

CÁSSIA CAMARGO HARGER SAKIYAMA

**Colonização de *Coffea arabica* L. por Bactérias
Endofíticas Promotoras de Crescimento**

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

CÁSSIA CAMARGO HARGER SAKIYAMA

**COLONIZAÇÃO De *Coffea arabica* L. POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

Ao meu esposo Ney.

Aos meus filhos Felipe, Elisa e Larissa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dirigir meus caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao professor Daison Olzany Silva, pela orientação, amizade, entusiasmo pela pesquisa e testemunho de fé.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Célia de Alencar Moraes, pelos conselhos.

Ao professor José Mário da Silveira Mezencio, pelo desprendimento e pela orientação na condução dos experimentos com anticorpos.

Aos professores Laércio Zambolim e Ney Sussumu Sakiyama e ao pesquisador Antônio Teixeira Cordeiro, pelo apoio e disponibilização de materiais e equipamentos do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro/Bioagro.

À pesquisadora Maria Rita Campos, pela amizade e pelo auxílio na condução dos experimentos com explantes de Catuaí Vermelho e Apatã.

Às professoras Marisa Vieira de Queiroz e Flávia Maria Lopes Passos e à pesquisadora Virgínia Maria Chaves Alves, pela disponibilidade e atenção constantes.

Aos professores Sílvia das Graças Pompolo e João Marcos de Araújo, pelo auxílio nos estudos microscópicos.

Ao pesquisador Antônio Alves Pereira, pelo incentivo e entusiasmo com a pesquisa com café.

Aos colegas Pollyanna, Otávio, Evandro e André, pela amizade, auxílio, dedicação e companheirismo durante os experimentos com endofíticos.

Aos colegas Ann, Leonardo, Ximena, Maurício, Olinto, Leandro, Wellington e Anderson, pela amizade e auxílio.

Aos técnicos José Luiz Soares Monteiro e Fernando Lélis Xavier, pelo apoio na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pelo apoio constante.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor e incentivo.

Aos meus sogros, pelo exemplo e apoio.

Aos irmãos da Igreja Presbiteriana de Viçosa, pelas orações e amizade em Cristo.

Ao meu esposo Ney, pelo amor, carinho, compreensão e por me fazer mais feliz a cada dia.

Aos meus filhos Felipe, Elisa e Larissa, pelas alegrias e pela benção que são em minha vida.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CHARACTERIZATION OF PECTIN LYASE PRODUCED BY AN ENDOPHYTIC STRAIN ISOLATED FROM COFFEE CHERRIES	20
MICROBIOTA ENDOFÍTICA E EPIFÍTICA DE FRUTOS DE <i>Coffea arabica</i> L.	32
COLONIZAÇÃO DE <i>Coffea arabica</i> L. POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO.....	48
CONCLUSÕES GERAIS	71

RESUMO

SAKIYAMA, Cássia Camargo Harger, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2001. **Colonização de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento.** Orientador: Daison Olzany Silva. Conselheiros: Arnaldo Chaer Borges e Célia Alencar de Moraes.

Os protocolos de esterilização superficial e de isolamento de bactérias endofíticas foram estabelecidos para frutos e caules de café arábica. Um isolado bacteriano produtor de pectina liase extracelular foi fisiologicamente e fenotipicamente caracterizado. A incidência de microbiota epifítica e endofítica foi constatada em amostras de frutos de café arábica oriundas de diferentes localidades. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram isolados, sendo em Viçosa 1.042 isolados epifíticos e 282 potencialmente endofíticos, em Serra do Salitre 71 isolados epifíticos e 28 potencialmente endofíticos e em Patrocínio 85 isolados epifíticos e 33 potencialmente endofíticos. As bactérias foram isoladas em maior número, sendo que os bastonetes predominaram sobre os cocos e, dentre os bastonetes, as bactérias Gram negativas. A colonização de explantes de *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas foi demonstrada *in situ* pela técnica de imunofluorescência e comprovada pela recuperação das bactérias após sua reintrodução. Cinco isolados de bactérias endofíticas promoveram o crescimento de explantes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, indicando que a sua interação não é espécie-específica.

ABSTRACT

SAKIYAMA, Cássia Camargo Harger, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2001. **Colonization of *Coffea arabica* L. by growth promoting endophytic bacteria** Adviser: Daison Olzany Silva. Committee members: Arnaldo Chaer Borges and Célia Alencar de Moraes.

Endophytic bacteria isolation and superficial sterilization protocols were established for fruit and stem of Arabica coffee. An extracellular pectin lyase producing bacterium was physiologically and phenotypically characterized. The epiphytic and endophytic microbiota was detected from different coffee fruits samples: 1.042 epiphytic and 282 potentially endophytic isolates from Viçosa, 71 epiphytic and 28 potentially endophytic isolates from Serra do Salitre, and 85 epiphytic and 33 potentially endophytic isolates from Patrocínio.

The number of bacteria isolates was higher than yeasts or molds, and Gram negative rods were predominant. The endophytic colonization of *Coffea arabica* L. seedlings was observed *in situ* by immunofluorescence technique and the bacteria were recovered upon seedling reintroduction. Five endophytic bacteria isolates showed plant growth-promotion in both *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, indicating a non species-specific interaction.

INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias endofíticas têm sido encontradas em tecidos de numerosas espécies vegetais colonizando-os de forma ativa, local ou sistemicamente, ou em estado latente. Esse tipo de interação planta-bactéria parece ocorrer na maioria, senão em todas, as espécies vegetais. Bactérias endofíticas são aquelas que não causam danos visíveis à planta, e podem ser isoladas ou extraídas de tecidos vegetais superficialmente esterilizados (HALLMANN et al., 1997a). Esta conceituação inclui simbiontes, os quais, entretanto, não foram abordados neste trabalho.

As pesquisas relacionadas a interações planta-microorganismos remontam ao fim do século XIX, quando os trabalhos de Pasteur e outros contribuíram para o desenvolvimento do conceito clássico, já superado, de que os tecidos de plantas assintomáticas são isentos de microrganismos (HOLLIS, 1951). Em 1926, Perotti, citado por HALLMANN et al. (1997a), relatou a existência de bactérias em raízes de plantas sadias e propôs a idéia de que as bactérias não patogênicas podem habitar tecidos vegetais. Desde então, as bactérias denominadas como endofíticas têm sido isoladas de várias plantas, a exemplo de batata (HOLLIS, 1951), pepino (SAMISH et al., 1963), soja e feijão (MUNDT & HINKLE, 1976), citros (GARDNER et al., 1982), alfafa (GAGNÉ et al., 1987), cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), pêra (WHITESIDES & SPOTTS, 1991), milho (FISHER et al., 1992), algodão e milho doce (McINROY & KLOPPER, 1995), uva (BELL et al., 1995), café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), canola e trigo (SICILIANO et al., 1998),

Picea glauca (SHISHIDO et al., 1999), *Pinus sylvestris* (PIRTILLÄ et al., 2000) e arroz (GYANESHWAR et al., 2001), entre outras.

A entrada de bactérias no tecido vegetal pode ocorrer via estômatos, lenticelas, ferimentos, áreas de emergência de raízes laterais e radículas em germinação (HUANG, 1986). No entanto, as principais portas de entrada de bactérias parecem ser os ferimentos (SPRENT & DE FARIA, 1988; HALLMANN et al., 1997a), os pelos radiculares ou entre as células epidérmicas intactas. As bactérias endofíticas produtoras de celulases e de pectinases também podem penetrar de forma ativa, por degradarem enzimaticamente a parede celular de células vegetais (BENHAMOU et al., 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997). Bactérias endofíticas podem colonizar plantas a partir de sementes (PLEBAN et al., 1995), de material vegetativo (DONG et al., 1994), de comunidades epifíticas da rizosfera (LAMB et al., 1996; MAHAFFEE & KLOEPPER, 1997) e do filoplano (BEATTIE & LINDOW, 1995).

A colonização interna do tecido vegetal por bactérias endofíticas pode ser em um tecido específico, como o córtex radicular, ou pode ser sistêmica, por transporte através do sistema vascular ou do apoplasto (HUREK et al., 1994; QUADT-HALLMANN et al., 1997; JAMES et al., 1997). Em geral, as bactérias endofíticas colonizam os espaços intercelulares (QUADT-HALLMANN & KLOEPPER, 1996; CHELIUS & TRIPPLETT, 2000; BACILIO-JIMENEZ et al., 2001), mas há relatos de bactérias colonizando células vegetais intracelularmente (HUREK et al., 1994; QUADT-HALLMANN & KLOEPPER, 1996; PIRTTILÄ et al., 2000). Nos relatos de colonização endofítica do sistema vascular (BELL et al., 1995; LAMB et al., 1996; JAMES et al., 1997; OLIVARES et al., 1997) não se demonstra de forma definitiva se o tecido vascular se constitui apenas em canal de transporte para as bactérias endofíticas ou se elas se multiplicam nesse sistema.

Na prática, atribui-se o caráter endofítico às bactérias isoladas a partir de tecidos vegetais superficialmente estéreis, ou seja, os processos de esterilização superficial delimitam o *habitat* endofítico. Teoricamente, todo contaminante da superfície do material vegetal deve ser eliminado no processo de esterilização superficial sem afetar a microbiota endofítica. Os agentes sanitizantes podem penetrar no tecido vegetal e, por isso, os procedimentos

devem assegurar a redução dessa penetração e garantir uma esterilização superficial eficaz (HALLMANN et al., 1997a).

O material vegetal do qual serão isoladas as bactérias endofíticas deve ser sadio, para se evitar o isolamento de bactérias patogênicas. O processo de esterilização superficial compreende as fases de pré-lavagem, esterilização e lavagem. Com a pré-lavagem se objetiva a redução da microbiota superficial e a remoção de sujidades, para aumentar a efetividade do agente sanificante. Ela é feita com água de torneira, água destilada ou com soluções de tampões salinos estéreis. Os tampões salinos são utilizados para se equilibrar a pressão osmótica e prevenir a difusão passiva dos agentes desinfetantes (BACON & HINTON, 1997). A esterilização superficial é realizada por agitação vigorosa do material vegetal em um ou mais agentes sanificantes, a exemplo do etanol, peróxido de hidrogênio, cloramina T, água sanitária comercial, hipoclorito de sódio ou de cálcio. Detergentes como Tween 20, Tween 80 ou Triton X-100 podem ser adicionados à solução sanificante com a finalidade de reduzir a tensão superficial e permitir que o sanificante atinja os sítios protegidos da superfície vegetal. A concentração do sanificante e o tempo de exposição devem ser determinados para cada tipo de material vegetal. Após a esterilização superficial, os agentes sanificantes devem ser removidos por sucessivas lavagens em soluções tampão e água destilada estéreis.

A eficiência do processo de esterilização superficial deve ser monitorada para cada amostra do material vegetal, porque as bactérias fortemente aderidas ou embebidas em mucilagens da superfície vegetal podem resistir ao tratamento químico e serem erroneamente isoladas como endofíticas (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). Os controles da esterilização superficial podem ser: incubação do material vegetal em caldo nutriente (GAGNÉ et al., 1987), plaqueamento em meio nutriente de alíquotas da última água de lavagem (McINROY & KLOPPER, 1995), ou pressionamento do material superficialmente estéril na superfície de um meio nutriente (MUSSON et al., 1995).

O método de isolamento de bactérias endofíticas mais comumente empregado é o da trituração (HALLMANN et al., 1997a). Após a esterilização superficial, o tecido vegetal é triturado, em condições assépticas, com auxílio

de pistilo ou gral de porcelana, liquidificador ou pulverizador de tecidos, em água destilada, soluções tampão ou meio de cultivo líquido estéreis. O material triturado é, então, diluído e inoculado em meios seletivos ou não-seletivos de cultura e inoculado sob diversas condições de ambiente. A temperatura e o tempo de incubação para o isolamento de bactérias endofíticas devem ser, respectivamente, 25 a 30°C e 24 a 72 h (BACON & HINTON, 1997). Uma metodologia alternativa à trituração consiste em cortar o material vegetal superficialmente estéril em pedaços pequenos, com auxílio de bisturi e pinça flambados, sendo que cada pedaço é incubado em meio líquido ou pressionado sobre a superfície de um meio nutriente sólido.

A metodologia de centrifugação foi utilizada para extrair bactérias endofíticas a partir de fluido vascular e intercelular de cana-de-açúcar (DONG et al., 1994). Esta metodologia também requer a esterilização superficial do material vegetal. Por outro lado, a extração de bactérias endofíticas pode ser realizada com metodologias que não requerem a esterilização superficial. Por exemplo, a seiva do xilema de raízes de videira (BELL et al., 1995) e citros (GARDNER et al., 1982) foram extraídas utilizando-se a técnica de extração a vácuo e a seiva de algodão (HALLMANN et al., 1997b) utilizando-se a bomba de pressão Scholander. A extração de bactérias endofíticas dos espaços intercelulares e vasculares é mais seletiva que o isolamento por trituração. As técnicas a vácuo e pressão podem ser empregadas apenas em materiais vegetais lenhosos, enquanto as metodologias de trituração e centrifugação podem ser utilizadas para materiais vegetais mais tenros.

As metodologias de isolamento ou extração de bactérias endofíticas a partir de tecidos vegetais superficialmente estéreis demonstram de forma indireta a colonização endofítica. Após o isolamento, as bactérias potencialmente endofíticas devem ser reintroduzidas na mesma espécie vegetal. O caráter endofítico pode ser confirmado pelo reisolamento dessas bactérias e pela sua localização *in situ*. Portanto, estudos detalhados sobre a ocorrência de bactérias dentro dos tecidos da planta requerem técnicas que facilitem a observação da interação microorganismo-planta *in loco* e a diferenciação entre a bactéria de interesse e a microbiota indígena. Segundo REINHOLD-HUREK & HUREK (1998), para se comprovar que uma

determinada bactéria é capaz de colonizar endofiticamente espécies vegetais, devem ser realizados estudos microscópicos. Embora técnicas de microscopia óptica e de microscopia eletrônica tenham sido utilizadas para reconhecer e localizar bactérias endofíticas (DONG et al., 1994; JAMES et al., 1994), os estudos microscópicos devem ser criteriosos: (a) deve-se prevenir que bactérias da superfície do órgão vegetal contaminem o interior dos tecidos durante a preparação dos cortes histológicos e (b) as bactérias visíveis no tecido vegetal, especialmente de plantas cultivadas em solo não estéril, devem ser identificadas *in situ* por métodos imunológicos, por sondas gênicas específicas ou por genes marcadores.

Métodos imunológicos para detecção e identificação de bactérias no ambiente têm adquirido uma importância crescente em ecologia microbiana (SCHLOTTER et al., 1995), por permitirem acompanhar os microrganismos em seus *habitats*. Os métodos imunológicos de detecção baseiam-se no reconhecimento tridimensional de epítomos de macromoléculas biológicas por anticorpos monoclonais ou policlonais, que podem ser produzidos contra imunógenos solúveis ou fazendo parte da célula intacta, em animais como ratos, coelhos ou cabras.

A localização *in situ* de bactérias endofíticas tem sido realizada combinando-se técnicas de imunologia com microscopia óptica, de epifluorescência, confocal, ou eletrônica. A técnica de imunofluorescência, na qual o anticorpo primário ou o anticorpo secundário é marcado com um fluoróforo foi utilizada para localização, por microscopia confocal, de *Rhizobium leguminosarum* em raízes de *Zea mays*, *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* e *Lupinus albus* (SCHLOTTER et al., 1997). Por outro lado, a técnica *imunogold*, na qual o anticorpo primário é acoplado a moléculas de ouro, foi empregada para detectar a presença de *Herbaspirillum*, por microscopia eletrônica, em cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997) e sorgo (JAMES et al., 1997). QUADT-HALLMANN & KLOEPPER (1996) recomendam que, mesmo com o emprego de microscopia eletrônica, as bactérias endofíticas devem ser identificadas imunologicamente para não serem confundidas com organelas de células vegetais.

Sondas de oligonucleotídeos baseadas na seqüência codificadora de RNA ribossomal 16S (AMANN et al., 1995) têm sido utilizadas para análise e identificação de microrganismos específicos. Sondas baseadas em rDNA 16S marcadas com digoxigenina foram utilizadas para visualizar, por hibridização *in situ*, a colonização de gemas de *Pinus sylvestris* L. por *Pseudomonas synxantha* e *Methylobacterium extorquens* (PIRTTILLÄ et al., 2000). Uma metodologia que utiliza simultaneamente anticorpos marcados com fluorescência e sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas baseadas em rRNA foi desenvolvida com o objetivo de detecção *in situ* de bactérias que habitam a rizosfera (AßMUS et al., 1997). As técnicas moleculares podem também ser utilizadas para detectar a presença de bactérias endofíticas em determinados tecidos vegetais, além de serem ferramentas úteis para a observação da interação planta-bactéria *in loco*. Por exemplo, a presença de *Azoacus* sp em raízes e brotações de arroz previamente inoculadas com essa bactéria foi confirmada, por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se *primers* específicos para eubactéria (HUREK et al., 1994). A principal vantagem das técnicas moleculares, imunológicas ou por sondas gênicas, é a sua capacidade em detectar tanto os microrganismos cultiváveis como os não cultiváveis.

Entre os sistemas de genes marcadores que permitem a identificação microscópica de bactérias, o gene da β -galactosidase (*lac Z*) de *Escherichia coli* (SILHAVY & BECKWITH, 1985), o gene β -glucuronidase (*gus*) de *E. coli* (JEFFERSON et al., 1987) e o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) de medusa *Aequorea victoria* (CHALFIE et al., 1994) têm sido utilizados, sob o controle de promotores constitutivos, para localizar microrganismos associados a plantas. Um protocolo foi desenvolvido para detecção de *Azospirillum* em associação com trigo, utilizando fusões do gene *lac Z* a genes *nif* (ARSÈNE et al., 1994). O sistema *gus* foi empregado para a localização *in situ* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em folhas de *Arabidopsis thaliana* (HUGOUVIEUX et al., 1998) e de *Ralstonia solanacearum* em xilema de tomateiro (ETCHEBAR et al., 1998). O sistema *gfp* foi utilizado para detectar a expressão de genes *nif* de *Azoarcus* sp BH72 em associação com raízes de arroz (EGENER et al., 1998). A colonização de raízes por *Klebsiella*

pneumoniae marcada com o gene *gfp* foi observada em milho (CHELIUS & TRIPLETT, 2000).

