MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais**. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1990.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Juguariúna, SP: ed. EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v.2, p.212-385.

MELO, I.S.; VALADARES-INGLES, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Micro-organismos**. Campinas: EMBRAPA Meio Ambiente, 2002. v.1, 743p.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. **Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007. v.1, p.129-140.

MESSNER, K.; STACHELBERGER, H. Transmission electron microscope observations of brown rot caused by *Fomitopsis pinicola* with respect to osmiophilic particles. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, p.113-130, 1984.

MINARD, P. Cloning of genes required for hypersensitivity and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. aptata. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.67, p.201-210, 1995.

MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, p.456-461, 1994.

MIRCETICH, S.M.; LOWE, S.K., MOLLER, W.J.; NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, v.66, p.17-24, 1976.

MOLLENHAUER, H.A.; HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiological Plant Pathology**, v.9, p.95-100, 1976.

MONÉ, S.F.; RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; DOCAMPO, D. Enzyme - linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. **Phytopathology**, v.70, p.746-749, 1980.

MONTEIRO-ASTÚA, M.; CHÁCON-DIAZ, C.; AGUILAR, E.; RODRÍGUEZ, C.M.; GARITA, L.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L.; HARTUNG, J.S.; RIVERA, C. Isolation and molecular characterization of *Xylella fastidiosa* from coffee plants in Costa Rica. **Journal of Microbiology**, v.46, p.482-490, 2008.

MURTY, M.G.; LADHA, J.K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, v.108, p.281-285, 1988.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - GeneBank. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/index.html>. Acesso em: junho-dezembro, 2009.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceeding of the National Academy of Science - USA**, v.10, p.1737-1742, 2004.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Use of a Green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7319-7327, 2003.

PAIÃO, F.G.; NOVAES, T.G. de; ROSSINI, V.; MOTOMURA, K.F.; LOVATO, L.; MENEGUIM, A.M.; LEITE JÚNIOR, R.P. In: III SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2003, Porto Seguro. **Presença de *Xylella fastidiosa* em quatro espécies de cigarrinhas da família Cicadellidae coletadas em viveiros de café no Estado do Paraná**. Anais. Brasília: Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, 2003.

PARADELA FILHO, O.; PARADELA, A.L.; THOMAZIELLO, R.A.; RIBEIRO, I.J.A.; SUGIMORI, M.H.; FAZUOLI, L.C. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. (Boletim Técnico, 191), Campinas: IAC, 2001. 11 p.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JUNIOR, A.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAWA, R.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S. Constatação da *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Suma Phytopathologica**, v.23, p.46-49, 1997.

PARADELA FILHO, O; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JUNIOR, A.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAWA, R.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros (CVC), em cafeeiros. **Suma Phytopathologica**, v.21, p.67, 1996.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993.

PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In Endophytic Fungi in Grasses and Wood Plants. **American Phytopathological Society Press**, p.87-100, 1996.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves**. In: Microbial ecology of leaves. ANDREWS, J.; HIRANO, S.S.(Eds.), New York: Spring-Verlag, 1991. p.179-197.

PIERCE, N.B. **The California Vine Disease**. USDA, Division of Vegetal Pathology Bulletin, n. 2, 1982.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strain causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.

POOLER, M.R.; MYUNG, I.; BENTZ, J., SHERALD, J.; HARTUNG, J.S. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.23-126, 1997.

POSADA, F.; AIME, M.C.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; VEGA, S.E. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota; Hypocreales). **Mycological Research**, v.111, p.749-758, 2007.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P. Essay – the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.384-392, 2007.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, v.4, p.393-395, 1979.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.131-151, 1996.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H.; MC - CLEAN, D.L. Pierce's disease bacterium mechanism of transmission by leafhopper vectors. **Science**, v 206, p.839-841, 1979.

PURCINO, R.P.; MEDINA, C.L.; SOUZA, D.M.; WINCK, F.V.; MACHADO, E.C.; NOVELLO, J.C.; MACHADO, M.A.; MAZZAFERA, P. *Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange *Citrus sinensis* cv. Pêra **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.2733-2744, 2007.

