

HELSON MÁRIO MARTINS DO VALE

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS
EM FRUTOS DE CAFÉ CEREJA (*Coffea arabica* L.) E
SUCESSÃO DURANTE A SECA NATURAL.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

HELSON MÁRIO MARTINS DO VALE

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS EM FRUTOS
DE CAFÉ CERVEJA (*Coffea arabica* L.) e SUCESSÃO DURANTE A SECA
NATURAL**

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

APROVADA: 08 de Maio de 2009.

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

Prof. Maurício Dutra Costa
(Co-Orientador)

Prof. Olinto Liparini Pereira

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

*Aos meus queridos pais, Manoel e
Evaíres.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor permanente, por me ter proporcionado sabedoria e perseverança para vencer os obstáculos, e pela presença insubstituível em cada instante de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de tornar possível a realização deste desejo pessoal.

A meus pais, Manoel e Evaíres, pela vida; aos meus irmãos, Edna, Elcindo, Edinalva e Elcione, pelo incentivo, pelo apoio e pela compreensão.

A meus pais mineiros, Silas e Anália, pela presença, pelo carinho e pela atenção.

A meus irmãos mineiros, Daniel Bonoto e Douglas Baliza, pelo companheirismo que foi indispensável a cada momento e por amenizarem as dificuldades e os obstáculos encontrados no caminho.

Ao Professor Arnaldo Chaer Borges, por sua orientação, pela paciência, pela compreensão e pela confiança.

Aos meus co-orientadores, Maurício Dutra Costa, Marcos Rogério Tótola e Célia Alencar de Moraes, pelos ensinamentos e contribuições na condução dos experimentos e nas análises.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, pelo convívio agradável e pela contribuição para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Illycaffé S.p.a, meus agradecimentos por propiciar parte dos recursos financeiros pelo convênio Illycaffé Funarbe UFV.

À Cássia Fernandes, pela colaboração durante a realização de parte desse trabalho no laboratório L.B.B.M.A.

Ao grande amigo Marcelo Nagem, pela preocupação, pelo apoio e pela ajuda inestimável na realização do meu desejo de ser professor.

Aos amigos e companheiros de Laboratório, Alexander, Maurício, Júlio, Thiago, Isabella, Raul, Paulo, Daniela e Ana Cristina pela convivência e pela cooperação.

À Nilcéa, Laura e Rejane, pelo apoio e pela compreensão dispensados.

Ao Evandro, Toninho, Paulo, pela amizade e pelo auxílio no dia-a-dia, e aos demais funcionários do DMB.

Aos amigos Geraldo, Marcio, Gisele, Patrícia, Marina, Maike, Fabiane e Bruno, por todas as brincadeiras, pelas conversas, pela preocupação e pelo apoio.

Aos demais amigos dos Laboratórios de Anaeróbios, Alimentos, Industrial, Fisiologia, Genética, Micorriza e Petróleo.

A todas as pessoas que, de alguma forma, apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

HELSON MÁRIO MARTINS DO VALE, filho de Manoel Costa do Vale e Evaíres Martins do Vale, nasceu em Riachão, Maranhão, Brasil, no dia 14 de dezembro de 1978.

Em 2002, licenciou-se em Ciências Agrícolas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Em março de 2005 concluiu seu mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Em agosto de 2005 ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em maio de 2009.