As maiores densidades populacionais de bactérias endofíticas, autóctones ou introduzidas, são normalmente observadas na raiz e na parte inferior do caule, havendo um decréscimo do caule até a folha (LAMB et al., 1996; QUADT-HALLMANN & KLOEPPER, 1996). As bactérias endofíticas apresentam níveis de densidade populacional bem menores que os níveis conhecidos para bactérias patogênicas. As populações endofíticas indígenas na maioria das espécies vegetais investigadas variam de 10^2 a 10^6 UFC/g de tecido fresco, enquanto a média das densidades populacionais de bactérias endofíticas introduzidas varia de 10^3 a 10^5 UFC/g de tecido vegetal. Independente do inóculo inicial, as populações endofíticas tendem a alcançar densidades ótimas dependendo do tecido vegetal (HALLMANN et al., 1997a). A quantificação das populações endofíticas introduzidas ou indígenas pode ser realizada por técnicas de plaqueamento em meios seletivos ou não-seletivos (GAGNÉ et al., 1987; McINROY & KLOEPPER, 1995), colorações viáveis (BASHAN & HOLGUIN, 1997; BELL, 1995), imunofluorescência combinada a plaqueamento *pour-plate* (IFC – *Immunofluorescent Colony Staining*) (MAHAFEE et al., 1997) e auto-radiografia (PLEBAN et al., 1995).

Por possuírem a capacidade de colonizar tecidos internos de plantas, as bactérias endofíticas possuem vantagem ecológica sobre as bactérias com capacidade de colonização apenas epifítica. Os tecidos vegetais internos constituem um *habitat* mais protegido e uniforme que as superfícies externas e a competição por nutrientes é menor. No entanto, a comunidade endofítica é uma estrutura dinâmica influenciada por fatores bióticos (outros microrganismos, parasitas e planta hospedeira) e abióticos (nutrientes e outros fatores químicos e físicos do ambiente). Portanto, o estabelecimento e a manutenção de populações endofíticas introduzidas são influenciados pelos mesmos fatores que afetam a sanidade da planta. O conhecimento da dinâmica de populações de bactérias endofíticas, ou seja, como essas bactérias interagem, colonizam e sobrevivem na planta, contribui para a sua utilização na agricultura visando o aproveitamento dos seus efeitos benéficos. Dentre os efeitos benéficos das bactérias endofíticas às plantas, podem ser

citados: promoção do crescimento, controle biológico de vários patógenos, indução de resistência sistêmica a doenças, aumento da tolerância a estresse ambiental e fixação de nitrogênio.

A promoção de crescimento pode ocorrer em função da produção, pelas bactérias endofíticas, de reguladores de crescimento da planta, como auxinas, citocininas e etileno. Estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* produtoras de ácido indol acético foram isoladas de cana-de-açúcar (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993). Bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rósea (PPFMs – *Pink-Pigmented Facultative Methylophs*), geralmente associadas a plantas epifiticamente, são produtoras de citocininas (HOLLAND, 1997) e têm sido isoladas como endofíticas a partir de folhas de citros (ARAÚJO et al., 2001) e de gemas de *Pinus sylvestris* (PIRTILLÄ et al., 2000). As bactérias endofíticas podem promover o crescimento vegetal por aumentarem a absorção de minerais, como observado em estirpes de *Pseudomonas* produtoras de sideróforos que promoveram o alongamento de raízes em pepino (De BELLIS & ERCOLANI, 2001). A colonização endofítica de *Picea glauca* por *Bacillus polymyxa* e *Pseudomonas fluorescens*, duas bactérias amplamente reconhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR – *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), foi demonstrada por CHANWAY et al. (2000). *Bacillus insolitus*, uma bactéria endofítica de plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), promove nodulação quando co-inoculada com *Rhizobium leguminosarum* potencializando assim os efeitos benéficos de fixação de N e da simbiose *Rhizobium/planta* (STURZ et al., 1997).

O emprego das bactérias endofíticas como agentes de controle biológico tem sido proposto, por colonizarem nichos ecológicos semelhantes aos dos patógenos de plantas. A atividade endofítica antifúngica foi observada em experimentos em casa-de-vegetação, onde a incidência de doença causada por *Rhizoctonia solani* foi reduzida em aproximadamente 50% quando as plântulas foram inoculadas com isolados de *Bacillus* (PLEBAN et al., 1995). A atividade antagonista de bactérias endofíticas foi observada contra a bactéria causadora de podridão anular em batata (VAN BUREN et al., 1993).

O controle biológico de patógenos de plantas pode também ser resultado de indução de resistência sistêmica na planta pela presença de

bactérias endofíticas. A bactéria endofítica *Serratia plymuthica*, por exemplo, induz resistência sistêmica em pepino conferindo proteção contra infecção por *Pythium ultimum* (BENHAMOU et al., 2000). Há algumas evidências de que as bactérias endofíticas podem também contribuir para o controle de nematóides e insetos parasitas de plantas. A formação de associações complexas entre bactérias endofíticas e o nematóide da espécie *Meloidogyne incognita* foi verificada em algodão (HALLMANN et al., 1998) e o biocontrole por bactérias epifíticas e endofíticas foi estudado para *Eldana saccharina*, agente causador de broca da cana-de-açúcar (DOWNING et al., 2000).

Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio, denominadas diazotróficas, têm sido isoladas de várias gramíneas importantes na agricultura, como *Kallar grasses*, cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo e milho, nas quais foi observada fixação biológica de nitrogênio (BNF). A BNF tem sido atribuída a bactérias endofíticas diazotróficas como *Herbaspirillum* spp, *Azospirillum* spp, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Azoarcus* spp. No entanto, não há evidências diretas de que ocorre transferência dos produtos de fixação biológica de nitrogênio para a planta, ou seja, ainda não foi demonstrada a existência de simbiose fixadora de nitrogênio entre bactérias diazotróficas e gramíneas (JAMES & OLIVARES, 1997; JAMES, 2000; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998).

O aumento da população de endofíticos com genes específicos para o catabolismo de poluentes foi verificado em raízes de plantas cultivadas em solos contaminados com petróleo ou com compostos nitroaromáticos, mostrando outro efeito benéfico de bactérias endofíticas (SICILIANO et al., 2001).

Os efeitos benéficos de bactérias endofíticas são semelhantes aos efeitos das rizobactérias promotoras de crescimento (PGPRs). No entanto, devido à colonização em diferentes *habitats*, as bactérias endofíticas oferecem novas possibilidades para melhorar as características agrônômicas das plantas.

Atualmente, há um grande interesse na qualidade da bebida do café. A fermentação, ou seja, a decomposição natural da camada mucilaginosa dos frutos de café, envolve diferentes microorganismos provenientes da

superfície do fruto (FRANK & DELLA CRUZ, 1964) e do solo (THOMPSON et al, 1997). Embora existam vários estudos mostrando que bactérias e leveduras participam desse processo fermentativo (VAN PEE & CASTELEIN, 1972; THOMPSON et al, 1997; AVALONE et al., 2001), a microbiota epifítica e endofítica presente nos frutos antes da colheita tem sido pouco caracterizada. Com o objetivo de verificar o possível efeito da atividade bacteriana sobre a qualidade da bebida de café, o Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, tem realizado estudos com bactérias epifíticas e endofíticas que colonizam os frutos de café antes da sua colheita (YAMADA, 1999; GENARI, 1999; PAULA, 2001, SAKIYAMA et al., 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AßMUS, B.; SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A. Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbial Ecology*, **33**:32-40. 1997.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, **59**(1):143-169. 1995.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI Jr., W.; 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*, **47**:229-236. 2001.
- ARSÈNE, F.; KATUPITIYA, S.; KENNEDY, I.R.; ELMERICH, C. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**(6):748-757. 1994.

- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J.M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J.P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, **42**(4):252-256. 2001.
- BACILIO-JIMENEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M.V.; PÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**:167-172. 2001.
- BACON, C.W. & HINTON, D.M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. *In*: HURST, C.; KNUDSEN, G.R.; McLNERNEY, M.; STZENBACH, L.; WALTER, M.V. (Eds.). *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington, 1997. p. 413-421.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:103-121. 1997.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, **33**:145-172. 1995.
- BELL, C.R.; DICKIE, G.A.; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, **41**:46-53. 1995.
- BENHAMOU, N. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, **90**(1):45-56. 2000.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C. Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow: an ultrastructural and cytochemical study. *Planta*, **199**:105-117. 1996.

- CAVALCANTE, V.A. & DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen fixing bacteria associated with sugar cane. *Plant Soil*, **108**:23-31. 1988.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**: 21-829. 1994.
- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management*, **133**:81-88. 2000.
- CHELIUS, M.K. & TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(2): 83-787. 2000.
- De BELLIS, P. & ERCOLANI, G.L. Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4):1945-1948. 2001.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R. CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiology*, **105**:1139-1147. 1994.
- DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON, J.A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:2804-2810. 2000.
- EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**(1):71-75. 1998.

- ETCHEBAR, C.; TRIGALET-DEMERY, D.; VAN GIJSEGEM, F.; VASSE, J.; TRIGALET, A. Xylem colonization by an HrcV⁻ mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**(9):869-877. 1998.
- FRANK, H.A. & DELA CRUZ A.S. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage layer in Kona coffee cherries. *Journal of Food Science*, **29** (6):850, 1964.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H.M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L). *New Phytologist*, **122**:299-305. 1992.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, a indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil*, **154**:145-150. 1993.
- GAGNÉ. S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfafa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, **33**:996-1000. 1987.
- GARDNER, J.M.; FELDMAN, A.W.; ZABLOTOWICZ, R.M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus tree. *Applied Environmental Microbiology*, **43**(6):1335-1342. 1982.
- GENARI, R. *Características de crescimento e produção de pectinases por Klebsiella oxytoca isolada de frutos de café*. Viçosa, UFV, 1999. 75p. (Tese de Mestrado)
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic

- strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, **183**(8):2634-2645. 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**(7):925-937. 1998.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:895-914. 1997a.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Application of the Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:411-416. 1997b.
- HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* and plants. *Recent Research Development in Plant Physiology*, **1**:207-213. 1997.
- HOLLIS, J.P. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, **41**:350-366. 1951.
- HUANG, J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annual Review of Phytopathology*, **24**:141-157. 1986.
- HUGOUVIEUX, V.; BARBER, C.E.; DANIELS, M.J. Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**(6):537-543. 1998.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGNU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, **176** (7):1913-1923. 1994.

- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, **65**:197-209. 2000.
- JAMES, E.K. & OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **17**(1):77-119. 1997.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, **48**: 785-797. 1997.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection, of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, **45**(275):757-766. 1994.
- JEFFERSON, R.A. ;KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, **6**(13):3901-3907. 1987.
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, **63**(9):3676-3683. 1997.
- LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**:1112-1120. 1996.
- MAHAFFEE, W.F.; BAUSKE, E.M.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DER BRINK, M.; KLOEPPER, J.W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and a transgenic

- marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a Rhizobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(4):1617-1622. 1997.
- MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Canadian Journal of Microbiology*, **4**:344-353. 1997.
- McINROY, J.A. & KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, **173**:337-342. 1995.
- MUNDT, J.O. & HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, **32**(5):694-698. 1976.
- MUSSON, G.; McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Science and Technology*, **5**:407-416. 1995.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, **135**:723-737. 1997.
- PAULA, E.M. *Crescimento e caracterização de pectina liase de Paenibacillus amylolyticus isolado de frutos de café (Coffea arabica L.)*. Viçosa, UFV, 2001. 65p. (Tese de Mestrado)
- PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, **101**:665-672. 1995.

- PIRTTILÄ, A.N.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLÄ, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, **66**(7):3073-3077. 2000.
- QUADT-HALLMANN, A. ; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:577-582. 1997.
- QUADT-HALLMANN, A. & KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**:1144-1154. 1996.
- REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **17**(1):29-54. 1998.
- SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, **33**:1-5. 2001.
- SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *Journal of Food Sciences*, **28**:259-266. 1963.
- SCHLOTTER, M.; AßMUS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotechnology Advances*, **13**:75-90. 1995.
- SCHLOTTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECKE, H.; HÖFLICH, G.; HAARTMANN, A. Root colonization of different plants by plant growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* R39 studied

- with monoespecific polyclonal antisera. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(5):2038-2046. 1997.
- SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting Rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **29**(2):191-196. 1999.
- SICILIANO, S.K.; FORTIN, N.; MIHOC, A.; WISSE, G.; LABELLE, S.; BEAUMIER, D.; OUELLETTE, D.; ROY, R.; WHYTE, L.G.; BANKS, M.K.; SCHWAB, P.; LEE K.; GREER, C.W. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6):2469-2475. 2001.
- SICILIANO, S.K.L; THEORET, C.M.; FREITAS, J.R.; HUCL, P.J.; GERMIDA, J.J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**:844-851. 1998.
- SILHAVY, T. J. & BECKWITH, J. R. Uses of *lac* fusion for the study of biological problems. *Microbiology Reviews*, **49**:398-418. 1985.
- SPRENT, J.I. & DE FARIA, S.M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil*, **110**:157-165. 1988.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, **25**(10):13-19. 1997.
- THOMPSON, S.S.; MILLER, K.B. & LOPEZ, A.S. Cocoa and coffee. *In*: DOYLE, M.P., BEACHAT, L.R. & MONTVILLE, T.J. ed. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, ASM Press, 1997. p.659.

- VAN BUREN, A.M.; ANDRE, C.; ISHIMARU, L.A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, **83**:1406. 1993.
- VAN PEE, W. & CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, **37**:171-174. 1972.
- WHITESIDES, S.K. & SPOTTS, R.A. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology*, **81**(4):453-457. 1991.
- YAMADA, C.M. *Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de café*. Viçosa, UFV, 1999. 56p. (Tese de Mestrado)

CHARACTERIZATION OF PECTIN LYASE PRODUCED BY AN ENDOPHYTIC STRAIN ISOLATED FROM COFFEE CHERRIES.

Publicado em *Letters in Applied Microbiology* 33:1-5. 2001

SUMMARY

Aims: The effect of endophytic bacterial activity on the quality of coffee beverage was studied.

Methods and Results: A survey of the micro-organisms in coffee cherries was performed before harvesting, and their growth on the main nutrients available in coffee cherries was determined "in vitro".

Conclusions: Many endophytic bacteria were isolated from surface sterilized coffee cherries. One of the pectinolytic strains was physiologically and phenotypically characterized and was tentatively identified by partial 16S rDNA sequencing as *Paenibacillus amylolyticus*. This endophytic strain produced an extracellular pectinase with maximal activity at 40°C and pH 7.9, and it was thermostable up to 45°C. EDTA and metal ions had little effect on pectin lyase's activity. K_m and V_{max} values were 4.6 mg mL⁻¹ and 94.0 10⁻⁸ mol min⁻¹ mL⁻¹, respectively.

Significance and Impact of the Study: Pectin lyases have been found in fungi but rarely in bacteria and this isolate is a promising tool for regulation studies of these enzymes.

INTRODUCTION

Endophytic bacteria are defined as those bacteria that can be isolated from surface-disinfected plant tissue or extract from within the plant, but which do not visibly harm the plant (Hallmann *et al.* 1997). Endophytes may have several beneficial effects in host plants and are used in the biological control of plant pathogens, for enhancing agronomic plant characteristics such as increased drought tolerance and nitrogen efficiency, as bioherbicides, and as pharmacological agents (Bacon and Hinton, 1997).

Besides invading plants through natural openings or wounds, endophytic bacteria appear actively to penetrate plant tissues using hydrolytic enzymes such as cellulase and pectinase (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998). Numerous endophytic bacteria, such as *Azoarcus* sp. (Hurek *et al.* 1994) and *Pseudomonas fluorescens* (Quadt-Hallmann *et al.* 1997), produce pectinolytic enzymes.

Pectinases have widespread application in the food and textile industries (Alkorta *et al.* 1998; Henriksson *et al.* 1999). Among the known pectinases, pectin lyase (E.C. 4.2.2.10) (PL) is the only pectic enzyme that can cleave the α -1,4 bonds of highly esterified pectins without prior action of other enzymes (Alanã *et al.* 1991). This enzyme is thus well suited for degumming of natural fibres (Baracat-Pereira *et al.* 1994), plant tissue maceration, and fruit juice wastewater treatment (Kashyap *et al.* 2000). Pectin lyase is commonly produced by fungi (Prade *et al.* 1999) and is also produced by some bacteria, such as *Bacillus* spp. (Kashyap *et al.*, 2000) and *Pseudomonas marginalis* (Hayashi *et al.* 1997).

Endophytic bacteria are ubiquitous in most plant species. Despite the importance of coffee in agricultural economies, the only reported endophytic bacterium isolated from coffee to date is *Acetobacter diazotrophicus*, which was isolated from roots and stems (Jimenez-Salgado *et al.* 1997). It is believed that the present work is the first record of isolation of an endophytic bacterium from healthy coffee cherries. This is also the first report of pectin lyase production by a strain of *Paenibacillus amylolyticus*.