PURNOMO, A.S.; MORI, T.; KONDO, R. Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by brown-rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, p.560-565, 2010.

PURNOMO, A. S.; KAMEI, I.; KONDO, R. Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.105, p.614-621, 2008.

QUADTHALLMANN, A.; BENHAMOU, N., KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: Location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 254-259, 1997.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.; FAZUOLI, L.C. Efeitos da *Xylella fastidiosa* em cafeeiro em diferentes regiões edafoclimáticas. **Bragantia**, v. 64, p. 89-100, 2005a.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; CABRAL, L. P.; FAZUOLI, L. C.; PARADELA FILHO, O. Avaliação da suscetibilidade à *Xylella fastidiosa* em diferentes espécies de cafeeiro. **Bragantia**, v.64, p.615-624, 2005b.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; CABRAL, L.P.; PARADELA FILHO, O. Comparações sazonais do efeito da *Xylella fastidiosa* em cultivares do cafeeiro. **Bragantia**, v.63, p.381-393, 2004.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.L. Aspectos estruturais de cafeeiros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, v. 57, p. 23-33, 1998.

QUESADA-MORAGA, E.; VEY, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycobiology Research**, v. 108, p.441-452, 2004.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters In Applied Microbiology**, v.1, p.17-20, 1985.

RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; FRAZIER, N.W. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. **Phytopathology**, v.73, p.1309-1313, 1983.

RAMIRO, D.A.; GUERREIRO-FILHO, O.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; MATHIESSEN, S.C. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis ao bicho mineiro. **Bragantia**, v. 63, p.363-372, 2004.

RAVEN, H.P.; EVERT, F.R.; EICHHORN, E.S. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A, 2001.p. 698-719.

READ, D.J. **Mycorrhiza – the state of the art**. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). *Mycorrhiza*. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p.3-34.

REDAK, R.A., PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL, R.F.; AQNDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid feeding insect vector of *Xylella fastidiosa* and their interaction to disease epidemiology. **Annual Review Entomology**, v.49, p.243-270, 2004.

REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, R.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. **Science**, v.298, p.1581, 2002.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, Who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, v.151, p.705-716, 2001.

REDMAN, R.S.; RANSON, J.C.; RODRIGUEZ, R.J. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magma* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.969-975, 1999.

REIS, V.M.; PAULA, M.A.; DÖBEREINER, J. Ocorrências de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1933-1941, 1999.

RICKETTS, T.H.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R.; MICHENER, C.D. Economic value of tropical forest to coffee production. **The National Academy of Sciences-Ecology**, v.34, p.12579-12582, 2004.

RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Micological Research**, v.94, p.827 - 830, 1990.

RODRIGUES, K.F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi**. University of Hong Kong Press, p.57-69, 1997.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R.S. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.1109-1114, 2008.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; LEIDI, E.O. Interaction effects between *Rhizobium* strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition. **European Journal of Agronomy**, v.11, p.131-143, 1999.

ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence des bactéries dans le xylème d'oranges atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris**, v.310, p.345-349, 1990.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R. dos; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v.1, p.24-33, 2005.

RYAN, R.P.; FOUHY, Y.; LUCEY, J.F.; CROSSMAN, L.C.; SPIRO, S.; HE, Y.W.; ZHANG, L.H.; HEEB, S.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P., *et al.* Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.103, p.6712-6717, 2006.

RYVARDEN, L. Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy. **Synopsis Fungorum**, v.5, p.1-363, 1991.

RYVARDEN, L.; GILBERTSON, R. L. **European Polypores**. Oslo: fungiflora, 1993. v.2, 387p.

RYVARDEN, L.; JOHANSEN, I. **A preliminary flora of East Africa**. Oslo: fungiflora, 1980. 636p.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v.50, p.1-8, 2005.

SANTOS, L.C. **Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico**. 121p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

SARTORI, D. **Marcadores moleculares para detecção de espécie de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A em grãos de café**. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

SCHIEBER, E.; ZENTMYER, G.A. Coffee rust in the western hemisphere. **Plant Disease**, v.68, p.89-93, 1984.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7537-7541, 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The Endophytic Continuum. Review, **Cambridge University Press**, v.109, p.661-686, 2005.