ÍNDICE

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Área de estudo.....	12
3.2 Amostragem dos frutos de café	12
3.3 Processamento das amostras.....	13
3.4 Quantificação, isolamento e cultivo de leveduras.	14
3.4.1 Identificação dos isolados de leveduras.....	14
3.5 Quantificação, isolamento e cultivo de leveduras endofíticas	17
3.5.1 Identificação dos isolados de leveduras endofíticas	18
3.5.1.1 Análise do perfil de ácidos graxos.....	18
3.5.2 Análise de seqüências de rDNA 26S	19
3.5.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	20
3.6 Diversidade genética de leveduras endofíticas cultiváveis e não cultiváveis.	21
3.6.1 Extração de DNA total de leveduras endofíticas em frutos de café.	21
3.6.2 Amplificação do rDNA 26S de leveduras endofíticas cultiváveis e não- cultiváveis	22
3.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	23
3.6.4 Construção da biblioteca de rDNAs 26S da comunidade de leveduras endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis associadas aos frutos de café.	25
3.6.4.1 Amplificação dos rDNAs 26S	25
3.6.4.2 Clonagem e sequenciamento dos rDNAs 26S	25
3.6.5 Análise comparativa das seqüências dos rDNAs 26S da comunidade de leveduras endofíticas associadas aos frutos de café.....	27
3.7 Diversidade e sucessão de leveduras durante o processo de seca natural dos grãos.	27

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Comunidades de leveduras epifíticas e endofíticas isoladas de fruto de café cereja	29
4.2 Identificação dos isolados de leveduras.....	34
4.3 Identificação dos isolados de leveduras endofíticas	40
4.4 Análise da diversidade de leveduras epifíticas e endofíticas cultiváveis e não cultiváveis por PCR-DGGE.....	45
4.6 Diversidade e sucessão leveduras durante o processo de seca natural dos grãos.....	58
5 CONCLUSÕES	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Amostras e descrição das áreas de coleta das 14 amostras de frutos de café cereja obtidas em lavouras com cultivares de *Coffea arabica* (L.) localizadas a diferentes altitudes no Município de Araponga, MG..... 13
- Tabela 2 – Número de morfotipos e unidades formadoras de colônia de leveduras epifíticas e endofíticas nas 14 amostras de café cereja obtidas em lavouras de cultivares de *Coffea arabica* (L.) localizadas a diferentes altitudes no Município de Araponga, MG..... 30
- Tabela 3 – Descrição das características morfológicas dos isolados de leveduras de frutos de *Coffea arabica* L. cultivados em meio MYGP por até 5 dias a 28 °C..... 31
- Tabela 4 – Identificação por meio de sequência de rDNA 26S e distribuição taxonômica dos isolados de leveduras obtidos de frutos de café cereja de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L..... 40
- Tabela 5 – Identificação com base no perfil FAME, pelo sistema Sherlock® (MIDI), dos isolados de leveduras endofíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil..... 45
- Tabela 6 - Matriz de similaridade da comunidade de leveduras com base na análise das imagens dos perfis de DGGE de rDNA 26S de frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil. 52

Tabela 7 - Matriz de similaridade da comunidade leveduras endofíticas com base na análise das imagens dos perfis de DGGE de rDNA 26S de frutos de café cereja (<i>Coffea arabica</i> L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.	54
Tabela 8 - Identificação dos clones presentes na biblioteca de rDNA 26S de microrganismos presentes em frutos de café cereja (<i>Coffea arabica</i> L.), cultivar Catuaí Vermelho, 1189 metros de altitudes, na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.....	56
Tabela 9 - Matriz de similaridade com base nos perfis de DGGE de rDNA 26S da comunidade de levedura associada a grãos de café despolidos, Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido de cimento.	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Aspecto morfológico de colônias de leveduras isoladas de frutos cereja (*Coffea arabica* L.) crescidas a 28 °C por 5 dias em meio de cultura MYGP..... 32
- Figura 2 – Árvore mostrando o agrupamento filogenético entre todos os isolados de leveduras totais taxonomicamente similares baseado nas seqüências de rDNA 26S. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®]. 35
- Figura 3 – Árvore mostrando o agrupamento filogenético dos representantes dos grupos de isolados de leveduras totais (epifíticas e endofíticas) em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, a microrganismos taxonomicamente similares baseado nas seqüências de rDNA 26S. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro *Nearest Neighbor Interchange* (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®]. 36
- Figura 4 – Árvore mostrando o agrupamento filogenético dos isolados de leveduras endofíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da

Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, a microrganismos taxonomicamente similares baseado nas seqüências de rDNA 26S. A barra de escala indica 2% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro *Nearest Neighbor Interchange* (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®]. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no Banco de Dados GenBank. 43

Figura 5 – Perfil eletroforético de fragmentos de rDNA 26S dos isolados de leveduras endofíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, e leveduras referências e agrupamento utilizando o programa GelCompar II[®]..... 44

Figura 6 – Perfis eletroforéticos de DDGE de seqüências de rDNA 26S, leveduras epifíticas e endofíticas presentes em frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes. Catuaí Vermelho (CV), Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Vermelho (BV), e Bourbon Amarelo (BA). Amostras de plantações localizadas em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil. 48

Figura 7 – Perfis eletroforéticos de DDGE de seqüências de rDNA 26S, leveduras endofíticas presentes em frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes. Catuaí Vermelho (CV), Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Vermelho (BV), e Bourbon Amarelo (BA). Amostras de plantações localizadas em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil..... 49

Figura 8 – Riqueza (R) das comunidades de leveduras epifíticas e endofíticas presentes em frutos de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes em metro. 1 = CV-676; 2 = CA-676; 3 = BV-687;

4 = BA-687; 5 = CV-956; 6 = CA-956; 7 = CA-1.013; 8 = CV-1.013;
9 = BA-1.062; 10 = BV-1067; 11 = BA-1067; 12 = BV-1.101; 13 =
CA-1.187; e 14 = CV-1.187 m. CA = Catuaí Amarelo; CV = Catuaí
Vermelho; BA = Bourbon Amarelo; e BV = Bourbon Vermelho..... 50

Figura 9 – Perfis eletroforéticos de DDGE e a comparação das imagens dos perfis de DGGE baseado em fragmentos de rDNA 26S de leveduras associadas a frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes no programa GelCompar II®. Dados de amostragem são indicados. Escala (20-100) indica o nível de similaridade..... 51

Figura 10 – Perfis eletroforéticos de DDGE e a comparação estatística dos perfis de DGGE baseado em fragmentos de rDNA 26S da comunidade de levedura edofítica associada a frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes, utilizando o programa GelCompar II®. Dados de amostragem são indicados. Escala (20-100) indica o nível de similaridade. 54

Figura 11 - Árvore mostrando o agrupamento filogenético das seqüências dos genes rDNA 26S obtidas a partir de clones componentes da biblioteca de rDNAs 26S de microrganismos presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, 1189 metros de altitudes, na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil. A barra de escala indica 10% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro *Nearest Neighbor Interchange* (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0®. Número entre colchetes corresponde ao total de clones do grupo. 57

Figura 12 – Perfis eletroforéticos de DDGE baseado em fragmentos de rDNA 26S da comunidade de levedura associada a grãos de café (*Coffea arabica* L) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados

durante a seca natural. M = marcadores e linhas 1-14 = dias de secagem..... 60

Figura 13 – Riqueza (R) da comunidade de levedura da comunidade de levedura associada a grãos de café (*Coffea arabica* L) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido de cimento. 61

Figura 14 – Perfis eletroforéticos de DDGE e a comparação estatística dos perfis de DGGE da comunidade de levedura associada a grãos de café despulpados, Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural. Dias de amostragem são indicados. Escala (40-100) indica o nível de similaridade..... 61

RESUMO

VALE, Helson Mário Martins do, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2009. **Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.) e sucessão durante a seca natural.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Co-orientadores: Marcos Rogério Tótola e Maurício Dutra Costa.

A diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja das cultivares Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Bourbon Vermelho e Bourbon Amarelo em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, foi estudada por metodologias dependentes e independentes de cultivo. A densidade de leveduras epifíticas e endofíticas em frutos de café é variável, menos de 25 UFC.fruto⁻¹ a 6,5 x 10⁴ UFC.fruto⁻¹. As 36 leveduras isoladas foram agrupadas em doze morfotipos e a árvore filogenética reconstruída com dados de sequências de bases de rDNA 26S mostrou o agrupamento com as sequências de *Candida smithsonii*, *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus flavescens*, *Meira geulakonigii*, *Pseudozyma* sp e *Sporobolomyces* sp., já depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O isolado LEM 647-9, proveniente de Bourbon Vermelho, 1101 m, foi o único com identidade correspondente a *Meira geulakonigii*, um fungo *yeast-like* classificado em Ustilaginales, a mesma ordem de *Pseudozyma*. A ocorrência de um só morfotipo de leveduras endofíticas cultiváveis em *Malt yeast glucose peptone medium* (MYGP), contendo cloranfenicol, em apenas 4 amostras de café cereja é considerada baixa. As endofíticas foram identificadas com base no perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), pelo sistema de identificação Sherlock[®] (MIDI), e por análise filogenética de sequências de rDNA 26S. As sequências parciais de rDNA destes isolados mostraram identidade entre 96 e 100 % com as correspondentes a *Candida*, *Pichia* e *Brettanomyces*. Pela análise filogenética a maior identidade foi com *Candida* e *Pichia*. A constatação de *C. diddensiae*, *P. guilliermondii* e *C. parapsilosis* como endofíticas em frutos de café sadios no estágio cereja se configura como relato novo sobre nicho de ocorrência das

espécies. Clones de uma biblioteca de rDNA 26S obtida por amplificação de DNA metagenômico de frutos cereja da C.Vermelho, coletada a 1189 m, foram sequenciados. Doze clones mostraram 98-99% de identidade com rDNAs de fungos filamentosos. Estes correspondem a *Mycosphaerella*, *Glomerella*, *Microdiplodia* e *Phaeophaeria* e a alguns fungos filamentosos potencialmente endofíticos e ainda não identificados, cujas sequências estão presentes no GenBank. A DGGE da sucessão de leveduras associadas aos grãos de *C. arabica* durante os 14 dias do período de secagem natural no terreiro de cimento revelou UTOs dominantes já nos 4 primeiros dias. A análise com o programa GelCompar II[®] demonstrou que o perfil de UTOs da comunidade é alterado a cada dois dias, até o 12^o dia de secagem. A determinação de ocorrência e diversidade de leveduras endofíticas nos frutos de café cereja se constitui em etapa fundamental para identificar a síntese de metabólitos produzidos por esses microrganismos e para desenvolver processo biotecnológico que assegure a qualidade superior da bebida do café.

ABSTRACT

VALE, Helson Mário Martins do, D Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2009. **Diversity of endophytic and epiphytic yeasts in coffee cherries (*Coffea arabica* L.) and succession during natural drying.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Co-Advisers: Marcos Rogério Tótola and Maurício Dutra Costa.

Diversity among endophytic and epiphytic yeasts in coffee cherries (*Coffea arabica* L.) from the cultivars Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Bourbon Vermelho, and Bourbon Amarelo, sampled from plantations located at different altitudes in the Zona da Mata Norte, Minas Gerais State, Brazil, were studied using culture-dependent and culture-independent methods. Density of epiphytic and endophytic yeasts in coffee cherries varied from less than 25 CFU.cherries⁻¹ to 6,5.10⁴ CFU.cherries⁻¹. Thirty six isolated yeasts were grouped in 12 morphotypes. The reconstructed phylogenetic tree, obtained with 26S rDNA sequence data, grouped the sequences with those of *Candida smithsonii*, *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus flavescens*, *Meira geulakonigii*, *Pseudozyma* sp and *Sporobolomyces* sp. present in the *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) database. The isolate LEM 647-9, from Bourbon Vermelho collected at 1101 m, was identified as *Meira geulakonigii*, a yeast-like fungus classified among the Ustilaginales, the same order of *Pseudozyma*. Five yeast colonies of the same morphotype were selected and identified using the fatty acid methyl ester profiling (FAME) by the Sherlock[®] identification system (MIDI). The isolates were phylogenetically clustered using 26S rDNA sequences analyses. Partial 26S rDNA sequences showed 96 % and 100 % similarity to rDNA from yeast species belonging to *Candida*, *Pichia*, and *Brettanomyces*. However, phylogenetic cluster analyses showed that the rDNA sequences from the isolates were more closely related to rDNA sequences from the genera *Candida* and *Pichia*. The presence of *C. diddensiae*, *P. guilliermondii* e *C. parapsilosis* as endophytes in wholesome coffee cherries is reported here and thus a new niche for these species. Sequencing of clones obtained from a 26S rDNA library of amplified metagenomic DNA from Catuaí Vermelho coffee