MATERIALS AND METHODS

Media and cultural conditions

Nutrient broth and nutrient agar were used for isolation and culturing. A solid mineral medium containing: 7.0 gL⁻¹ K₂HPO₄; 2.0 gL⁻¹ KH₂PO₄; 1.0 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 1.1 gL⁻¹ MgSO₄.7 H₂O, 1.5 gL⁻¹ agar at pH 7.0, enriched with 0.6 gL⁻¹ yeast extract and 3gL⁻¹ citric pectin (Sigma) as the sole carbon source, was used for selection of pectinolytic strains. Basal medium (BM) containing 7.0 gL⁻¹

$1 \text{ K}_2\text{HPO}_4$; $2.0 \text{ gL}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $1.0 \text{ gL}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $1.1 \text{ gL}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ and 0.6 gL^{-1} yeast extract at pH 7.0, was used to verify the utilization of different carbon sources to aid in characterization of the pectinolytic isolate. For these studies, 3 gL^{-1} of each carbon source was added to the BM. To establish pectinolytic isolate vitamin requirements, yeast extract was omitted from the BM and 50 mgL^{-1} of each vitamin (thiamin, calcium pantothenate, riboflavin and pyridoxine) was added. For enzyme assays, the isolate was cultured in BM enriched with 3 gL^{-1} citric pectin (Sigma). Bacteria were grown at 25°C on a rotary shaker (150 rpm).

Sampling and surface sterilization

Ripe cherries from coffee plant (*Coffea arabica* L.) cultivar Catuaí Vermelho, grown under field conditions, were collected in Araponga, Minas Gerais, Brazil. The samples were maintained at 4°C until processing. Individual cherry samples were pre-washed in running tap water, brushed with soapy water, and rinsed thoroughly in tap water. All subsequent steps were performed aseptically. The cherries were shaken twice on a rotary shaker in sterile tap water and once in sterile 0.05M potassium phosphate buffer, pH 7.0 (PB). Cherry samples were surface sterilized by immersion in 70% ethanol for 1 min, soaked for 5 min under vigorous shaking in 5% sodium hypochlorite containing 0.01% Tween 80, and then flamed after immersion in 70% ethanol for 30 s. Cherries were then left in sterile PB for 15 min and the sterilization steps described above were repeated. Finally, the cherry samples were rinsed four times in sterile distilled water. Surface sterility was checked by incubating each cherry sample in a test tube containing 10 mL of nutrient broth for 72 h. Test tubes in which growth occurred were discarded.

Isolation and preservation of endophytes

The surface-sterilized ripe coffee cherries were opened aseptically and the coffee beans were incubated in nutrient broth for 96 h. Endophytes were isolated from tubes showing growth on nutrient agar. Bacterial isolates were randomly selected from single colonies and re-streaked until pure cultures were obtained. Individual strains were cultured for 18-24 h in nutrient broth and maintained at -80°C on a nutrient broth/30% glycerol mix.

Pectinolytic strain characterization

Colony morphology and pigment production on nutrient agar were observed after 24 h of growth. Cell shape and spore-formation were determined by Gram staining. Gram characterization was confirmed by the presence of L-alanine aminopeptidase in the cell wall (Bactident reagent, Merck). Motility was observed by the hanging-drop method (Murray *et al.* 1994). Catalase activity was determined by bubble production in a 3% (v/v) H₂O₂ solution. Oxidase production was determined by oxidation of *p*-aminodimethylaniline dihydrochloride (Bacto oxidase strips). Casein, starch, and esculin hydrolysis, nitrate reduction, phenylalanine deamination, citrate and malonate utilisation, acetylmethylcarbinol and indole production and carbohydrate fermentation were evaluated according to Smibert and Krieg (1994). Hydrogen sulphide production was verified on triple sugar iron agar (Merck). Further physiological characterization was carried out by evaluating utilisation of cellobiose, cellulose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, pectin, ribose, starch, sucrose, xylose, casein or hydrolysed casein as sole carbon sources.

The pectinolytic strain was tentatively identified by phylogenetic analysis of a partial 16S rDNA sequence at Fundação André Tosello, Campinas, Brazil (<http://www.fat.org.br>). A 16S rDNA gene fragment was amplified by PCR with p27f and p1525r primers, homologous to conserved regions of bacterial 16S rRNA genes. Purified 16S rDNA fragments were used as sequencing templates. Sequencing was carried out by using a model ALFexpress automatic DNA sequencer (Pharmacia). The sequencing primers were 10f (forward) and 765f (forward) which are internal primers to 16S rRNA gene. The partial 16S rDNA sequence was aligned with previously published 16S rRNA gene sequences obtained from GenBank and RPD (Ribosomal Database Project) databases. Distance matrices were calculated according to the Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor, 1969). Construction of a neighbour-joining phylogenetic tree was done according to Saitou and Nei (1987).

Enzyme assay

Pectin lyase activity was determined spectrophotometrically (A_{235}), according to Albersheim (1966), in the culture supernatant fluid harvested at the end of the log phase of growth. The reaction mixture consisted of 1.0 mL 2.5%

citric pectin (SIGMA), apple pectin (SIGMA) or polygalacturonic acid (SIGMA) in 80 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.8) and 1.5 mL of culture supernatant fluid. Aliquots of 0.5 mL of the reaction mixture were added to 4.5 mL 0.01N HCl at 0 and 20 min of incubation at 40°C. One unit of PL activity unit (U) was defined as nanomoles of unsaturated uronides formed per millilitre of culture supernatant fluid per minute. Polygalacturonase (PG) activity was measured spectrophotometrically (A₅₄₀), using polygalacturonic acid as substrate and 3,5-dinitrosalicylic acid and D(+)-galacturonic acid as standards (Miller, 1959). Pectate lyase (PAL) activity was determined spectrophotometrically (A₂₃₀), using polygalacturonic acid as substrate (Moran *et al.* 1968). The pH of maximum PL activity was determined using sodium acetate/potassium phosphate/Tris buffer at a final concentration of 50 mmol L⁻¹, in the pH range of 3.5 to 10.5. The culture supernatant fluid was dialysed (membrane MWCO 12-14 000, Thomas Scientific) for pH determination, and evaluation of EDTA and metal ion effects on PL activity.

RESULTS

Isolation and characterization of pectinolytic strain

Among the endophytic and pectinolytic bacteria isolated from ripe, healthy coffee cherries, isolate F 7-4 produced the greatest hydrolysis zone in solid medium, and was further characterized.

Isolate F 7-4 produced extracellular PL but not extracellular PAL or PG. Isolate F 7-4 was a facultatively anaerobic, motile and Gram positive bacterium. Cells were rod-shaped, with cylindrical spores in swollen sporangia. The cells were Gram negative at early stages of growth, but became Gram positive as the culture aged. Cell wall L-alanine aminopeptidase was absent. Colonies were flat, smooth, and circular. No soluble pigment was produced on nutrient agar. Isolate F 7-4 had catalase activity, but no oxidase activity. Casein, starch, and esculin were hydrolysed. Nitrate was reduced to nitrite. Phenylalanine was not deaminated. Citrate and malonate were not utilized. Acetylmethylcarbinol, indole, and hydrogen sulphide were not produced. Acid, but no gas, was

produced from D-glucose. Isolate F 7-4 utilized cellobiose, cellulose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, pectin, ribose, starch, sucrose, and xylose as carbon sources. Neither casein nor hydrolysed casein was used as sole carbon source. However, the casein hydrolysis test was positive. Isolate F 7-4 required yeast extract as a growth promoter in BM when glucose or pectin were used as sole carbon source. It also showed growth when thiamin, riboflavin, calcium pantothenate, or pyridoxine replaced yeast extract.

The partial 16S rDNA sequence of isolate F 7-4 showed 96% similarity to the 16S rDNA sequence of *Paenibacillus amylolyticus* and 90 to 95% similarity to the 16S rDNA sequences of *P. pabuli*, *P. macquariensis* and *P. lautus* strains. Phylogenetic analysis (Fig. 1) grouped isolate F 7-4 with the *P. amylolyticus* type strain (Nakamura 1984; Ash *et al.* 1994 emend; Shida *et al.* 1997). Phenotypic characteristics were in good agreement with those described by Shida *et al.* (1997) for *P. amylolyticus*. Isolate F 7-4 has been deposited *P. amylolyticus* CCT 7128 at Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, Brazil.

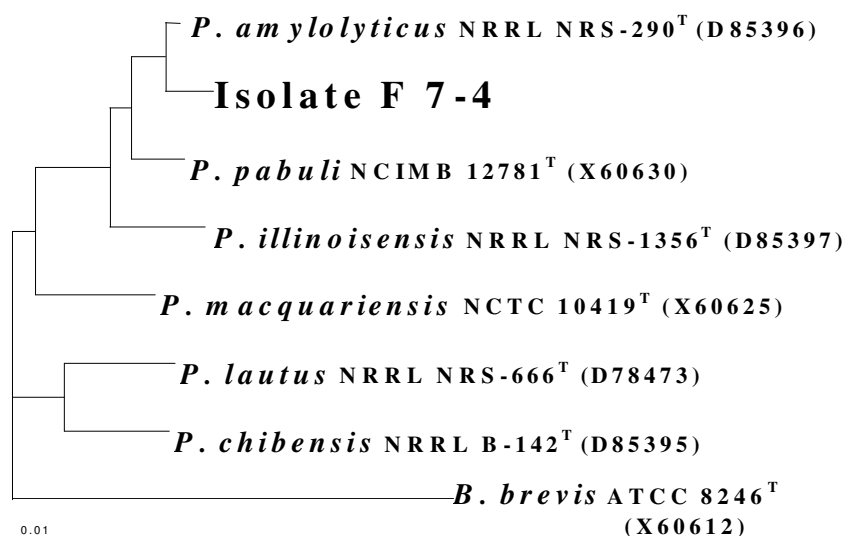


Fig. 1 Phylogenetic tree based on the alignment of 16S rRNA partial sequence of isolate F 7-4 and *Paenibacillus amylolyticus*, *P. chibensis*, *P. illinoisensis*, *P. lautus*, *P. macquariensis*, and *P. pabuli*. *Brevibacillus brevis* was used as an out-group. Accession numbers between parenthesis are from GenBank database.

Pectin lyase properties

Pectin lyase from isolate F 7-4 catalysed the cleavage of pectin from different sources, but was more active with citric pectin than apple pectin and showed little activity with polygalacturonic acid (Table 1). Maximal PL activity was observed at 40°C and the enzyme was fully thermostable up to 45°C. Above this temperature, activity was quickly lost and the enzyme was inactivated at 60°C. Pectin lyase activity was observed in the pH range 5.6-8.6, with optimum activity at 7.9. Addition of EDTA and metal ions to the reaction mixture had little effect on PL activity. A weak inhibitory effect was only seen in the presence of CaCl₂ at 50 and 100 mmol L⁻¹ (Table 2). K_m and V_{max} values calculated by double reciprocal plots (Lineweaver and Burk, 1934), were 4.6 mg mL⁻¹ and 94.0 10⁻⁸ mol min⁻¹ mL⁻¹ respectively.

Table 1 - Substrate specificity of isolate F 7-4 pectin lyase

Substrate at 1% (w/v)*	Relative activity ‡ (%)
Pectin (citrus)	100
Pectin (apple)	39
Polygalacturonic acid	4

*In 80 mmol L⁻¹ potassium phosphate buffer, pH 6.8.

‡Activity was measured using the standard assay procedure.

100% activity = 197.09 units mL⁻¹.

Table 2 - Effect of EDTA and metal ions on isolate F 7-4 pectin lyase activity.

Compound*	Final concentration (mmol L ⁻¹)	Relative Activity ‡ (%)
None	-	100
EDTA	2	107
CaCL₂	2	97
	10	97
	50	84
	100	76
Cu SO₄	2	95
ZnSO₄	2	95
MgSO₄	2	99
MnCl₂	2	102
CoSO₄	2	97
Mix*	2	95

*Each metal ion at 2mmol L⁻¹.

‡ 100% activity = 226.75 units mL⁻¹.

DISCUSSION

Endophytic bacteria have been found in a variety of tissue types within numerous plant species, as reviewed by Kobayashi and Palumbo (2000), suggesting a ubiquitous existence in most if not all higher plants. Nevertheless, there is only one report on endophytic bacteria isolated from coffee roots and stems (Jimenez-Salgado *et al.* 1997). Here, an endophytic bacterium was isolated from surface-sterilized coffee cherries for the first time.

It was not surprising that pectinolytic micro-organisms were isolated from ripe cherries since coffee cherry mucilage consists largely of pectic substances (Wootton, 1963). However, according to Tsuyumu and Chatterjee (1984), pectin lyases have been detected in various fungi, but rarely in bacteria. As far as is known, isolate F 7-4 is the first strain of *Paenibacillus amylolyticus* isolated that produces extracellular PL.

Pectin lyase produced by isolate F 7- 4 showed the same substrate specificity as *Pseudomonas fluorescens* (Schlemmer *et al.* 1987). Enzyme thermostability, the effect of temperature on PL activity, and pH of maximal PL activity, were similar to results reported for other bacterial and fungal PLs (Itoh *et al.* 1982; Parini *et al.* 1988; Silva *et al.* 1993). However, unlike *Bacillus* spp. (Kashyap *et al.* 2000), isolate F 7-4 PL was not activated by calcium ions. The K_m value for isolate F 7-4 PL is not significantly different from that reported for pectin lyase from *P. fluorescens* (3.2 mg mL⁻¹) (Schlemmer *et al.* 1987).

Pectin lyase was produced by isolate F 7-4 after 18 h of growth on a simple mineral medium, with only 0,3% pectin as inducer and carbon source. The enzyme has potential for use in studies on plant tissue maceration, natural fibre de-gumming and fruit juice wastewater treatment. The isolate is a promising tool for PL regulation studies, as pectinases and cellulases of some bacterial endophytes are induced for penetration into host plants but never after internal tissue colonization, as reviewed by Hallman *et al.* (1997).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian Agencies CNPq and FAPEMIG for their financial support. They are grateful to Leonardo Miranda Damasceno and Ann Honor Mounter for reviewing this manuscript.

REFERENCES

Alanã, A., Llama, M.J., and Serra, J.L. (1991) Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. *FEBS Letters* **280**, 335-340.

Albersheim, P. (1966) Pectin lyase from fungi. In *Methods in Enzymology* Vol. 8, ed Neufeld, E.F. and Ginsburg, V. pp.628-635. New York: Academic Press.

Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J. and Serra, J.L. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry* **33**, 21-28.

Bacon, W.C. and Hinton, D.M. (1997) Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In *Manual of Environmental Microbiology* ed Hurst, C., Knudson, G.R., McInerney, M., Setzenbach, L., Walter, M.V. pp.413-421.

Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., and Silva, D.O. (1994) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. *Letters in Applied Microbiology* **18**,127-129.

Hallmann, J., Quardt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 895-914.

- Hayashi, K., Inoue, Y., Shiga, M., Sato, S., Takano, R., Hirayae, K., Hibi, T., and Hara, S. (1997) Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173. *Phytochemistry* **45**, 1359-63.
- Henriksson, G., Akin, D.E., Slomczynski, D. and Eriksson, K.E.L. (1999) Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. *Journal of Biotechnology* **68**, 115-123.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M. and Kellenberger, E. (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* **176**, 1913-1923.
- Itoh, Y., Sugiura, J., Izaki, K. and Takahashi, H. (1982) Enzymological and immunological properties of pectin lyases from bacteriocinogenic strains of *Erwinia carotovora*. *Agriculture Biological Chemistry* **46**, 199-205.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L. E., Tapia-Hernandez, A. et al. (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3676-3683.
- Jukes, T.H. AND Cantor, R.R. (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*. ed H.N. Munro pp.21-132. New York: Academic Press.
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A., Tewari, R. (2000) Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 277-282.
- Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D. (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: *Microbial Endophytes*. Ed Bacon, C.W. and White, J.F. Jr. pp.199-233. New York: Marcel Dekker Inc.

- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* **50**, 658-666.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.
- Moran, F.; Nasuno, S. and Stan, M.P. (1968) Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans eliminase of *E. carotovora*. *Archives of Biochemistry Biophysics* **123**, 298-306.
- Murray, R.G.E., Doetsch, R.N., and Robinow, C.F. (1994) Determinative and cytological light microscopy. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology* ed Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. p.26. Washington: American Society of Microbiology.
- Nakamura, L.K. (1984) *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**, 224-226.
- Parini, C., Fortina, M.G. and Manachini, P.L. (1988) Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Journal of Applied Bacteriology* **65**, 477-481.
- Prade, R.A., Zhan, D., Ayoubi, P. and Mort, A.J. (1999) Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnology and General Engineering Review* **16**,361-391.
- Quadt-Hallmann, A., Benhamou, N., and Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 577-582.

- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* **6**, 139-144.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological Evolution* **4**, 406-425.
- Schlemmer, A.F., Ware, C.F. and Keen, N.T. (1987) Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. *Journal of Bacteriology* **169**, 4493-4498.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K., Kogamata, K. (1997) Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. Nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 299-306.
- Silva, D.O., Attwood, M.M. and Tempest, D.W. (1993) Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**, 574-578.
- Smibert, R.M. and Krieg, N.R. (1994) Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ed Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. pp.607-654. Washington: American Society for Microbiology.
- Tsuyumu, S. and Chattterjee, A.K. (1984) Pectin lyase production in *Erwinia chrysanthemi* and other soft-rot *Erwinia* species. *Physiological Plant Pathology* **24**, 291-302.
- Wootton, A.E. (1963) *The fermentation of coffee*. Report no. 12. Nairobi, East African Industrial Research Organization.

MICROBIOTA ENDOFÍTICA E EPIFÍTICA EM FRUTOS DE *Coffea arabica* L.

INTRODUÇÃO

Os microorganismos estão intimamente associados a plantas, podendo colonizá-las epifítica e endofiticamente (PRESTON et al., 1998). A colonização epifítica ocorre na superfície de órgãos, como folhas, flores, frutos, caules e raízes. Os microorganismos endofíticos colonizam os tecidos vegetais internos e não causam danos à planta. Essas interações planta-microorganismos têm despertado grande interesse por suas possíveis implicações na agricultura e biotecnologia.