SETTE, L.D., PASSARINI, M.R.Z., DELARMELINA, C., SALATI, F., DUARTE, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.1185-1195, 2006.

SHERALD, J.L.; LEI, J.D. Evaluation of a rapid ELISA test Kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. **Plant Disease**, v.75, p.200-203, 1991.

SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting Endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v.63, p.32-39, 2006.

SILVA, H.S.A.; TERRASAN, C.R.F.; TOZZI, J.P.L.; MELO, I.S.; BETTIOL, W. Endophytic bacteria inducing enzymes correlated to the control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, v.33, p.49-54, 2008.

SILVA, M.R.L.; MENEGUIM, A.M.; PAIÃO, F.G., MENEGUIM, L.; CANTERI, M.G.; LEITE JR, R.P. Infectividade Natural por *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* de Cicadélíneos

(Hemiptera: Cicadellidae) de Lavouras Cafeeiras do Paraná. **Neotropical Entomology**, v.36, p.274-281, 2007.

SILVA, F.S. **Diversidade microbiana em grãos de (*Coffea arabica* L.) processados por via seca nas pré e pós-colheita**. 105 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SIMO - Sapelo Island Microbial Observatory. Disponível em: <http://www.simo.marsci.uga.edu/>. Acesso em: novembro, 2010.

SMIT, G.; LOGMAN, T.J.; BOERRIGTER, M.E.; KIJNE, J.W.; LUGTENBERG, B.J. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarium* biovar viciae Ca²⁺ - dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. **Journal Bacteriology**, v.171, p.4054-4062, 1989.

SÔNIGO, O.R.; BOTTON, M.; MAIA, J.D.G.; GARRIDO, L.R. Doenças e pragas. In.: MAIA, J.D.G.; KUHN, G.B. **Cultivo da Niagara rosada em áreas tropicais do Brasil**. Bento Gonçalves: ed. Embrapa Uva e Vinho, 2001. p.45-63.

SOUZA, A.Q.L.; ASTOLFI FILHO, S. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v.34, p.185-195, 2004.

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. **Microbial Endophytes**, v.3, p.30, 2000.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **American Society of Microbiology News**, v.67, p.491-502, 2003.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TANG, J.L.; LIU, Y.N.; BARBER, C.E.; DOW, J.M.; WOOTTON J.C.; DANIELS, M.J. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Molecular and General Genetics**, v.22, p.409-417, 1991.

TEIXEIRA, A.R. **Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos**. Manual n.6. São Paulo: Instituto de Botânica, 1995. 20p.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **Journal of Microbiology**, v.46, p. 373-379, 2008.

TRUSHEVA, B.; GYOSHEVA, M.; TSVETKOVA I.; BANKOVA, V.; POPOVA, M. Antibacterial triterpenes from the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea*. **Fitoterapia**, v.80, p.263-266, 2009.

TYSON, G.E.; STOJANOVIC, B.J.; KUKLINSKY, R.F.; DIVITORIO, T.J.; SULLIVAN, M.L. Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. **Phytopathology**, v.75, p.264-269, 1985.

VARMA, A.; SUDHA, S.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*-a cultivable plant growth promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2741-2744, 1999.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BRASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460-468, 2000.

VEGA, F.E.; SIMPKINS, A.; AIME, M.C.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; REHNER, S.A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A.E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico e Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v.3, p.122-138, 2010.

VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M.C.; PAVA-RIPOLI, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v.46, p.72-82, 2008.

VEGA, F.E.; RIPOLL, M.P.; POSADA, F.; BUYER, J.S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p. 371-380, 2005.

VERMA, M.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y.; VALÈRO, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoly of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p. 1-20, 2007.

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.

VINING, L.C.; KELLEHER, W.J.; SCHWARTING, A.E. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. **Canadian Journal Microbiology**, v.8, p.931-933, 1962.