cherries, collected at 1189 m, yielded 12 clones with 98-99% identity with filamentous fungi. They corresponded to the genera *Mycosphaerella*, *Glomerella*, *Microdiplodia* e *Phaeophaeria*, and also to some potentially endophytic fungi yet to be identified and that have sequences already in GenBank. DGGE fingerprint of yeasts in *C. arabica* during 14 days of natural drying revealed dominant OTUs already in the four first days. GelComparII analysis demonstrated that the OTU profile is altered each two days up to the 12th day. Knowledge on the occurrence and diversity of endophytic yeasts, as well as on the secondary metabolites that they produce should contribute to the development of biotechnological processes aimed at improving the quality of coffee beverages.

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro foi introduzido no Brasil no século XVIII, proveniente da Guiana Francesa, e, a partir de então, a cultura dessa planta expandiu-se, sendo considerada como o pilar de sustentação do desenvolvimento econômico, social e político do país. O café é produzido em mais de sessenta países e transformou-se numa das bebidas mais consumidas no mundo, sendo o Brasil o atual líder mundial em produção e exportação desse produto, além de ser o segundo maior consumidor. No gênero *Coffea* encontram-se cerca de 100 espécies, sendo a *C. arabica* a de maior importância econômica e responsável por 70% da produção mundial de café.

O Estado de Minas Gerais destaca-se no contexto nacional como o maior produtor, sendo grande o potencial de produção de cafés diferenciados em termos de qualidade da bebida em razão das condições ambientais e cultivares plantados.

A qualidade da bebida do café é um dos fatores mais importantes para o valor de mercado do produto, sendo que a identidade e a qualidade são determinadas pelas características sensoriais de aroma, fragrância, amargor, corpo, sabor, sabor residual, influência dos grãos defeituosos, acidez, adstringência, qualidade da bebida e qualidade global.

Os microrganismos contribuem de várias formas para a qualidade da bebida. As leveduras, por exemplo, podem ser agentes de controle de fungos que produzem micotoxinas ou atuar no processo de degradação de componentes dos frutos e produzir precursores de compostos que contribuem para as características que compõem a qualidade final da bebida de café.

Os frutos são considerados como excelente habitat para leveduras em razão da concentração elevada de carboidratos e outros compostos que esses microrganismos utilizam como substrato, especialmente durante o processamento pós-colheita. As leveduras cultiváveis e não-cultiváveis que habitam o interior de órgãos ou tecidos das plantas hospedeiras sem causar danos aparentes são as denominadas leveduras endofíticas.

Tradicionalmente, o estudo de diversidade de leveduras em frutos de café tem sido feito por meio de isolamento e cultivo, para posterior identificação por critérios morfológicos e fisiológicos. Esses procedimentos, que exigem o cultivo do microrganismo, além de tediosos, nem sempre refletem a real diversidade das leveduras no ambiente em estudo. Em adição aos métodos fenotípicos, os atuais métodos de detecção e identificação molecular retratam de forma mais completa a diversidade desse importante grupo de microrganismos. Com o desenvolvimento desses métodos tornou-se possível a descoberta, classificação e a identificação de novas espécies.