No preparo via seca do café adotado pela maioria dos cafeicultores brasileiros, a fermentação ocorre na massa de frutos colhidos em diferentes estádios de desenvolvimento. Essa fermentação, ou seja, a decomposição natural da camada mucilaginosa dos frutos, envolve diferentes microorganismos provenientes da superfície do fruto (FRANK & DELLA CRUZ, 1964) e do solo (THOMPSON et al, 1997). Embora existam vários estudos mostrando que bactérias e leveduras participam desse processo fermentativo (VAN PEE & CASTELEIN, 1972; THOMPSON et al, 1997; AVALONE et al., 2001), a microbiota epifítica presente nos frutos antes da colheita tem sido pouco caracterizada. SILVA et al. (2000) avaliaram a diversidade microbiana da superfície dos frutos de café antes da colheita, mas apenas nos estádios cereja e passa. Com relação a microbiota endofítica, *Paenibacillus amylolyticus* isolado de fruto cereja, por SAKIYAMA et al. (2001), é a única referência na literatura científica indexada sobre microorganismos endofíticos de frutos de café.

As bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rósea (PPFMs – Pink-Pigmented Facultative Methylophs) do gênero *Methylobacterium* têm sido encontradas colonizando epifiticamente a maioria das espécies vegetais (HOLLAND, 1997). As PPFMs são facilmente reconhecidas pela coloração rósea de suas colônias em ágar nutriente, pelo seu crescimento em meio de

cultivo contendo como única fonte de carbono um composto orgânico C-1 e pela formação de película ou anel superficial em culturas líquidas estáticas (HOLT, 1993). Embora, bactérias PPFMs tenham sido isoladas de mais de 100 espécies de plantas (HOLLAND, 1997) não há relatos de sua colonização em frutos de café.

Os objetivos do presente trabalho foram: i) quantificar e caracterizar morfológicamente a microbiota epifítica e endofítica que coloniza, antes da colheita, frutos sadios de café em diferentes estádios de desenvolvimento, produzidos em Viçosa, Zona da Mata Norte e em Serra do Salitre e em Patrocínio, Cerrado de Minas Gerais; ii) verificar a colonização destes frutos por bactérias PPFMs.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de frutos sadios de *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí Vermelho IAC-99 foram coletadas de lavouras localizadas em Viçosa, Serra do Salitre e Patrocínio, MG. Os frutos foram amostrados em Viçosa no período de 1^o de abril a 21 de julho de 2000, em intervalos de 15 dias, nos seguintes estádios de desenvolvimento: chumbinho-pequeno, chumbinho-médio, verde, verde-cana, cereja e passa. Em Serra do Salitre e em Patrocínio foi realizada apenas uma amostragem de cada localidade, em 17 de junho de 2000, dos estádios verde, verde-cana, cereja e passa. Em cada estádio de desenvolvimento foram coletados 24 frutos sadios de 12 plantas (dois frutos sadios de cada planta). Em Viçosa o procedimento foi repetido utilizando-se outras 12 plantas da mesma lavoura. As amostras foram transportadas a 0^oC e mantidas a 4^oC, no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos - BIOAGRO/UFV por, no máximo, 24 horas até o processamento.

Processamento das amostras

No laboratório, cada amostra de 24 frutos foi preparada seguindo-se as etapas de pesagem, lavagem em água de torneira corrente, lavagem individual dos frutos com auxílio de bucha com detergente e desinfetante SANPIC e

enxágüe com água de torneira corrente. A seguir, em condições assépticas, os frutos foram agitados a 150 rpm, por 5 minutos, em 100 ml de água de torneira estéril.

Quantificação e isolamento da microbiota epifítica

A determinação do número de células viáveis foi realizada pela contagem de colônias em placas (KOCH, 1994). Uma série de diluições, em solução estéril de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, da água de torneira estéril onde os frutos pré-lavados foram agitados, foi plaqueada em meio sólido R2A (REASONER & GELRDREICH, 1985). As placas foram incubadas a 28^oC por 96 horas. As populações microbianas de cada estágio de desenvolvimento do fruto foram expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de peso fresco do fruto. Todos os dados de populações foram transformados em log (UFC/g fruto).

Os microorganismos epifíticos foram isolados a partir das placas de cada amostragem. Uma colônia representativa de cada tipo morfológico foi transferida para nova placa de meio R2A para obtenção de culturas puras. Após 24 horas de cultivo em R2A, a 28^oC, as características morfológicas dos isolados epifíticos foram determinadas pela coloração de Gram. As colônias típicas de fungos filamentosos foram transferidas para ágar-aveia.

Quantificação e isolamento da microbiota endofítica

Os frutos pré-lavados e agitados em água de torneira estéril foram esterilizados superficialmente de acordo com o protocolo descrito por SAKIYAMA et al. (2001), omitindo-se apenas a etapa de flambagem. Os frutos superficialmente estéreis foram triturados, sob condições assépticas, em solução estéril de tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 7,0, em liqüidificador. O material vegetal triturado foi utilizado para quantificação e isolamento da microbiota endofítica, empregando-se a mesma metodologia descrita acima para a microbiota epifítica.

Isolamento de bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rósea (PPFMs)

Os isolados bacterianos com morfologia de bastonetes e com coloração Gram negativa, tanto epifíticos quanto endofíticos, que apresentaram colônias com pigmentação rósea em meio R2A foram cultivados, a 28°C, em meio sólido glicerol-peptona (GP) (GREEN & BOUSFIELD, 1982) em ágar nutriente e em caldo nutriente, cultura estática. Após duas semanas de cultivo, as culturas foram analisadas quanto à pigmentação em ágar nutriente, quanto à utilização de glicerol como fonte de carbono em meio GP e quanto à formação de anel róseo na superfície do caldo nutriente.

Armazenamento das culturas

As culturas de bactérias e leveduras isoladas foram catalogadas e conservadas a -80°C, em meio caldo nutriente contendo 30% de glicerol. As culturas de fungos filamentosos foram estocados em ágar-aveia a 4°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

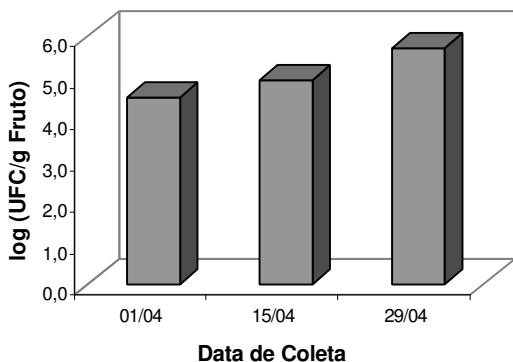
Quantificação das populações epifíticas e endofíticas

As populações microbianas epifíticas e endofíticas dos frutos de café de diferentes estádios de desenvolvimento, amostradas em Viçosa, estão representadas na Figura 1. As populações epifíticas e endofíticas dos frutos verde, verde-cana, cereja e passa, amostradas em Serra do Salitre e em Patrocínio, estão representadas na Figura 2.

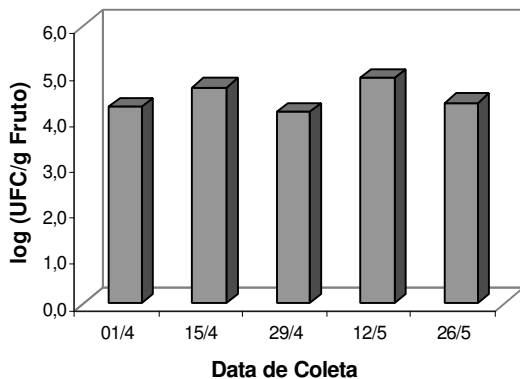
Em geral, as populações epifíticas encontradas variaram de 10^4 a 10^7 UFC/g peso fresco do fruto em Viçosa, de 10^3 a 10^4 UFC/g peso fresco do fruto em Serra do Salitre e de 10^3 a 10^6 UFC/g peso fresco do fruto em Patrocínio. SILVA et al. (2000) encontraram populações de até 10^9 UFC/g fruto. Essa diferença pode ser explicada pelo fato desses autores terem avaliado, além da microbiota epifítica, microorganismos não aderidos à superfície dos frutos. As populações epifíticas encontradas nas diferentes amostragens de frutos passa foram maiores dois a três ciclos logarítmicos (UFC/g fruto) do que as populações dos demais estádios de desenvolvimento, em Viçosa e Patrocínio.

POPULAÇÕES EPIFÍTICAS

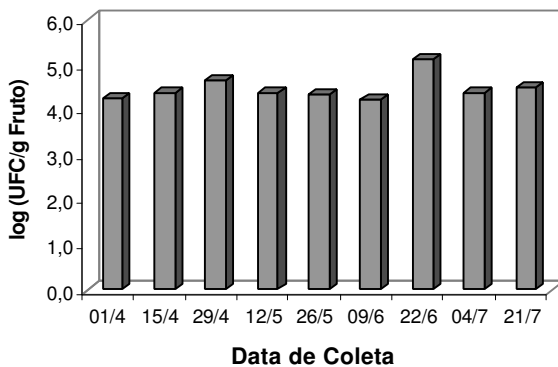
Chumbinho-pequeno



Chumbinho-médio

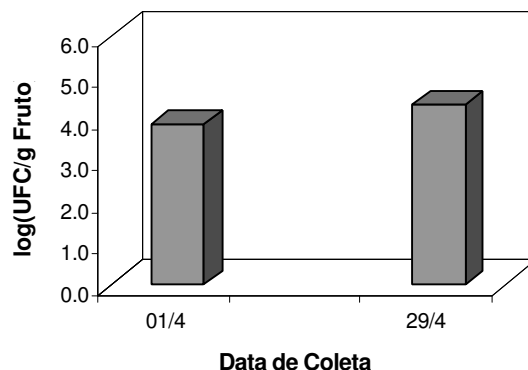


Verde

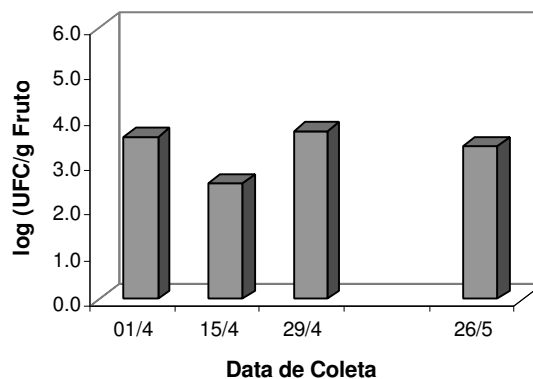


POPULAÇÕES ENDOFÍTICAS

Chumbinho-pequeno



Chumbinho-médio



Verde

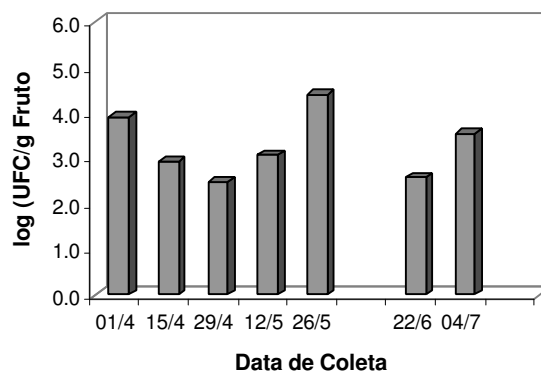
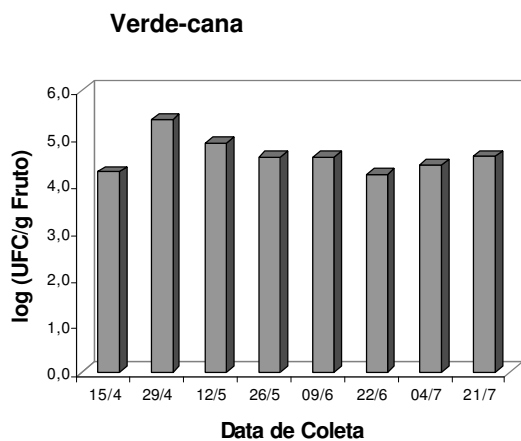


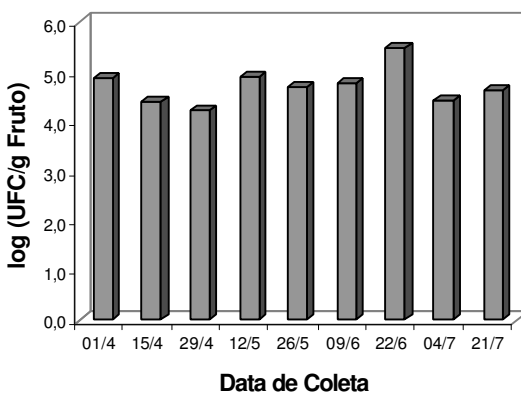
Figura 1 – Populações microbianas epifíticas e endofíticas obtidas a partir de diferentes estádios de desenvolvimento de frutos de *Coffea arabica* L., colhidos em Viçosa, MG, em diferentes datas de coleta.

(cont.)

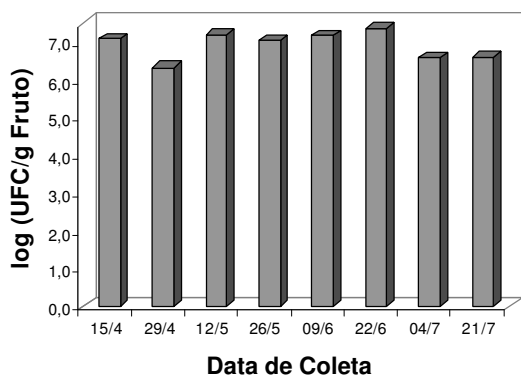
POPULAÇÕES EPIFÍTICAS



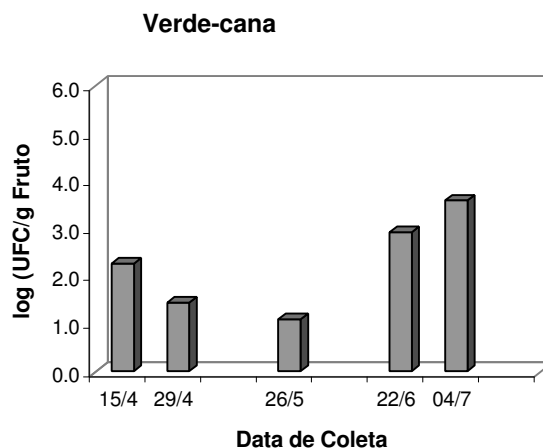
Cereja



Passa



POPULAÇÕES ENDOFÍTICAS



Cereja

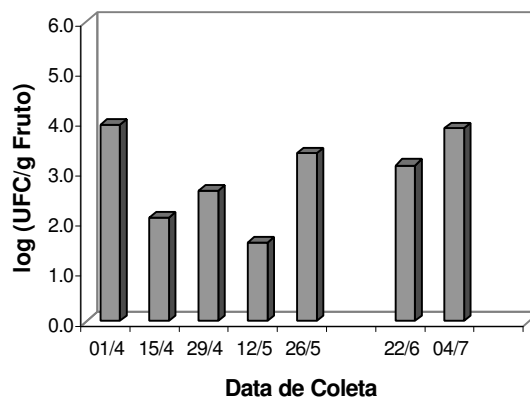


Figura 1 (cont.) – Populações microbianas epifíticas e endofíticas obtidas a partir de diferentes estádios de desenvolvimento de frutos de *Coffea arabica* L., colhidos em Viçosa, MG, em diferentes datas de coleta.

POPULAÇÕES EPIFÍTICAS

POPULAÇÕES ENDOFÍTICAS

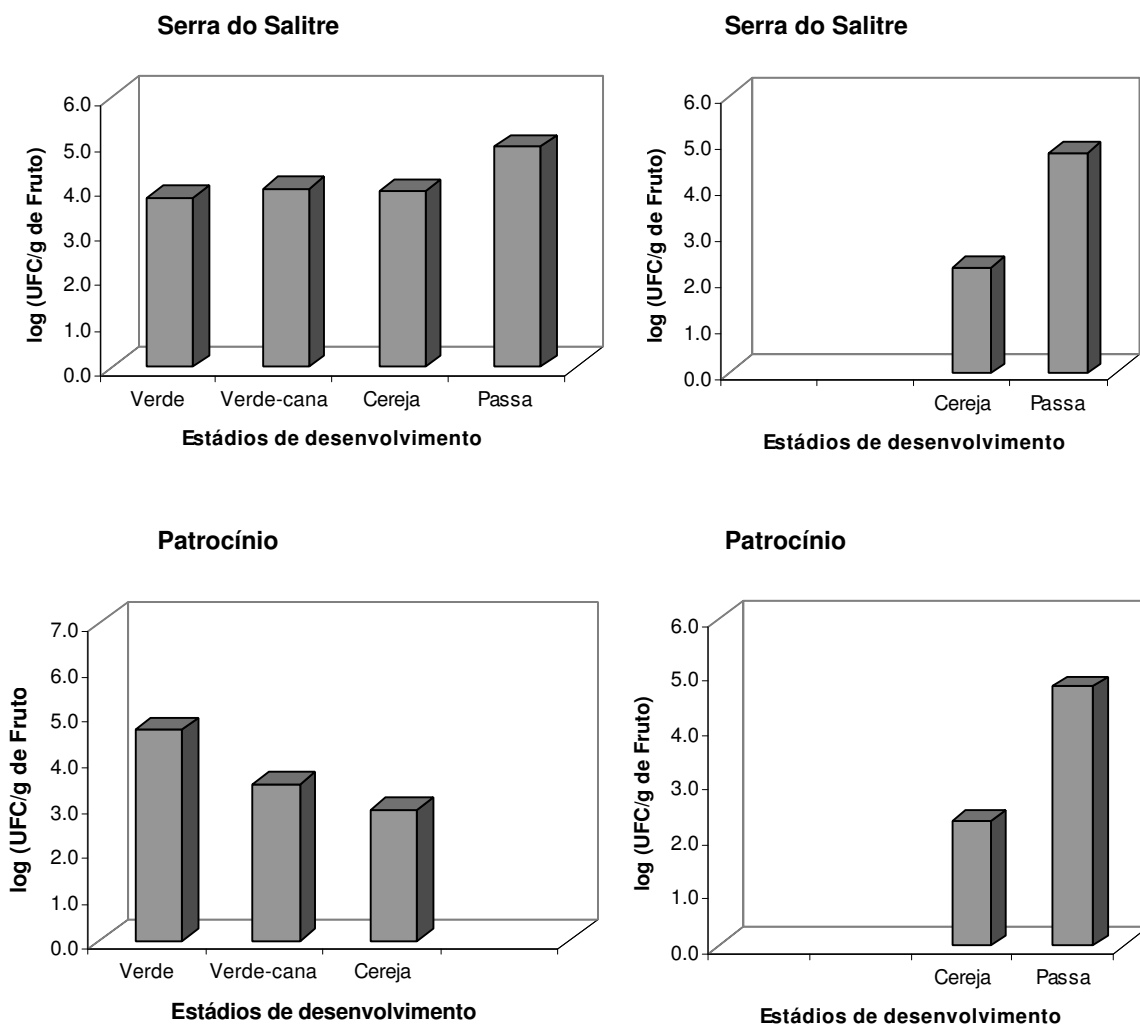


Figura 2 – Populações microbianas epifíticas e endofíticas obtidas a partir de diferentes estádios de desenvolvimento de frutos de *Coffea arabica* L., colhidos em Serra do Salitre e em Patrocínio, MG, em 17/06/2000.