VÖLKSCH, B.; SAMMER, U. Characterization of the Inhibitory Strain *Pantoea* sp. 48b/90 with potential as a biocontrol agent for bacterial plant pathogens. **Microbial**, v.2, p.111-116, 2008.

WANG, L.H.; HE, Y.; GAO, Y.; WU, J.E.; DONG, Y.H.; HE, C.; WANG, S.X.; WENG, L.X.; XU, J.L.; TAY, L.; *et al.* A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. **Molecular Microbiology**. v.51, p.903-912, 2004.

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3468-3473, 2000.

WEBSTER, G.; GOUGH, C.; VASSE, J.; BATCHELOR, C.A.; O'CALLAGHAN, K.J.; KOTHARI, S.I.; DAVEY, M.R.; DÉNARIÉ, J.; COCKING, E.C. Interactions of *rhizobia* with rice and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.115-122, 1997.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.

WHITE, T.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. New York: Academic Press, 1990. p.315-322

YORINORI, M.A.; RIBAS, A.F.; UENO, B.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; LEITE JÚNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.427-430, 2003.

YOUNG, C.C.; CHANG, C.H.; CHEN, L.F.; CHAO, C.C. Characterization of the nitrogen fixing and ferric phosphate solubilizing bacteria isolated from Taiwan soil. **Agricultural Chemistry**, v.36, p.201-210, 1998.

YOUNG, C.C. Selection and application of biofertilizers in Taiwan. **Food and Fertilizer Technology Center, Tech. Bull.** v.141, p.1-9, 1994.

ZHOU, D.; HYDE, K. Host-specificity, host-exclusivity and host-recurrence in saprobic fungi. **Mycological Research**, v.105, p.1449-1457, 2001.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, N.; HARRIS, B.; FENG, Z.; KUEZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.

APÊNDICE A – Frequência de isolados fúngicos em folhas e ramos de *C. arabica*

Tabela 12: Frequência de gêneros de fungos endofíticos isoladas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo em folhas e ramos de plantas assintomática e sintomática para a ARC.

GÊNERO	Folha assintomática	Folha sintomática	Ramo assintomático	Ramo sintomático.	TOTAL
<i>Aspergillus</i>	0.2307	0.25	0.159574	0.088235	0.171271
<i>Cochliobolus</i> (Teleomorfo <i>Curvularia</i>)	0	0	0.085106	0	0.044199
<i>Colletotrichum</i> (Teleomorfo <i>Glomerella</i>)	0.3076	0.4	0.234043	0.147059	0.259669
<i>Coprinellus</i>	0	0	0.021277	0	0.01105
<i>Corioloropsis</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Cyttaria</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Diaporthe</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Fomes</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Fusarium</i> (teleomorfo <i>Gibberella</i>)	0	0.2	0.159574	0.558824	0.232044
<i>Guignardia</i>	0.0769	0.025	0	0	0.01105
<i>Lecythophora</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Meruliaceae (familia)</i>	0.0769	0	0.010638	0	0.01105
<i>Nodulisporium</i>	0	0.05	0	0	0.01105
<i>Penicillium</i>	0	0.025	0.010638	0	0.01105
<i>Peniophora</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Pezicula</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Phanerochaete</i>	0.1538	0	0	0	0.01105
<i>Phellinus</i>	0	0	0.010638	0	0.005525
<i>Phomopsis</i>	0	0.025	0.010638	0.029412	0.016575
<i>Pichia</i>	0.1538	0.025	0.053191	0.088235	0.060773
<i>Schizophyllum</i>	0	0	0.021277	0	0.01105
<i>Trichoderma</i> (teleomorfo <i>Hypocrea</i>)	0	0	0.138298	0.088235	0.088398
<i>Valsaria</i>	0	0	0.010638	0	0.005525

APÊNDICE B - Resultados do experimento de antagonismo

Tabela 13: Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar.