A ocorrência e a diversidade de leveduras endofíticas naturalmente encontradas nos frutos de café, bem como o papel funcional desses microrganismos na produção de precursores de compostos que contribuam para as características desejáveis da qualidade da bebida do café, são conhecimentos fundamentais para o desenvolvimento de possíveis processos biotecnológicos para a melhoria natural da qualidade da bebida do café brasileiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O cafeeiro é originário da província de Kaffa na Etiópia e a sua introdução no Brasil ocorreu no século XVIII (Encarnação & Lima, 2003). As espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* var. *robusta* são as cultivadas comercialmente em países tropicais, sendo os seus frutos utilizados no preparo de uma das bebidas mais consumidas no planeta. No Brasil, a pesquisa revela que 97% da população declaram tomar café regularmente, o que representa a comercialização de 17,66 milhões de sacas por ano (ABIC, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial, com produção média anual de 38 milhões de sacas de 60 kg (1/3 da produção mundial) (ABIC, 2009), e a produção representa U\$ 2,5 bilhões na pauta de produtos exportados no ano (CONAB, 2007). A produção nacional da safra 2006/2007 atingiu 42,5 milhões de sacas de café beneficiado, sendo 33,0 milhões da arábica (*C. arabica*) e 9,5 milhões da robusta (*C. canephora*) (CONAB, 2007). A importância social da cultura no Brasil pode ser aferida pelo número de empregos diretos gerados na cadeia produtiva, 5 milhões de pessoas e sustento para uma população de cerca de 15 milhões (Encarnação & Lima, 2003).

O café beneficiado cru tem em sua constituição, aproximadamente, 50 a 60% de carboidratos, onde se incluem açúcares redutores (1%), sacarose (7%) e pectina (2%), vários poli- e oligossacarídeos constituídos principalmente por glicose, manose, arabinose e galactose; proteínas (13%); ácidos clorogênicos; glicerídeos; cafeína e trigonelina; e minerais (França et al., 2001; Petracco, 2005). As principais diferenças na composição do café robusta referem-se ao menor teor de lipídeos (11%) e aos maiores teores de cafeína (2%) e ácidos clorogênicos (10%) (França et al., 2001; Petracco, 2005).

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

algumas enzimas) cujas presenças, teores e atividades conferem ao café uma qualidade peculiar (Pimenta, 2003; Costa & Chagas, 1997). Os teores de potássio dos grãos e a qualidade de bebida se correlacionam de forma positiva e significativa (Alves, 2005).

Entre os fatores que podem interferir na qualidade da bebida do café citam-se: a genética da planta; a exposição da lavoura em relação ao sol nascente; as condições edafoclimáticas; o manejo da lavoura; os cuidados na colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento, além da atividade da microbiota nas fases pré e pós-colheita (Alves, 2005; Pimenta, 2003; Souza & Carvalho 1997).

Os frutos de café sadios no estágio cereja, ponto ideal de colheita, são os que se encontram com a composição química adequada para que o processamento pós-colheita possa resultar em grãos contendo os precursores de compostos que conferem as características de aroma, fragrância, amargor, corpo, sabor, sabor residual, acidez, adstringência, qualidade da bebida e qualidade global do café (MAPA, 2008). Nesses frutos, durante o processo de secagem natural, as atividades de enzimas próprias da planta e as originárias do metabolismo de microrganismos resultam em componentes que tem reflexos na qualidade da bebida.