Essa diferença pode ser explicada pelo fato dos frutos passa encontrarem-se em fase de deterioração. Em geral, nas diferentes épocas de coleta, em Viçosa, as populações mantiveram-se estáveis, considerando-se os dados populacionais de cada estágio de desenvolvimento do fruto.

As populações potencialmente endofíticas encontradas variaram de 10^2 a 10^4 UFC/g peso fresco de fruto, nas três localidades. GAGNÉ et al. (1987) e HALLMANN et al. (1997) encontraram populações endofíticas em raízes de alfafa e algodão, respectivamente, de 10^3 a 10^4 UFC e de 10^4 UFC/g peso fresco de raiz. Foram obtidas populações endofíticas a partir de frutos no estágio passa somente em Serra do Salitre, uma vez que, devido à elevada colonização epifítica dos frutos passas de Viçosa e Patrocínio, não foram obtidos frutos superficialmente estéreis para a posterior realização da quantificação e isolamento de microorganismos endofíticos. Nas Figuras 1 e 2, observam-se também que não foram obtidas populações endofíticas em algumas coletas nos diferentes estágios de desenvolvimento, o que pode ser explicado da mesma forma exposta para os frutos passa. Em Viçosa, a diferença entre as populações epifíticas e endofíticas variou de um a três ciclos logarítmicos (UFC/g fruto) nos estágios chumbinho-pequeno, chumbinho-médio, verde, verde-cana e cereja, sendo as populações epifíticas, em geral, maiores. Essa diferença confirma a eficiência do processo de esterilização superficial para esses estágios, nas épocas em que foram obtidas populações endofíticas.

Isolamento de microorganismos epifíticos e endofíticos

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos epifíticos foram isolados de frutos de café amostrados em Viçosa, em todos os estágios de desenvolvimento. Segundo MERCIER & LINDOW (2000), as superfícies das partes aéreas das plantas são comumente colonizadas por um grande número de microorganismos. Em Viçosa, obteve-se um total de 1042 isolados de microorganismos epifíticos, sendo 86% bactérias, 8% leveduras e 6% fungos filamentosos (Tabela 1). Nos estágios chumbinho-pequeno, chumbinho-médio, verde, verde-cana e cereja, bactérias representaram aproximadamente 90% do total de isolados, enquanto leveduras e fungos filamentosos representaram em torno de 5%. No estágio passa, bactérias representaram 48% , leveduras 39%

e fungos filamentosos 13%, evidenciando sucessão de populações microbianas nos estádios cereja e passa. Na Tabela 1, observa-se também, que o número de isolados epifíticos de leveduras aumentou à medida que os frutos amadureceram. AGATE & BHAT (1966) demonstraram o papel de leveduras pectinolíticas na degradação da camada mucilaginosa de frutos cereja de café arábica e robusta.

Tabela 1 - Número e tipo morfológico dos microrganismos epifíticos isolados no período de 01/04 a 21/07/2000, em Viçosa, MG.

Estádio do fruto	Cocos Gram +	Bastonetes Gram +	Bastonetes Gram -	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total
Chumbinho-pequeno	1	3	15	2	1	22
Chumbinho-médio	3	34	43	1	9	90
Verde	19	109	146	9	13	296
Verde-cana	9	82	134	12	9	246
Cereja	12	105	129	22	17	285
Passa	5	34	11	40	13	103
Total	49	367	478	86	62	1042

A partir de frutos amostrados em Serra do Salitre e em Patrocínio foram obtidos 71 e 85 isolados epifíticos, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Em ambas as localidades, semelhantemente ao obtido em Viçosa, o grupo das bactérias foi isolado em maior número que leveduras e fungos filamentosos, representando aproximadamente 90% dos isolados. No entanto, a sucessão de populações claramente observada nos estádios cereja e passa em Viçosa não foi evidenciada nas populações de Serra do Salitre e Patrocínio. Nestas duas localidades, diferentemente de Viçosa, os diversos tipos morfológicos não foram observados em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos.

Tabela 2 - Número e tipo morfológico dos microrganismos epifíticos isolados em 17/06/2000, em Serra do Salitre, MG.

Estádio do fruto	Cocos Gram +	Bastonetes Gram +	Bastonetes Gram -	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total
Verde	1	7	10	0	0	18
Verde-cana	1	2	16	0	0	19
Cereja	1	4	17	0	2	24
Passa	0	3	3	3	1	10
Total	3	16	46	3	3	71

Tabela 3 - Número e tipo morfológico dos microrganismos epifíticos isolados em 17/06/2000, em Patrocínio, MG.

Estádio do fruto	Cocos Gram +	Bastonetes Gram +	Bastonetes Gram -	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total
Verde	0	10	8	2	2	22
Verde-cana	2	22	0	0	0	34
Cereja	0	11	4	1	3	19
Passa	2	3	4	0	1	10
Total	4	46	26	3	6	85

Como exposto anteriormente, não foram obtidos frutos passas superficialmente estéreis nas amostras colhidas em Viçosa e Patrocínio, não sendo possível, portanto, isolar microrganismos potencialmente endofíticos neste estágio. Em todos os demais estágios, considerando-se as populações obtidas em Viçosa, foram isoladas bactérias e leveduras endofíticas. SAKIYAMA et al. (2001) isolaram uma bactéria endofítica a partir de frutos cereja superficialmente estéreis. Fungos filamentosos endofíticos foram isolados nos estágios chumbinho-médio, verde, verde-cana e cereja, mas não estiveram presentes nas populações obtidas no estágio chumbinho-pequeno. Em um total de 282 isolados endofíticos obtidos, em Viçosa, as bactérias representaram aproximadamente 84%, as leveduras, 7% e os fungos filamentosos, 9% (Tabela 4). Em Serra do Salitre foram obtidos apenas isolados endofíticos bacterianos (bastonetes Gram positivos e Gram negativos) (Tabela 5). Em Patrocínio foram obtidas bactérias e leveduras, mas não fungos filamentosos (Tabela 6).

Tabela 4 - Número e tipo morfológico dos microrganismos endofíticos isolados no período de 01/04 a 21/07/2000, em Viçosa, MG.

Estádio do fruto	Cocos Gram +	Bastonetes Gram +	Bastonetes Gram -	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total
Chumbinho-pequeno	1	7	4	3	0	15
Chumbinho-médio	12	9	14	1	3	39
Verde	10	23	49	6	9	97
Verde-cana	9	14	41	2	8	74
Cereja	3	8	33	7	6	57
Total	35	61	141	19	26	282

Tabela 5 - Número e tipo morfológico dos microrganismos endofíticos isolados em 17/06/2000, em Serra do Salitre, MG.

Estádio do fruto	Cocos Gram +	Bastonetes Gram +	Bastonetes Gram -	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total
Cereja	0	6	8	0	0	14
Passa	0	7	7	0	0	14
Total	0	13	15	0	0	28

Tabela 6 - Número e tipo morfológico dos microrganismos endofíticos isolados em 17/06/2000, em Patrocínio, MG.

Estádio do fruto	Cocos Gram +	Bastonetes Gram +	Bastonetes Gram -	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total
Verde	0	2	7	0	0	9
Verde-cana	2	2	2	3	0	9
Cereja	0	8	6	1	0	15
Total	2	12	15	4	0	33

Entre os isolados bacterianos epifíticos e endofíticos das três localidades, os bastonetes predominaram sobre os cocos. Dentre os bastonetes, as bactérias Gram negativas foram isoladas em maior número, de todas as populações, com exceção das epifíticas isoladas em Patrocínio, onde ocorreu o contrário. McINROY & KLOPPER (1995), estudando a microbiota endofítica de milho doce e algodão também encontraram maior número de bastonetes Gram negativos entre as bactérias isoladas. O mesmo foi observado por ELVIRA-RECUENCO & VAN VUURDE (2000) em cultivares de ervilha.

Isolamento de bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rósea (PPFMs)

Isolados bacterianos epifíticos e endofíticos com características culturais de PPFMs do gênero *Methylobacterium* estavam presentes em todas as populações obtidas a partir de frutos de café coletados em Viçosa e nas duas localidades dos Cerrado Mineiro. Estes isolados apresentaram crescimento em meio GP, colônias com pigmentação rósea em ágar nutriente e formação de anel na superfície do caldo nutriente.

As bactérias PPFMs isoladas a partir das populações obtidas em Viçosa representaram 13 e 16% do total de bastonetes Gram negativos epifíticos e endofíticos, respectivamente. Enquanto, nas populações do Cerrado, estas bactérias representaram, respectivamente, 61 e 50% dos isolados epifíticos e endofíticos (Tabela 7). As bactérias do gênero *Methylobacterium* estão presentes na filosfera da maioria das espécies vegetais (ROMANOVSKAYA et al., 2001). A colonização epifítica de tecidos foliares de 38 espécies diferentes de plantas foi observada (CHANPRANE et al., 1996). Um isolado endofítico identificado como *M. extorquens* foi isolado a partir de folhas de citros (ARAÚJO et al., 2001), uma planta perene como o cafeeiro.

Tabela 7 – Número total de isolados bastonetes Gram negativos e de isolados com características culturais de PPFMs obtidos no período de 01/04 a 21/07/2000, em Viçosa, MG e em 17/06/2000, no Cerrado, MG.

Localidade	Bastonetes Gram - epifíticos		Bastonetes Gram - endofíticos	
	Total	PPFMs	Total	PPFMs
Viçosa	478	62	141	22
Cerrado	72	44	30	15

CONCLUSÕES

Frutos sadios de *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí Vermelho, amostrados em lavouras localizadas em Viçosa, Serra do Salitre e Patrocínio, foram colonizados por microorganismos epifíticos e endofíticos. As populações epifíticas variaram de 10^4 a 10^7 UFC/g peso fresco do fruto em

Viçosa, de 10^3 a 10^4 UFC/g peso fresco do fruto em Serra do Salitre e de 10^3 a 10^6 UFC/g peso fresco do fruto em Patrocínio. Em Viçosa e Patrocínio, as populações epifíticas dos frutos passa foram maiores dois a três ciclos logarítmicos (UFC/g frutos) do que as populações dos demais estádios de desenvolvimento. As populações potencialmente endofíticas variaram de 10^2 a 10^4 UFC/g peso fresco do fruto, nas três localidades. Em Viçosa, as populações epifíticas foram, em geral, um a três ciclos logarítmicos (UFC/g fruto) maiores que as endofíticas.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos epifíticos foram isolados em Viçosa, em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos, num total de 1042 isolados. Do estádio chumbinho-pequeno até o estádio cereja, a proporção de isolados de bactérias, leveduras e fungos filamentosos foi próxima de 89, 5 e 6%, respectivamente. Entretanto, no estádio passa bactérias representaram 48%, leveduras 39% e fungos filamentosos 13%, evidenciando uma sucessão de populações microbianas entre os estádios cereja e passa. A partir de frutos amostrados em Serra do Salitre e em Patrocínio foram obtidos 71 e 85 isolados epifíticos, respectivamente. Em ambas as localidades, as bactérias foram isoladas em maior número que leveduras e fungos filamentosos, representando aproximadamente 90% dos isolados epifíticos.

Foram obtidos 282 isolados potencialmente endofíticos em Viçosa, 28 em Serra do Salitre e 33 em Patrocínio. Em Viçosa, foram isolados bactérias (84%), leveduras (7%) e fungos filamentosos (9%). Em Serra do Salitre foram obtidos apenas isolados endofíticos bacterianos (bastonetes Gram positivos e Gram negativos). Em Patrocínio foram obtidas bactérias e leveduras, mas não fungos filamentosos. Os bastonetes predominaram sobre os cocos, entre os isolados bacterianos epifíticos e endofíticos das três localidades. Dentre os bastonetes, as bactérias Gram negativas foram isoladas em maior número.

Bactérias epifíticas e endofíticas com características culturais de PPFMs do gênero *Methylobacterium* estavam presentes em todas as populações obtidas a partir de frutos de café coletados em Viçosa e no Cerrado Mineiro, representando, em Viçosa, 13 e 16% e, no Cerrado, 61 e 50% do total de bastonetes Gram negativos epifíticos e endofíticos, respectivamente.

As culturas de bactérias, fungos filamentosos e leveduras provenientes de Viçosa, Serra do Salitre e Patrocínio foram incorporadas ao banco de germoplasma do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, para posterior identificação e futuros estudos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATE, A.D. & BHAT, J.V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of the mucilage layer of *Coffee* and *Robusta* cherries. *Applied Microbiology*, **14**: 256-260. 1966.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W. Jr.; AGUILLAR-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*, **47**:229-236. 2001.

AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J.M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J.P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, **42**(4):252-256. 2001.

CHANPRANE, S.; TODD, J.J.; WIDHOLM, J.M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. *Plant Cell Reports*, **16**:222-225. 1996.

ELVIRA-RECUENCO, M. & van VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, **46**:1036-1041. 2000.

FRANK, H.A. & DELA CRUZ A.S. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage layer in Kona coffee cherries. *Journal of Food Science*, **29** (6):850, 1964.

- GAGNÉ, S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, **33**:996-1000. 1987.
- GREEN, P.N. & BOUSFIELD, I.J. A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. *Journal of General Microbiology*, **128**: 623-638. 1982.
- HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Application of the Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:411-416. 1997.
- HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* and plants. *Recent Research Development in Plant Physiology*, **1**:207-213. 1997.
- HOLT, J.G. *Manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1993. 787pp.
- KOCH A.L. Growth measurement. In: GERHARDT, P. ed. *Methodology for general and molecular bacteriology*. Washington, ASM Press, 1994. p.248.
- MCINROY J.A. & KLOEPPER J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, **173**:337-342. 1995.
- MERCIER, J. & LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(1):369-374. 2000.
- PRESTON, G.M.; HAUBOLD, B.; RAINEY, P.B. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, **1**:589-597. 1998.

- REASONER, D.J. & GELDREICH, E.E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied Environmental Microbiology*, **49**:1-7, 1985.
- SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, **33**:1-5. 2001.
- SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, **60**:251-260. 2000.
- ROMANOVSKAYA, V.A.; STOLYAR, S.M.; MALASHENKO, Y.R.; DODATKO, T.N. The ways of plant colonization by *Methylobacterium* strains and properties of these bacteria. *Microbiology*, **70**(2):221-227. 2001.
- THOMPSON, S.S.; MILLER, K.B. & LOPEZ, A.S. Cocoa and coffee. In: DOYLE, M.P., BEACHAT, L.R. & MONTVILLE, T.J. ed. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, ASM Press, 1997. p.659.
- VAN PEE, W. & CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Journal of Food Science*, **37**:171-174. 1972.

COLONIZAÇÃO DE *Coffea arabica* L. POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

INTRODUÇÃO

As bactérias endofíticas colonizam tecidos internos de plantas. Na prática, as bactérias são consideradas endofíticas quando isoladas de material vegetal superficialmente estéril. No entanto, o isolamento de bactérias a partir de tecidos superficialmente estéreis demonstra de forma apenas indireta a colonização endofítica, fazendo-se necessária à demonstração da interação bactéria endofítica-planta *in loco* por meio de estudos microscópicos (HALLMANN et al., 1997). Vários relatos de isolamento de microorganismos endofíticos são encontrados na literatura científica, mas a leitura cuidadosa tem revelado que a superfície do material vegetal não foi adequadamente esterilizada e que o *habitat* endofítico não foi demonstrado microscopicamente (BACON & HINTON, 1997).

A localização *in situ* de bactérias endofíticas pode ser realizada associando-se técnicas microscópicas a técnicas imunológicas ou a técnicas moleculares que empregam sondas gênicas específicas ou genes marcadores (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). O caráter endofítico também pode ser confirmado pela recuperação da bactéria potencialmente endofítica após sua reintrodução na planta.

As bactérias endofíticas podem, entre outros efeitos benéficos, promover o crescimento da planta hospedeira. A promoção de crescimento pode ocorrer em função da produção, pelas bactérias endofíticas, de reguladores de crescimento (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993). As bactérias endofíticas produtoras de sideróforos podem promover o crescimento vegetal por aumentarem a absorção de minerais (DE BELLIS & ERCOLANI, 2001). A colonização endofítica de rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR – *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) tem sido demonstrada por CHANWAY et al., 2000.