Linhagens	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
A2	-	-	-	0.76667 ^{ed}	-	-
A3	0.9 ^{fheig}	-	-	-	-	-
A4	-	1.03333 ^{fcebdg}	0.68333 ^{klj}	-	-	-
A5	-	0.65 ^{klj}	-	-	-	-
B1	-	0.66 ^{hklj}	0.68333 ^{klj}	-	0.7 ^{fbeed}	-
B2	0.8167 ^{fheig}	-	0.65 ^{klj}	0.98333 ^{cb}	-	0.6667 ^h
D4	-	-	0.96667 ^{bedc}	-	-	-
E1	-	-	-	-	0.5 ^{gh}	2.45 ^{bc}
E2	0.9667 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
E3	1.1333 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
E4	-	1.1 ^{cebd}	0.85 ^{fhedcig}	-	-	-
G02	-	0.9 ^{flcjeikhdg}	0.88333 ^{fhedcg}	-	0.88333 ^{ba}	-
G04	-	0.80000 ^{fljeikhdg}	-	-	-	-
G12	-	-	1.08333 ^{ba}	-	-	0.8833 ^{hg}
G17	-	0.96667 ^{fceibhdg}	-	-	-	-
G31	-	1.01667 ^{fceibhdg}	-	-	-	-
I1	-	-	1 ^{bdc}	0.86667 ^{cebd}	-	-
I12	1.05 ^{fhdeicg}	-	0.98333 ^{bedc}	0.8 ^{ced}	-	-
I13	1.0167 ^{fhdeicg}	-	0.95 ^{fbedc}	-	-	-

(continua na próxima página).

Tabela 13: Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar.
(continuação)

Linhagens	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilies</i>
I14	-	0.58333 ^{lk}	0.63333 ^{kl}	-	-	-
I2	-	-	-	-	0.6 ^{fgedh}	-
I20	-	0.91667 ^{fcjeikhdg}	-	0.81667 ^{cebd}	-	-
I21	0.8333 ^{fheig}	-	-	-	0.58333 ^{fgeh}	-
I22	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
I3	-	-	-	0.81667 ^{cebd}	0.7 ^{fbedc}	-
I4	-	-	-	-	0.58333 ^{fgeh}	-
I6	1.2833 ^{fbdecg}	1.1 ^{cebd}	-	-	-	0.75 ^{hg}
I8	0.9333 ^{fheig}	0.65 ^{ljik}	-	-	-	-
I9	0.9667 ^{fhdeicg}	0.7 ^{fcjeikhdg}	0.96667 ^{bedc}	-	0.7 ^{fbedc}	-
L16	1.0167 ^{fhdeicg}	1.16667 ^{cb}	-	-	0.61667 ^{fgecdh}	-
L18	-	-	-	-	-	2.9667 ^a
L19	-	-	-	0.81667 ^{cebd}	-	-
L4	-	-	-	-	0.56667 ^{fgeh}	-
L5	-	-	-	-	0.51667 ^{fgh}	-
M1	-	0.73333 ^{fljikhg}	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	2.15 ^c
M12	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-

(continua na próxima página).

Tabela 13: Ensaios de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar.
(continuação)

Linhagens	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
M4	0.9 ^{fheig}	0.95 ^{fcjeibhdg}	0.96667 ^{bedc}	0.75 ^e	-	-
M5	-	0.95 ^{fcjeibhdg}	-	0.91667 ^{cebd}	-	-
M6	1.0333 ^{fhdeicg}	-	-	-	0.5 ^{gh}	-
M7	0.9833 ^{fhdeicg}	0.96667 ^{fceibhdg}	-	0.78333 ^{ed}	-	-
M8	-	0.95 ^{fcjeibhdg}	-	-	0.5 ^{gh}	-
N21	-	-	0.83333 ^{fhedijg}	-	-	-
N25	1.0333 ^{fhdeicg}	-	0.6 ^l	-	-	-
N27	0.9 ^{fheig}	-	-	-	-	-
N30	-	-	-	-	0.58333 ^{fgeh}	-
N31	-	-	0.9 ^{fbedcg}	-	-	-
N34	0.7 ^{hi}	0.91667 ^{fcjeikhgdg}	-	-	-	-
N35	-	-	0.81667 ^{fhedijg}	-	-	-
N38	-	-	-	-	0.61667 ^{fgecdh}	-
N40	1.1333 ^{fhdeicg}	0.75 ^{fljeikhg}	-	0.85 ^{cebd}	-	-
N41	-	0.73 ^{fljikhg}	-	-	0.68333 ^{fgecd}	-
N43	0.8 ^{fhig}	-	-	-	-	1 ^{hegf}
O1	-	-	-	-	0.8 ^{bc}	-

(continua na próxima página).