A qualidade da bebida em cafés de mesma espécie e cultivar pode variar em função da região de origem, a exemplo de cafés finos produzidos em regiões distintas no estado de Minas Gerais, como: Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e região Sul. Nos últimos anos, a Zona da Mata Norte do Estado de Minas Gerais vem se destacando como região produtora de cafés com as características de qualidade de bebida requerida no mercado mundial, a exemplo dos produzidos em locais de altas altitudes do município de Araponga, que em julgamentos por Júri Internacional, têm sido classificados entre os melhores cafés do Brasil, inclusive com a premiação de *Gold Cup of Excellence* da *Cup of Excellence* (CoE) (<http://www.cavalgadaaldeiadavida.com.br>). Uma análise da variabilidade espacial da planta e das características de qualidade do café cereja produzido nesta mesma região mostrou que as submetidas a uma maior exposição ao sol, face de exposição ao sol nascente, apresentaram produção e qualidade de bebidas superiores aos da face sombreada (Alves, 2005).

O aroma do café é determinado pelas características sensoriais resultantes da combinação de mais de 800 compostos (Alves et al., 1999; Alves et al., 2000), juntamente com os produzidos por reações pirolíticas que ocorrem durante a torrefação (França et al., 2001).

O desenvolvimento de aromas responsáveis por propriedades sensoriais em outras bebidas também é um processo complexo e com muitos fatores envolvidos. Em vinho, a cultivar e o estágio de maturação da uva, bem como a fermentação alcoólica por leveduras e a maloláctica por bactérias do ácido láctico são determinantes da qualidade final do produto (Siezen, 2008). A diversidade destes microrganismos tem papel relevante na composição química do flavor final, especialmente em razão dos metabólitos secundários que produzem e que contribuem para a qualidade da bebida (Fleet, 2003; Romano et al., 2003). O conhecimento do sistema biológico envolvido na produção do vinho é considerado como de importância para o entendimento do processo que confere individualidade ao produto. Nesse sentido, já se vislumbra o uso das informações genômicas como ferramentas para rápido conhecimento dos mecanismos moleculares de aroma e desenvolvimento do flavor (Siezen, 2008).

No processo de fermentação de outros frutos como, por exemplo, cacau, o papel das leveduras é atribuído à produção de fenol, de ácidos orgânicos, de compostos voláteis, de enzimas pectinolíticas e degradação de ácido cítrico (Schwan & Wheals, 2003).

A participação das leveduras cultiváveis na degradação da mucilagem dos frutos de café ainda não está esclarecida. As identificadas, como *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* spp., (Agate & Bhat, 1966), *Pichia anomala* e *Pichia kluyveri* são consideradas como nativas em frutos de café e apresentam alta atividade pectinolítica (Masoud & Jespersen, 2006). Ao mesmo tempo, há relatos de que as leveduras não crescem em meios contendo pectina (van Pee & Castelein, 1971; Avallone et al., 2001; 2002) e, por isso, inferiram que não teriam interferência no processo de degradação da pectina presente na mucilagem.

A presença de *P. anomala*, *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum*, predominantes durante o processamento do café, inibem o crescimento de

Aspergillus ochraceus e a biossíntese de ocratoxina A (OTA) em meio de cultura (Masoud & Kaltoft, 2006) e, por essa razão, os autores inferiram que podem ser utilizadas para o controle biológico desse fungo produtor de OTA durante a secagem. Essas leveduras também se mostraram produtoras de compostos voláteis, principalmente etil-acetato, isobutil-acetato, 2-fenil-etil-acetato, etil-propionato e álcool isoamílico, além de metabólitos não-voláteis tóxicos para *A. ochraceus* (Masoud et al., 2005).

Historicamente, o estudo de qualidade da bebida do café tem como foco os fatores responsáveis pela má qualidade do produto, incluindo-se a presença de microrganismos e produtos de suas atividades. Os primeiros trabalhos publicados datam de 1936 (Krug, 1940a; 1940b), quando foi observada a presença de micélio de *Fusarium* em uma amostra de café, classificado como ardido. Posteriormente, outros trabalhos destacaram a ação dos microrganismos, principalmente dos fungos filamentosos que levam à produção do composto 2,4,6-tricloroanizole (TCA), diretamente relacionado com a má qualidade da bebida (Pimenta, 2003), e outros produtores de compostos toxigênicos, como aflatoxina e ocratoxina (Taniwaki et al., 2003; Batista, et al., 2003; Pardo et al., 2004; Masoud & Kaltoft, 2006; Vegas et al., 2006).