O banco de germoplasma do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, contém 360 isolados bacterianos potencialmente endofíticos, obtidos a partir de frutos e de caules de café superficialmente estéreis (SAKIYAMA et al., 2001; CAPÍTULO ANTERIOR: Microbiota endofítica e epifítica em frutos de *Coffea arabica* L.). No presente trabalho é demonstrada a colonização endofítica de *Coffea arabica* L. e de *Coffea canephora* Pierre ex Froenhe por cinco desses isolados bacterianos. A promoção de crescimento em explantes de café devida a colonização desses isolados também é demonstrada.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Os isolados potencialmente endofíticos foram obtidos de caule e frutos cereja de *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí Vermelho, oriundos de Viçosa, Araponga, Serra do Salitre, MG, e Londrina-PR. A Tabela 1 mostra algumas características desses isolados. Os processos de esterilização superficial e isolamento foram realizados conforme descrito por SAKIYAMA et al. (2001), com algumas modificações. Os caules foram escarificados antes do processo de esterilização superficial e a flambagem foi omitida desta etapa. O isolado F7-4 foi caracterizado, por análise filogenética de seqüência parcial de 16S rDNA pela Fundação André Tosello – Campinas, SP, como *Paenibacillus amylolyticus* (SAKIYAMA et al, 2001) e, pelo perfil de ácidos graxos (FAME), como *P. pabuli* (IS=0,933). O isolado F6 foi caracterizado, pelo perfil de ácidos graxos, como *Methylobacterium extorquens* (IS=0,800), enquanto os isolados SS110 e CL4 foram caracterizados como *M. organophilum* (IS=0,932 e IS=0,953, respectivamente). A análise de ácidos graxos foi gentilmente realizada pela Dra. Ellen Dickenstein, Plant Pathology Department, University of Florida. Não foi possível a caracterização do isolado CL8 pela análise de ácidos graxos. Os isolados foram cultivados em ágar nutriente ou caldo nutriente a 28°C.

Tabela 1 – Características dos isolados potencialmente endofíticos obtidos de fruto e caule de *Coffea arabica* L. de diferentes procedências.

Isolado	Procedência	Ano	Órgão	Morfologia	Gram	Catalase
CL4	Viçosa, MG	1999	Caule	Bastonete	Negativo	Positiva
CL8	Viçosa, MG	1999	Caule	Bastonete	Negativo	Negativa
F7-4	Araponga, MG	1999	Fruto	Bastonete	Positivo	Positiva
F6	Londrina, PR	1999	Fruto	Bastonete	Negativo	Positiva
SS110	S. Salitre, MG	2000	Fruto	Bastonete	Negativo	Positiva

Inoculação dos isolados bacterianos em explantes de *Coffea arabica* L. e de *C. canephora* Pierre ex Froenhe.

Os explantes da cultivar Catuaí Vermelho IAC-15 de *Coffea arabica* e os explantes da cultivar Apoatã de *C. canephora* foram obtidos por embriogênese somática a partir de explantes foliares (SANTOS et al., 2000). Após o terceiro subcultivo em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e vitaminas de Gamborg (GAMBORG et al., 1968), os explantes foram cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro/Bioagro/UFV, em duas categorias: explantes com um segmento nodal contendo uma ou duas gemas (0,5 a 1,0 cm de altura) e explantes de ápice caulinar contendo três a quatro gemas axilares (1,0 a 2,0 cm de altura). Cada um dos cinco isolados bacterianos (suspensão contendo 10^7 a 10^8 UFC/mL) foi inoculado em um explante das duas categorias de Catuaí Vermelho e de Apoatã. Um explante inoculado com caldo nutriente estéril foi utilizado como controle. Adicionalmente, para os explantes com um segmento nodal de Catuaí Vermelho, foram utilizados como controles um explante não inoculado e quatro explantes inoculados com suspensão bacteriana autoclavada (uma para cada isolado bacteriano). O total de 30 tratamentos foi disposto em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, na câmara de crescimento do Laboratório acima citado, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h.

Recuperação dos isolados inoculados em explantes de *Coffea arabica* L.

Para verificar a possível colonização epifítica, as superfícies das folhas e dos caules dos explantes de ápice caulinar de Catuaí Vermelho foram pressionadas sobre a superfície de ágar nutriente, 12 dias após a inoculação com os isolados bacterianos CL8, F7-4, F6 e SS110 e com caldo nutriente (controle). Em seguida, os explantes foram lavados em água de torneira estéril, a 150 rpm, por 15 min e alíquotas 100 µl dessa água foram transferidas para caldo nutriente. Os explantes foram, então, lavados em solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, a 150 rpm, por 15 min e superficialmente esterilizados por imersão em etanol a 70%, por 30 segundos, agitação vigorosa em hipoclorito de cálcio a 5%, por 40 segundos, e por nova imersão em etanol a 70%, por 15 segundos. Após agitação em solução tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, a 150 rpm, por 15 min, a esterilização superficial foi repetida. Finalmente, os explantes foram lavados duas vezes em água destilada estéril, 150 rpm, por 15 minutos. Alíquotas de 100 µl de água destilada da última lavagem foram plaqueadas por espalhamento em ágar nutriente para controlar a eficiência do processo de esterilização. As folhas e os caules foram picados, em condições assépticas, e inoculados em caldo nutriente para verificar a possível colonização endofítica. As culturas obtidas em caldo ou em ágar nutriente foram repicadas para novo meio nutriente para verificarem-se as suas características e a sua pureza.

Obtenção de anticorpos policlonais

Os imunógenos consistiram em suspensões das culturas puras dos isolados CL8, F7-4, F6 e SS110 em tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,3 (PBS), ajustadas para 10^8 a 10^9 UFC/mL e emulsionadas, separadamente, na proporção 1:1, com adjuvante completo ou incompleto de Freund. Utilizaram-se 12 coelhos albinos, da raça Nova Zelândia, com três a quatro meses de idade e peso entre 1800 e 2800g. Os coelhos foram subdivididos em quatro grupos. Cada grupo foi submetido a quatro imunizações com a emulsão de um dos isolados, por via intramuscular na coxa, com estímulo imunogênico adicional por via subcutânea, quinzenalmente, por quatro vezes. O sangue total dos animais, coletado efetuando-se uma incisão na veia jugular, foi mantido à temperatura ambiente, por duas horas, e à 4°C, por 12 horas. O soro foi coletado e centrifugado a 2000 g, por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi

fracionado em alíquotas de 0,5 mL e estocado a -80°C . Os soros controle foram obtidos antes da primeira imunização. A detecção e a titulação de anticorpos foram realizadas pelos métodos de microaglutinação em gota, microprecipitação em gota e imunodifusão dupla (MEZENCIO, 1981) e imunofluorescência. A especificidade dos antissoros foi verificada pela reação de imunodifusão dupla, na qual cada antissoro foi testado contra o seu antígeno específico e contra outros seis antígenos bacterianos.

Preparo de cortes histológicos

Os explantes foram esterilizados superficialmente com etanol a 70% e hipoclorito de cálcio a 5%, como descrito acima, e, em seguida, fixados com paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,35% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965) ou incluídos em historesina LEICA 7026. Os cortes histológicos obtidos em criomicrotomo LEICA modelo CM1850, com 10 μm de espessura, a partir das peças fixadas com paraformaldeído, foram utilizados nas reações de imunofluorescência. As peças incluídas em historesina foram utilizadas para a obtenção, em microtomo rotativo automático LEICA modelo RM 2155, de cortes histológicos com 4 μm de espessura que foram corados com azul de toluidina a 1% para observação anatômica dos tecidos vegetais.

Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada com os esfregaços das culturas bacterianas puras fixados com formaldeído a 10%, por 30 minutos, e com os cortes histológicos de ápices caulinares de Catuaí Vermelho obtidos em criomicrotomo. As lâminas com os esfregaços ou os cortes histológicos foram cobertas, a 37°C , por 30 minutos, com a diluição adequada do anticorpo primário (antissoro específico produzido em coelho). Após lavagens com solução salina a 0,85%, as lâminas foram cobertas com uma solução diluída 1:500 em PBS do anticorpo secundário (IgG de cabra anti IgG de coelho) acoplado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FTIC – Sigma F 0382), a 37°C , por 30 min. As lavagens com salina a 0,85% foram repetidas. A emissão de fluorescência foi detectada no microscópio de epifluorescência OLYMPUS BX60, utilizando-se o filtro WB (450 a 480 nm) e as imagens digitalizadas foram

capturadas pelo sistema de câmera CCD OLYMPUS U-CMAD-2 e analisadas pelo programa de análise de imagens Image-Pro^R-Plus, versão 4.0 (Medial Cybernetics).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de anticorpos

Os anticorpos policlonais foram detectados e titulados nos 12 antissoros (Tabela 2). Não foram observadas reações cruzadas entre nenhum dos antissoros contra vários antígenos, pela técnica de imunodifusão dupla (Tabela 3). Os antissoros dois, quatro, sete e doze, diluídos adequadamente, foram utilizados na reação de imunofluorescência com os esfregaços dos respectivos antígenos (Figura 1). Não foram observadas reações de imunofluorescência cruzadas ou reações positivas com os antissoros controle (Figura 2).

Tabela 2 – Títulos dos antissoros obtidos contra os antígenos CL8, F7-4, F6 e SS110, determinados pelas técnicas de microprecipitação em gota, microaglutinação em gota e imunodifusão dupla.

Antissoro	Antígeno	Microprecipitação em gota	Microaglutinação em gota	Imunodifusão dupla
1	CL8	8	≥ 8.192	4
2	CL8	8	≥ 8.192	8
3	CL8	16	≥ 8.192	16
4	F7-4	4	512	2
5	F7-4	16	256	32
6	F7-4	16	≥ 8.192	4
7	F6	16	≥ 8.192	16
8	F6	8	128	16
9	F6	4	128	2
10	SS110	4	128	4
11	SS110	4	128	4
12	SS110	4	512	8

Tabela 3 – Resultados de imunodifusão dupla contra antígenos bacterianos, observa-se a especificidade dos anticorpos.

Antissoro	Antígenos						
	CL8	F7-4	F6	SS110	A1*	B4*	L12*
CL8:							
1	+	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-
F7-4:							
4	-	+	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-
F6:							
7	-	-	+	-	-	-	-
8	-	-	+	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-
SS110:							
10	-	-	-	+	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	+	-	-	-

(*) Isolados potencialmente endofíticos obtidos de frutos de *C. arabica* cultivar Catuaí Vermelho, em Viçosa, MG.

(+) Reação positiva

(-) Reação negativa

Colonização epifítica e endofítica de *C. arabica*

Os explantes de Catuaí Vermelho inoculados com os isolados F7-4, CL8, F6 e SS110 foram colonizados epifiticamente, uma vez que foi observado crescimento no ágar nutriente pressionado com as superfícies das folhas e dos caules desses explantes. Os tubos de caldo nutriente inoculados com alíquotas da água de torneira estéril utilizada na pré-lavagem dos explantes, também apresentaram crescimento. As culturas obtidas apresentaram as características típicas de cada isolado e estavam puras. Não foi observado crescimento bacteriano a partir do explante controle. As superfícies das partes aéreas das plantas são normalmente colonizadas por um grande número de microorganismos (MERCIER & LINDOW, 2000) e a colonização epifítica de frutos de cafeeiros tem sido observada (SILVA et al., 2000; SAKIYAMA et al., 2000; PAULA et al., 2000). Os isolados F6 e SS110 pertencem ao gênero *Methylobacterium*, cujas espécies, conhecidas como metilotróficas facultativas de pigmentação rósea (PPFMs – Pink-Pigmented Facultative Methylo-trophs),

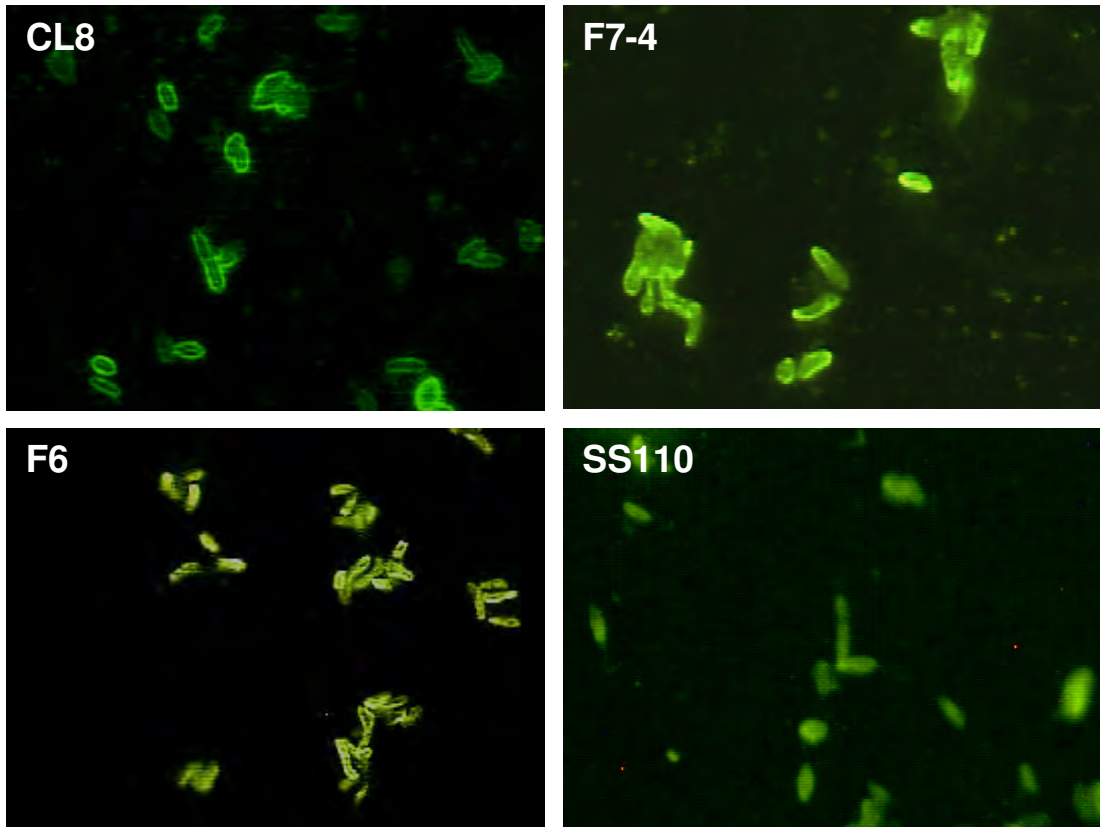


Figura 1 – Imunofluorescência indireta dos isolados bacterianos CL8, F7-4, F6 e SS110. Foi utilizado anticorpo específico de coelho, contra cada isolado, e IgG de cabra anti IgG de coelho acoplado a isotiocianato de fluoresceína.

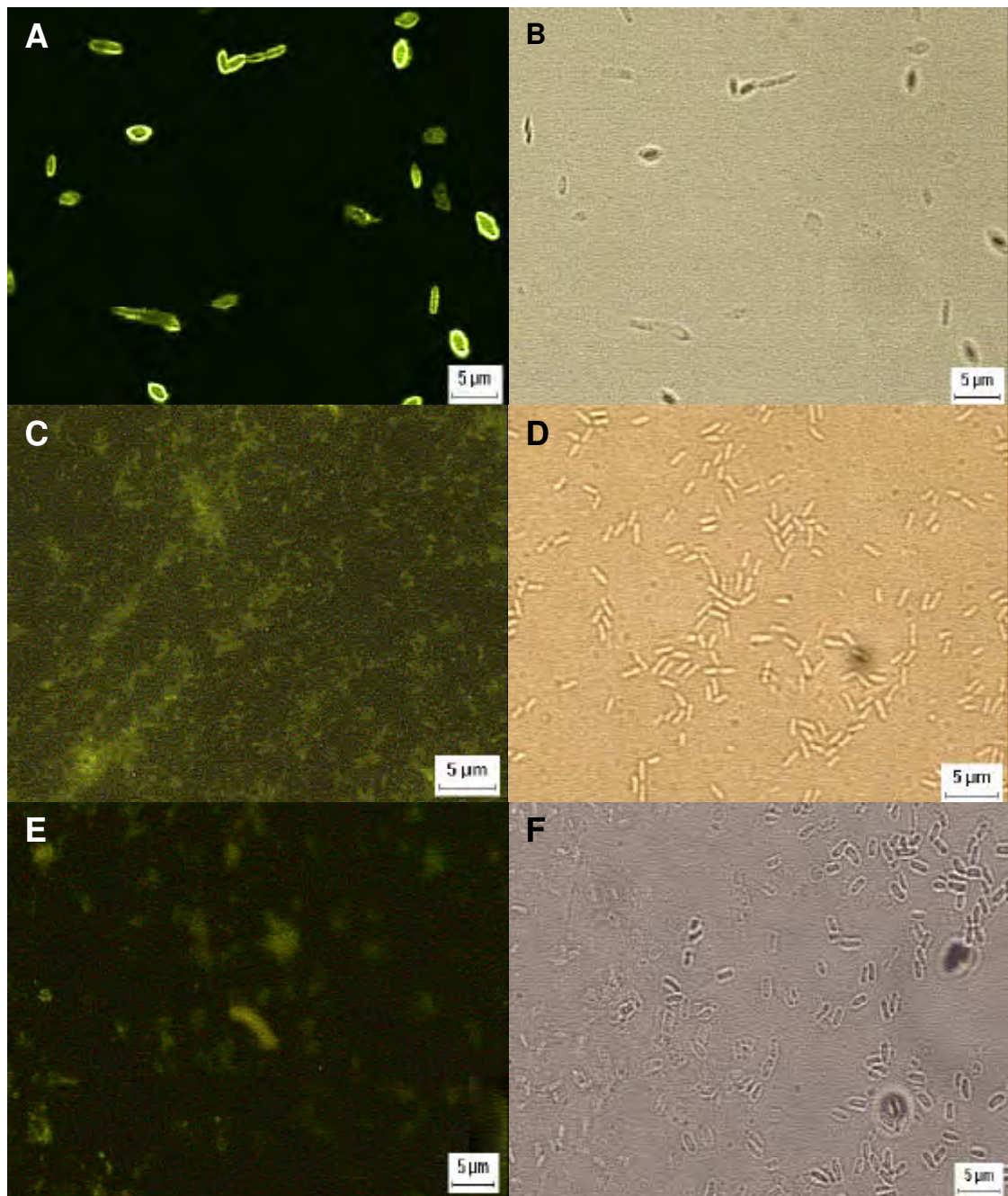


Figura 2 – Imunofluorescência indireta (A, C e E) e microscopia ótica (B, D e F). A: antígeno CL8 contra seu antissoro específico C: antígeno F6 contra o antissoro CL8; E: antígeno CL8 contra seu antissoro controle. B e F: esfregaços da suspensão do isolado CL8; D: esfregaço da suspensão do isolado F6.

têm sido encontradas colonizando epifiticamente a maioria das espécies vegetais (HOLLAND, 1997). A associação de bactérias do gênero *Paenibacillus*, como o isolado F7-4, com plantas têm sido observada (YOON et al., 1998; SELDIN et al.; GERN et al., 2001).