Tabela13: Ensaios de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar. (continuação)

<i>Linhagens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
O16	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
O2/1	0.7833 ^{hig}	-	0.81667 ^{fhkdiyg}	-	-	-
O3	1 ^{fhdeicg}	-	0.71667 ^{hklijg}	-	0.53333 ^{fgeh}	-
O4	1.0833 ^{fhdeicg}	0.75 ^{fljeikhg}	-	-	-	-
O6	-	0.85 ^{flcjeikhdg}	0.81667 ^{fhkdiyg}	1 ^b	-	-
O7		0.65 ^{ljik}				
O8	0.9833 ^{fhdeicg}	-	0.63333 ^{kl}	-	-	1.2167 ^{egdf}
O9	0.65 ⁱ	-	-	-	-	-
P10	0.8 ^{fhig}	-	-	-	-	-
P11	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	0.5 ^{gh}	-
P12	1.1 ^{fhdeicg}	-	1 ^{bdc}	0.86667 ^{cebd}	0.7 ^{fbecd}	-
P13	1.1833 ^{fhdecg}	1.06667 ^{fcebd}	-	-	-	-
P14	1.3167 ^{bdec}	-	0.76667 ^{fhklijg}	-	-	-
P15	-	0.95 ^{fcjeibhdg}	0.93333 ^{fbedc}	-	-	-
P16	-	0.93333 ^{fcjeikhdg}	0.88333 ^{fhedcg}	-	-	-
P17	1.7333 ^{ba}	-	0.96667 ^{bedc}	-	0.5 ^{gh}	-

(continua na próxima página).

Tabela 13: Ensaios de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar. (continuação)

Linhagem	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
P02	-	-	-	0.83333 ^{cebd}	0.63333 ^{fgedh}	-
P04		0.6833 ^{lijkhg}				
P05	0.95 ^{fhdeig}	0.91667 ^{fcjeikhdg}	-	0.88333 ^{cebd}	-	-
P20	1.1167 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
P24	-	-	-	0.88333 ^{cebd}	-	-
P28	-	-	-	-	-	2.75 ^{ba}
P29	-	-	-	-	-	1.5 ^{ed}
P31	1.05 ^{fhdeicg}	-	-	-	0.58333 ^{fgeh}	-
P33	0.9833 ^{fhdeicg}	-	0.88333 ^{fhedcg}	-	0.6 ^{fgedh}	1.4667 ^{edf}
P34	0.8 ^{fhig}	-	-	-	-	-
P39	1.8333 ^a	2.25 ^a	1.2 ^a	2.53333 ^a	1 ^a	2.4667 ^{bac}
P40	-	-	0.76667 ^{fhkljg}	-	-	-
P41	1.0333 ^{fhdeicg}	-	0.93333 ^{fbedc}	-	0.78333 ^{bcd}	-
P43	-	-	-	0.88333 ^{cebd}	-	-
P44	-	1.3 ^b	-	-	-	1.1167 ^{hegdf}
P46	1.05 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-

(continua na próxima página)

Tabela 13: Ensaios de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar. (continuação)

Linhagem	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
P47	1.2 ^{fhdecg}	-	-	0.86667 ^{cebd}	0.56667 ^{fgeh}	-
P51	1.0167 ^{fhdeicg}	-	-	0.81667 ^{cebd}	-	-
P52	1.0833 ^{fhdeicg}	-	0.73333 ^{hklijg}	-	0.78333 ^{bcd}	-
P54	-	0.6 ^{ljk}	0.7 ^{hklij}	-	-	-
P56	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
P57	0.7833 ^{hig}	-	-	-	-	-
P06	0.8667 ^{fheig}	-	-	-	-	-
P07	-	0.93333 ^{fcjeikhdg}	-	-	0.55 ^{fgeh}	-
P09	1 ^{fhdeicg}	0.65 ^{ljik}	0.83333 ^{fhedijg}	-	0.53333 ^{fgeh}	-
Q10	0.65 ⁱ	-	-	-	-	-
Q11	0.8167 ^{fheig}	0.88333 ^{flcjeikhdg}	0.8 ^{fhelijg}	-	-	-
Q13	0.8833 ^{fheig}	-	0.71667 ^{hklijg}	0.9 ^{cebd}	0.6 ^{fgedh}	-
Q14	1.45 ^{bdac}	-	-	-	-	-
Q15	-	0.83 ^{lcjeikhdg}	-	0.95 ^{cbd}	-	-
Q17	0.7333 ^{hi}	-	-	-	-	-

(continua na próxima página)

Tabela13: Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar. (continuação)

Linhagem	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Q20	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
Q21	0.8833 ^{fheig}	-	-	-	-	-
Q22	0.9333 ^{fheig}	-	-	-	-	-
Q04	-	-	-	-	0.56667 ^{fgeh}	-
Q08	0.9833 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
Q09	0.8 ^{fhig}	-	0.71667 ^{hkljg}	-	-	-
R10	-	1.06667 ^{fcebd}	-	-	-	-
R12	0.9833 ^{fhdeicg}	0.95 ^{fcjeibhdg}	-	-	0.71667 ^{becd}	-
R13	0.9333 ^{fheig}	0.95 ^{fcjeibhdg}	0.93333 ^{fbedc}	-	-	-
R16	-	0.8333 ^{fcjeikhgd}	-	-	0.5 ^{gh}	-
R8	1.4667 ^{bac}	-	-	-	-	-
S01	0.9333 ^{fheig}	-	-	-	-	0.7833 ^{hg}
S06	-	-	1.03333 ^{bac}	0.93333 ^{cebd}	-	1 ^{hegf}
S07	0.9167 ^{fheig}	1.01667 ^{fcbehgd}	0.95 ^{fbedc}	0.85 ^{cebd}	-	-
S09	0.9333 ^{fheig}	-	-	-	-	-

(continua na próxima página)

Tabela13: Ensaio de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar.
(continuação)

Linhagem	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
S10	0.8 ^{fhg}	-	1 ^{bdc}	-	0.48333 ^h	-
S11	0.9667 ^{fhdeicg}	0.9 ^{flcjeikhdg}	-	-	-	-
S14	0.8167 ^{fheig}	-	0.96667 ^{bedc}	-	-	-
S15	0.9833 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
S16	-	0.95 ^{fcjeibhdg}	-	-	0.45 ^h	-
S6		0.83333 ^{flcjeikhdg}				
S7		1.01667 ^{fcebhdg}				
T7		0.8833 ^{flcjeikhdg}				
T11	0.9833 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
T14	1 ^{fhdeicg}	0.96667 ^{fceibhdg}	-	0.9 ^{cebd}	0.5 ^{gh}	-
T15	-	-	-	-	0.53333 ^{fgeh}	-
T17	-	0.95 ^{fcjeibhdg}	-	-	-	-
T19	0.7833 ^{hig}	0.85000 ^{flcjeikhdg}	-	-	0.5 ^{gh}	-
T22	-	-	0.76667 ^{fhklijg}	-	-	-
T25		0.70000 ^{ljikhg}				
T26	-	1.11667 ^{cbd}	-	-	0.5 ^{gh}	-
T27	0.9167 ^{fheig}	1.15 ^{cbd}	-	-	0.5 ^{gh}	-
U1	0.9167 ^{fheig}	-	-	-	0.5 ^{gh}	-

(continua na próxima página)

Tabela13: Ensaios de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar. (continuação)