A colonização endofítica de *C. arabica* pelos isolados F7-4, CL8, F6 e SS110 também foi observada pelo crescimento bacteriano em todos os tubos de caldo nutriente inoculados com folhas e caules picados dos explantes esterilizados superficialmente, com exceção dos tubos com folhas picadas do explante inoculado com o isolado CL8. Este fato parece indicar que o isolado CL8, que foi originalmente obtido de caule, não colonizou endofiticamente as folhas, embora a colonização epifítica tenha sido observada. As culturas recuperadas apresentaram as características típicas de cada isolado e estavam puras. Não houve crescimento a partir das folhas e caules picados do explante controle, assim como a partir da última água de lavagem do processo de esterilização superficial.

A colonização endofítica foi demonstrada *in situ* pela técnica de imunofluorescência (Figura 3). O isolado endofítico CL8 foi detectado no sistema vascular do caule de Catuaí Vermelho, a exemplo de *Herbaspirillum* em sorgo (JAMES et al., 1997) e de *Azoarcus* sp em gramíneas (HUREK et al., 1994). A colonização *in situ* do sistema vascular do caule do híbrido *Picea glauca* x *P. engelmannii* por *Pseudomonas fluorescens* e por *Bacillus polymyxa* também foi detectada pela técnica de imunofluorescência (SHISHIDO et al., 1999).

Os resultados mostram claramente que os isolados CL8, F7-4, F6 e SS110 colonizaram endofiticamente e epifiticamente explantes de Catuaí Vermelho, sem causar danos aparentes aos tecidos vegetais. Da mesma forma, *Pseudomonas* sp. colonizou endofiticamente e epifiticamente explantes de cultura de tecidos de tomateiro (PILLAY & NOWAK, 1997).

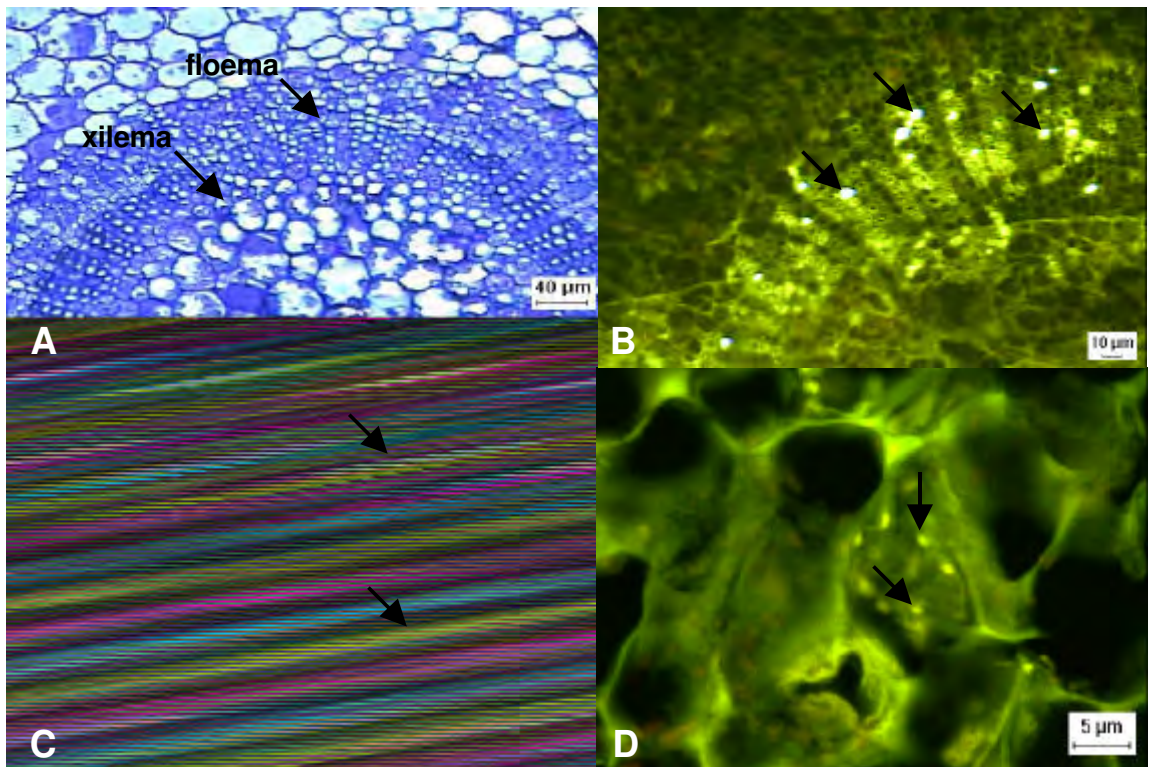


Figura 3 – Localização *in situ* do isolado CL8 em cortes histológicos transversais de caule de explantes de ápice caulinar de *Coffea arabica* L. A: microscopia ótica, coloração de azul de toluidina a 1%; B, C e D: imunofluorescência indireta; as flechas indicam pontos de emissão de fluorescência devido à reação imunológica entre o anticorpo primário, antissoro contra o isolado CL8 produzido em coelho, e o anticorpo secundário, IgG de cabra acoplado a isotiocianato de fluoresceína, anti IgG de coelho.

Promoção de crescimento em explantes de *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex Froenhe

O desenvolvimento dos explantes de Catuaí Vermelho e Apatã inoculados com os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 foi maior do que o dos respectivos controles (Figuras 4 a 7 e Tabela 4). O fato desses isolados, obtidos de Catuaí Vermelho (*C. arabica*), terem colonizado explantes de Apatã (*C. canephora*), indica que essa colonização não é espécie-específica. Além de promover o crescimento apical, os isolados promoveram a diferenciação de primórdios radiculares em alguns explantes (Figura 8 e Tabela 4). A rizogênese ocorreu também em um explante controle, no entanto, o desenvolvimento e o tamanho da raiz foram menores.

A promoção de crescimento tem sido atribuída a bactérias associadas a plantas, como as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR – Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria), as bactérias endofíticas e as bactérias epifíticas (MA et al., 2001; STURZ & NOWAK, 2000; HALLMANN et al, 1997; SELDIN et al; 1998). Algumas PGPRs estimulam o crescimento radicular por sintetizarem ácido indol-acético, aumentando assim a absorção de minerais e nutrientes do solo na zona radicular (LAMBRECHT et al., 2000). As PPFMs, como os isolados CL4, F6 e SS110, participam do metabolismo de nitrogênio, induzem a germinação de sementes, utilizam o metanol catabolizado pelas plantas (HOLLAND, 1997), produzem citocininas (IVANOVA et al., 2000) e podem proteger plantas contra fatores ambientais adversos (ROMANOVSKAYA et al., 2001). A promoção de crescimento em plântulas de *Pinus contorta* foi observada pelo aumento significativo da biomassa após a inoculação de *Bacillus polymyxa* (HOLL & CHANWAY, 1992). *B. polymyxa* foi reclassificado como *Paenibacillus polymyxa* (ASH et al., 1993), sendo, portanto, do mesmo gênero do isolado F 7-4. Estirpes de bactérias de *Paenibacillus azotofixans* fixadoras de nitrogênio tem predominado na rizosfera de gramíneas forrageiras e milho (SELDIN et al., 1998).

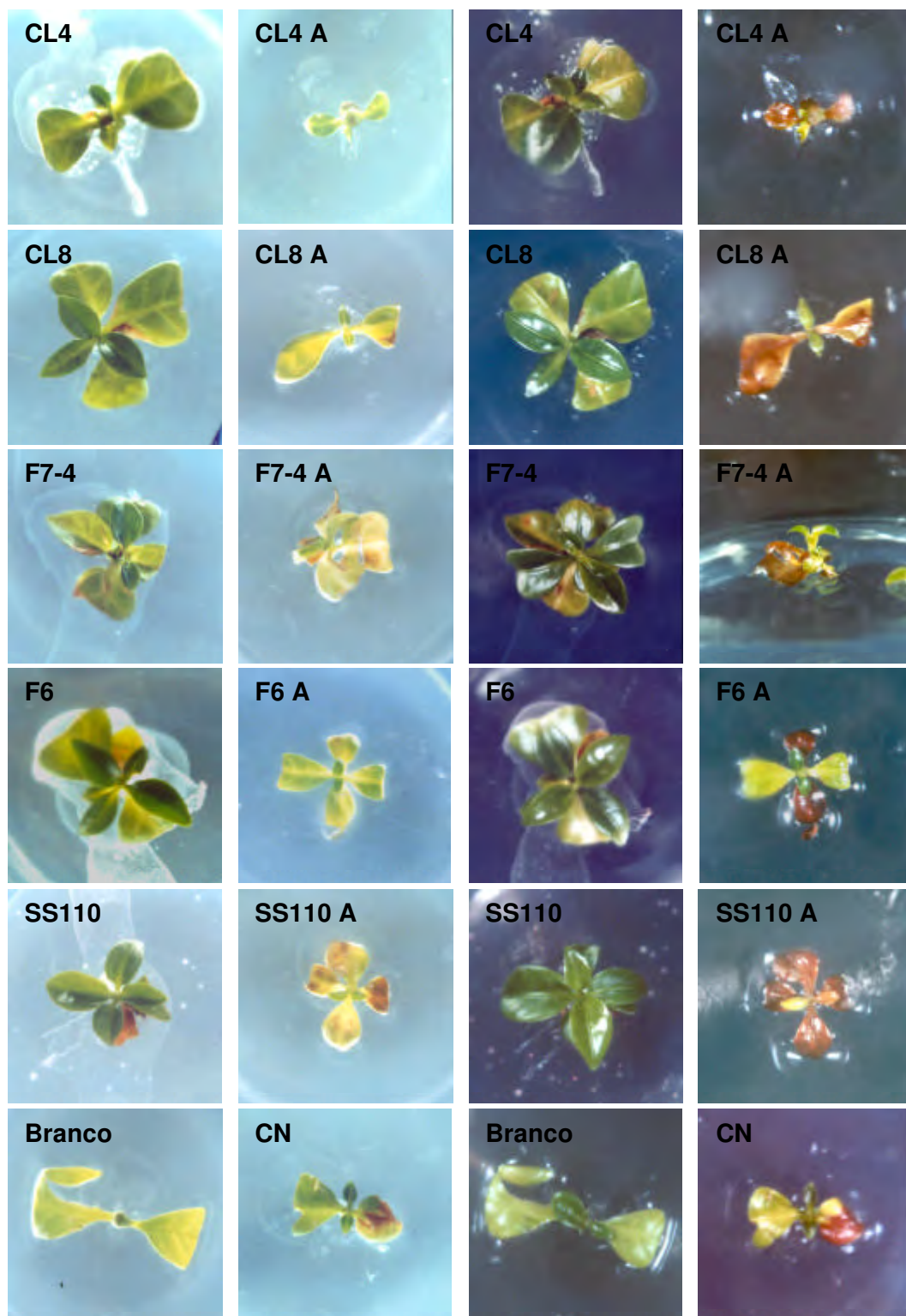


Figura 4 – Desenvolvimento de explantes com um segmento nodal de Catuaí Vermelho, inoculados com os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 e seus respectivos controles autoclavados (CL4A, CL8A, F7-4A, F6A e SS110A), inoculados com caldo nutriente (CN) e não-inoculados (branco), aos 24 (colunas 1 e 2) e 52 dias (colunas 3 e 4).

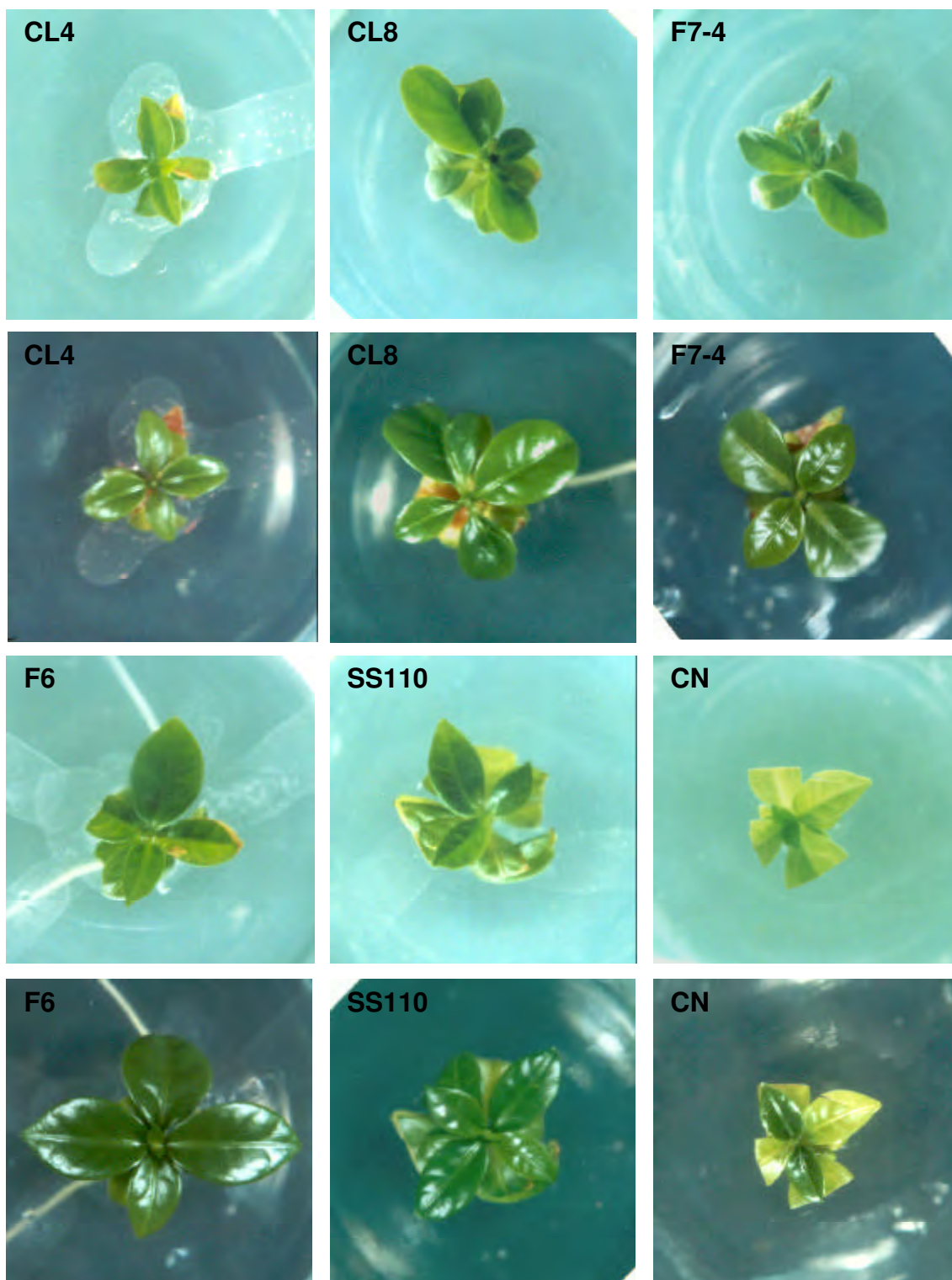


Figura 5 – Desenvolvimento de explantes de ápice caulinar de Catuaí Vermelho, inoculados com os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 e inoculados com caldo nutriente (CN), aos 24 (linhas 1 e 3) e 52 dias (linhas 2 e 4).