Linhagem	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
U4		0.95 ^{fcjeibhdg}			0.55 ^{cjfgh}	
U7	-	0.95 ^{fcjeibhdg}	-	-	-	-
U10	1.1833 ^{fhdecg}	-	-	-	-	-
U12	1.1167 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
U13	1 ^{fhdeicg}	-	-	-	-	-
V10	-		0.65 ^{klj}	-	-	-
V11	-	-	0.8 ^{fhkijg}	-	-	-
V12	-	0.9 ^{flcjeikhgdg}	-	-	0.51667 ^{fgh}	-
W3	1.0833 ^{fhdeicg}	-	-	0.83333 ^{cebd}	-	-
X7	1.0833 ^{fhdeicg}	0.9 ^{flcjeikhgdg}	0.96667 ^{bedc}	0.9 ^{cebd}	-	0.9833 ^{hgf}
X8	0.8833 ^{fheig}	0.95 ^{fcjeibhdg}	0.65 ^{klj}	-	-	-
X9	0.8 ^{fhig}	-	-	-	-	1.5667 ^d
X 10		0.73333 ^{fljikhg}				
X12	-	0.6 ^{ljk}	0.68333 ^{klij}	-	-	-
X13	-	-	0.93333 ^{fbcdc}	-	0.6 ^{fgedh}	-
Z1	1.1167 ^{fhdeicg}	-	-	0.85 ^{cebd}	0.58333 ^{fgeh}	-
Z3	0.7 ^{hi}	-	-	-	0.6 ^{fgedh}	-

(continua na próxima página)

Tabela 13: Ensaios de antagonismo de linhagens endofíticas de *C. arabica* cv. Bourbon Amarelo pelo método difusão em ágar. (continuação)

Linhagem	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas syringie</i>	<i>Xantomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Z5	1.0167 ^{fhdeicg}	-	-	0.83333 ^{cebd}	-	-
Z7	-	-	-	-	0.68333 ^{fgecd}	-
Z8	1.3 ^{fbdec}	0.55-	-	-	-	-
Z13	-	0.88333 ^{flcjeikhdg}	0.95 ^{fbdec}	-	0.61667 ^{fgecdh}	-

Médias pertencentes à mesma coluna e seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de comparação de média TuKey, a 5% de significância. Os valores indicados representam média de três repetições.

**APÊNDICE C - Sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do
rRNA dos isolados fúngicos M06 e N43**

Tabela 14: Sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA dos isolados fúngicos M06 e N43 que apresentaram similaridades com Meruliaceae sp.

Isolados	Sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rRNA
M06	AAACCCCTGTGCACTTATTGTAGGCTTGGTGGGATAGGCTGACTT TCACTAGTCGGTCTTGAAAGCTTCGCCTATGTTTTAATACAAACG CTTCAGTTTAGAATGTAATCATTGCTAACAAGCAAATTAATATA ACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAG CATGCCTGTTTGAGTGTATGGTATCATCAACCTTCAACACTTTTG TGATTGAAGGCTTGGATTTGGAGGTTGTGTCGGTGCATTTGTATC GGCTCCTCTGAAATGTATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCG GTGTGATAATTACTGCGCCGTGGACGTGAAGTATAACAGTGTTTCG TGCTTACAATCGTCTTTAACAGAGACAACATTTTGACAATCTGAC CTC
N43	AAACCCCTGTGCACTTATTGTAGGCTTAGTGGGATAGGCTGACTT TCACTAGTCGGTCTTGAAAGCTTCGCCTATGTTTTAATACAAACG CTTCAGTTTAGAATGNAATCATTGCTAACAAGCAAATTAATACA ACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC AGCGNAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCNNAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAG CATGCCTGTTTGAGTGTATGGTATCATCAACCTTCAACACTTTTG TGATTGAAGGCTTGGATTTGGAGGTTGTGTCGGNGCATTTGTATC GGCTCCTCTGAAATGTATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCG GTGTGATNATTACTGCGCCGTGGACGTGAAGTATAACAGTGTTTCG TGCTTACAATCGTCTTTAACAGAGACAACACTTTAGACAATCTGA CCTCAAATCAGGGTAGGATTACCCGCTGAAC