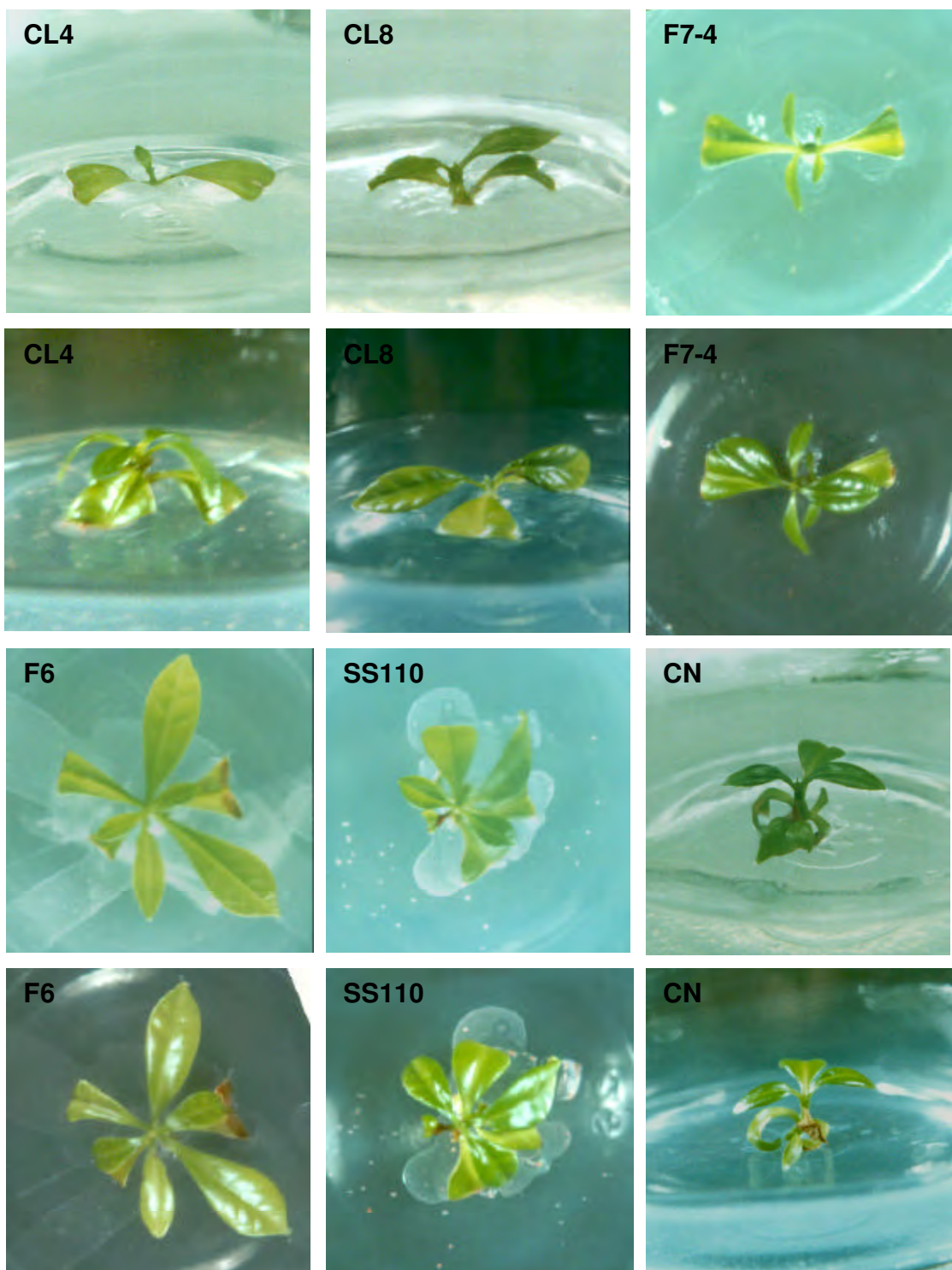


Figura 6 - Desenvolvimento de explantes com um segmento nodal de Apatã, inoculados com os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 e inoculados com caldo nutriente (CN), aos 24 (linhas 1 e 3) e 52 dias (linhas 2 e 4).

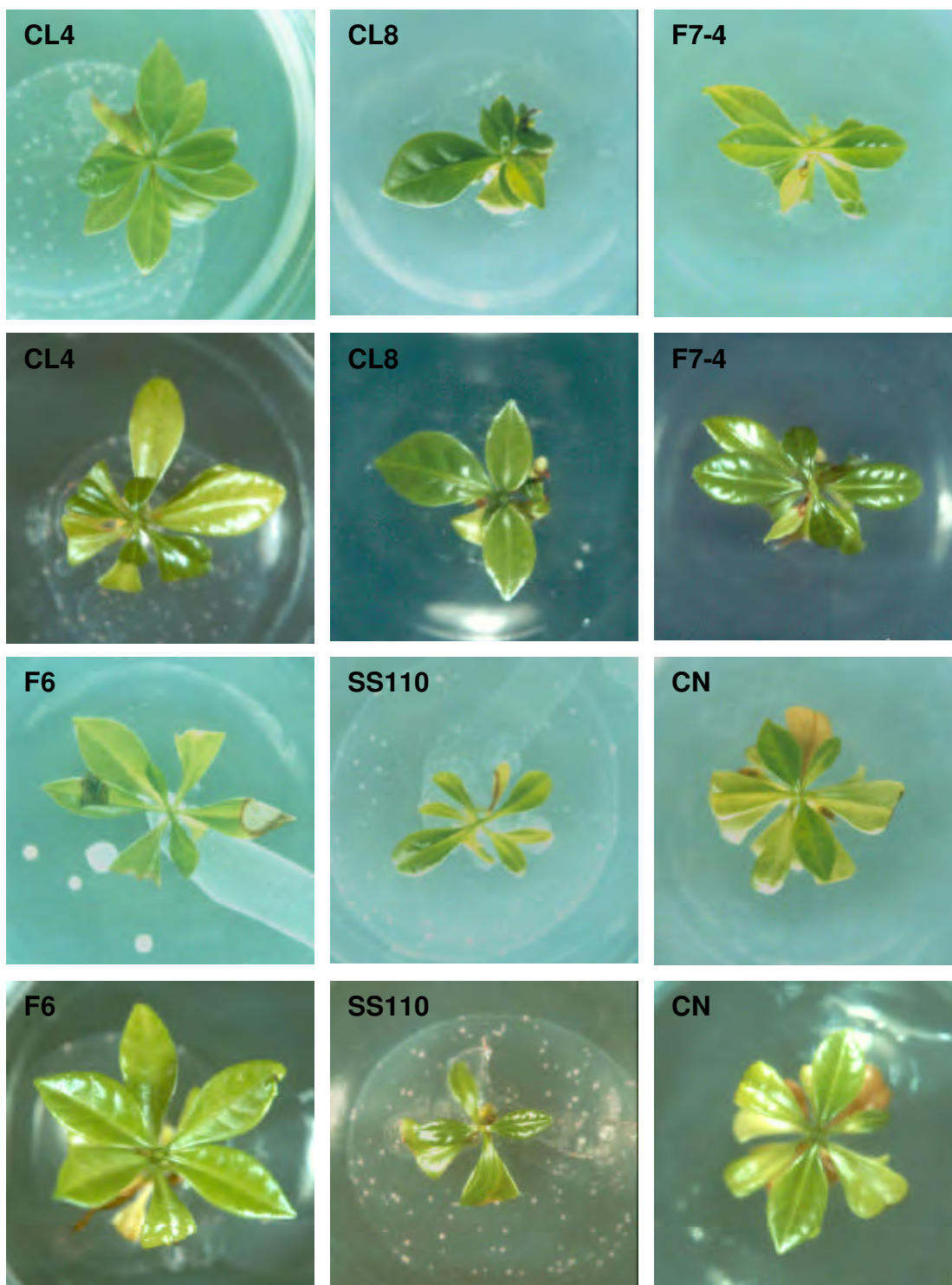


Figura 7 - Desenvolvimento de explantes de ápice caulinar de Apoatã, inoculados com os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 e inoculados com caldo nutriente (CN), aos 24 (linhas 1 e 3) e 52 dias (linhas 2 e 4).

Tabela 4 – Número de explantes inoculados com os isolados CL4, CL8, F7-4, F6, SS110 e de explantes controle que apresentaram morte foliar e rizogênese até 50 dias após a inoculação.

Explante	Tratamento											
	CL4	CL4A ^a	CL8	CL8A ^a	F7-4	F7-4A ^a	F6	F6A ^a	SS110	SS110A ^a	Branco	CN ^b
Número de explantes com morte foliar:												
Catuaí SN ^c	0	3	1	3	2	2	0	3	1	3	1	1
Catuaí AC ^d	0	—	0	—	1	—	0	—	0	—	—	0
Apoatã SN	1	—	0	—	0	—	0	—	0	—	—	0
Apoatã AC	0	—	0	—	1	—	1	—	0	—	—	1
Número de explantes com rizogênese:												
Catuaí SN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catuaí AC	1	—	1	—	1	—	1	—	0	—	—	0
Apoatã SN	0	—	1	—	0	—	0	—	0	—	—	1
Apoatã AC	0	—	0	—	0	—	0	—	1	—	—	0

^a Tratamentos controle em que os explantes foram inoculadas com as suspensões bacterianas autoclavadas.

^b CN = Caldo nutriente

^c SN = Segmento nodal

^d AC = Ápice caulinar

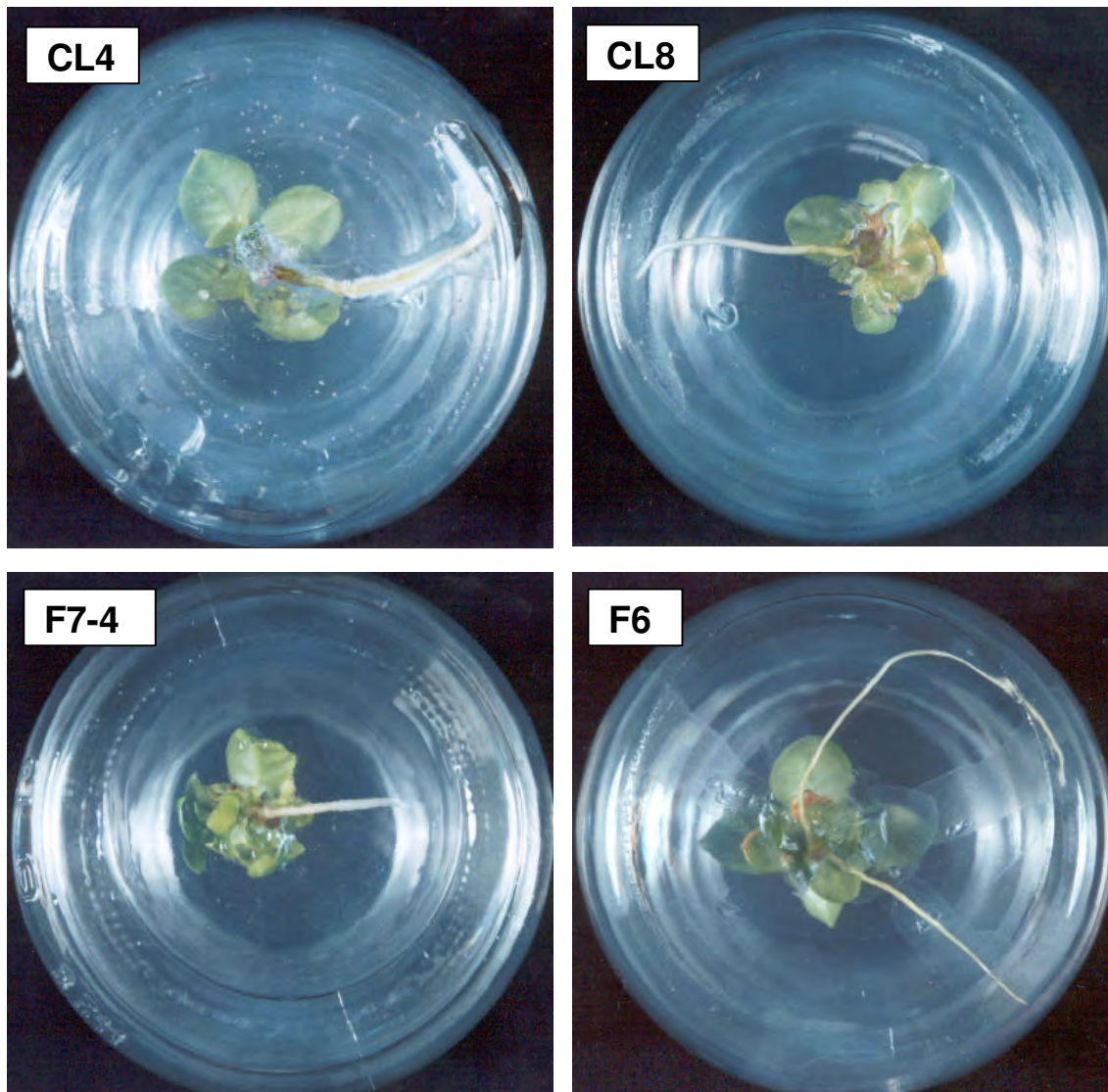


Figura 8 – Diferenciação de primórdios radiculares em explante de Catuaí Vermelho com um segmento nodal inoculado com o isolado CL4 e de explantes de ápices caulinares inoculados com os isolados CL8, F7-4 e F6.

CONCLUSÕES

Os antissoros policlonais contra os isolados CL8, F7-4, F6 e SS110 foram detectados e titulados por diferentes técnicas sorológicas. Não foram observadas reações cruzadas entre nenhum dos antissoros contra vários antígenos, pela técnica de imunodifusão dupla. Também não foram observadas reações de imunofluorescência cruzadas ou reações positivas com os antissoros controle.

Os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 colonizaram epifiticamente e endofiticamente explantes de *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí Vermelho. A colonização endofítica foi comprovada pelo reisolamento dos isolados. Em função da especificidade dos antissoros observada nos resultados, e utilizando-se a imunofluorescência indireta, pôde-se mostrar *in situ* a colonização do isolado CL8 no sistema vascular do caule.

Os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 promoveram o crescimento de explantes da cultivar Catuaí Vermelho de *Coffea arabica* L. e da cultivar Apatã de *Coffea canephora* Pierre ex Froenhe. Portanto, a interação desses isolados com explantes de café não é espécie-específica. A rizogênese foi observada em alguns explantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**(3-4):253-260. 1993.

BACON, C.W. & HINTON, D.M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. *In*: HURST, C.; KNUDSEN, G.R.; McLNERNEY, M.; STZENBACH, L.; WALTER, M.V. (Eds.). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, 1997. p. 413-421.

- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F.B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management*, **133**:81-88. 2000.
- DE BELLIS, P. & ERCOLANI, G.L. Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4):1945-1948. 2001.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, a indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, **154**:145-150. 1993.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells. *Journal of Experimental Research*, **50**: 51-158. 1968.
- GERN, R.M.M.; FURLAN, S.A.; NINOW, J.L.; JONAS, R. Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**(5):632-635. 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:895-914. 1997.
- HOLL, F.B. & CHANWAY, C.P. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of microbiology*, **38**(4):303-308. 1992.
- HOLLAND, M.A. *Methylobacterium* and plants. *Recent Research Development in Plant Physiology*, **1**:207-213. 1997.

- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGNU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, **176** (7):1913-1923. 1994.
- IVANOVA, E.G.; DORONINA, N.V.; SHEPELYAKOVSKAYA, A.O. LAMAN, A.G.; BROVKO, F.A.; TROTSENKO, Y.A. Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiology*, **69**(6):646-651. 2000.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, **48**:785-797. 1997.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **27**:137A. 1965.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, **8**(7):298-300. 2000.
- MA, W.; ZALEC, K.; GLIC, B.R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology*, **35**:137-144. 2001.
- MERCIER, J. & LINDOW, S.E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(1):369-374. 2000.
- MEZENCIO, J.M.S. *Cinética de produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antigênico entre estirpes de Rhizobium japonicum*. UFV, Viçosa, 1981. 42p. (Dissertação de mestrado).

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-479. 1962.
- PILLAY, V.K. & NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**:354-361. 1997.
- REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **17**(1):29-54. 1998.
- ROMANOVSKAYA, V.A.; STOLYAR, S.M.; MALASHENKO, Y.R.; DODATKO, T.N. The ways of plant colonization by *Methylobacterium* strains and properties of these bacteria. *Microbiology*, **70**(2):221-227. 2001.
- SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in Applied Microbiology*, **33**:1-5. 2001.
- SANTOS, A.C.P.; CORDEIRO, A.T.; CAMPOS, R.C.; OTONI, W.C.; ZAMBOLIM, L. Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: I Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, Poços de Caldas, 2000. *Resumos expandidos...* v.1. p156-159.
- SELDIN, L.; ROSADO, A.S.; CRUZ, D.W.; NOBREGA, A; VAN ELSAS, J.D.; PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(10):3860-3868. 1998.

- SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting Rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **29**(2):191-196. 1999.
- SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, **60**:251-260. 2000.
- STURZ, A.V. & NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, **15**(2):183-190. 2000.
- YOON, J.H.; YIM, D.K.; LEE, J.S.; SHIN, K.S.; SATO, H.H.; LEE, S.T.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**:833-837. 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

Os protocolos de esterilização superficial e de isolamento de bactérias endofíticas foram estabelecidos para frutos e caules de café arábica.

Um isolado bacteriano endofítico produtor de pectina liase extracelular foi fisiologicamente e fenotipicamente caracterizado e tentativamente identificado por sequenciamento parcial de 16S rDNA como *Paenibacillus amylolyticus*. Este isolado é um instrumento promissor para estudos de regulação de enzimas pectina liases.

A incidência de microbiota epifítica e endofítica foi constatada em amostras de frutos de café arábica oriundas de diferentes localidades. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram isolados, sendo em Viçosa 1.042 isolados epifíticos e 282 potencialmente endofíticos, em Serra do Salitre 71 isolados epifíticos e 28 potencialmente endofíticos e em Patrocínio 85 isolados epifíticos e 33 potencialmente endofíticos. As bactérias foram isoladas em maior número, sendo que os bastonetes predominaram sobre os cocos e, dentre os bastonetes, as bactérias Gram negativas. Bactérias epifíticas e endofíticas com características culturais de PPFMs do gênero *Methylobacterium* estavam presentes em todas as populações obtidas a partir de frutos de café coletados em Viçosa e no Cerrado Mineiro, representando, em Viçosa, 13 e 16% e, no Cerrado, 61 e 50% do total de bastonetes Gram negativos epifíticos e endofíticos, respectivamente.

Os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 foram inoculados e colonizaram epifiticamente e endofiticamente explantes de *Coffea arabica* L. cultivar Catuaí Vermelho produzidos por embriogênese somática. A colonização endofítica foi comprovada pelo reisolamento dos isolados. Em função da especificidade dos antissoros observada nos resultados, e utilizando-se a imunofluorescência indireta, pôde-se mostrar *in situ* a colonização do isolado CL8 no sistema vascular do caule. Os isolados CL4, CL8, F7-4, F6 e SS110 promoveram o crescimento de explantes da cultivar Catuaí Vermelho de *Coffea arabica* L. e da cultivar Apoatã de *Coffea canephora* Pierre ex Froenhe. Portanto, a interação desses isolados com explantes de café não é espécie-específica.