Os microrganismos de ocorrência natural na superfície e na mucilagem dos frutos de café são bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Souza & Carvalho, 1997; Silva et al., 2000; Avallone et al., 2001; Sakiyama, 2001; Avallone et al., 2002), sendo as bactérias o grupo mais abundante durante o processo de secagem natural do café, correspondendo a aproximadamente 80% dos microrganismos encontrados (Schwan & Wheals, 2003).

O estudo da diversidade microbiana de cultiváveis durante a maturação e o processamento natural de café cereja (Silva et al., 2000) retrata o isolamento total de 626 isolados, entre bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Deste total, 43,8% corresponderam a bactérias [Gram-negativas (44,5%), Gram-positivas formadoras de esporos (9%) e não formadoras de esporos (46,5%)], 40,1% a fungos filamentosos e 16,1% a leveduras. A identificação dos isolados de leveduras revelou a presença de 24 espécies (*Arxula adenimivorans*, *Blastobotrys proliferans*, *Candida aurangiensis*, *C. glucosophila*, *C. incommunis*, *C. paludigena*, *C. schatarii*, *C. vartiovaarae*, *Citermyces matritensis*, *Geotrichum fermentans*, *Pichia acaciae*, *P. anomala*, *P.*

ciferii, *P. jadinii*, *P. lynferdii*, *P. ofunaensis*, *P. sydowiorium*, *S. cerevisiae*, *Saccharomycopsis fermentans*, *S. fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporopachydermia cereana*, *Trichosporonoides oedocephales* e *Williopsis saturnus* var. *sargentensis*). Outras espécies de leveduras têm sido isoladas de frutos de café durante a maturação e processo de secagem, em diferentes países, a exemplo de *Debaryomyces hansenii*, *D. polymorphus*, *Pichia guilliermondii*, *P. burtonii*, *P. holstii* e *P. anomala* (Silva et al., 2008), *Kloeckera apis apiculata*, *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *Candida guilliermondii* (Avallone et al., 2001; Avallone et al., 2002), *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, *C. parapsilosis* var. *intermedia*, *C. pelliculosa*, *C. pelliculosa* var. *cylindrica*, *C. tropicalis*, *Torulopsis famata*, *Saccharomyces marxianus*, *Rhodotorulla mucilaginosa* (van Pee & Castelein, 1971), *Candida lambica*, *C. famata*, *C. colliculosa* (Avallone et al., 2002), *Pichia kluyveri*, *Hanseiaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida pseudointermedia*, *C. xestobii*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia ohmeri*, *Torulaspora delbrueckii* (Masoud et al., 2004). Estas leveduras encontram-se presentes durante a maturação e aumentam na secagem (Silva et al., 2000) em razão da característica que possuem de resistir às condições ácidas (Avallone et al., 2001). A densidade de leveduras cultiváveis em café arábica da África, estimada como sendo de $4,0 \times 10^4$ a 5×10^7 UFC g⁻¹, aumenta durante o processamento, com predominância de *P. anomala*, *P. kluyveri* e *H. uvarum* (Masoud et al., 2004).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos epifíticos e endofíticos foram isolados em todos os estádios de desenvolvimento dos frutos de café de Minas Gerais. Em Viçosa, dos 1042 isolados epifíticos, 89% correspondiam a bactérias, 5% a leveduras e 6% a fungos filamentosos. Entre os 282 isolados dos potencialmente endofíticos, 84% foram de bactérias, 7% de leveduras e 9% a fungos filamentosos (Sakiyama, 2001). Neste trabalho, os microrganismos foram isolados a partir de frutos cereja superficialmente desinfestados e incubados em meio de cultura para a certificação da ausência de crescimento microbiano, antes do isolamento.

O papel da comunidade microbiana na interação planta-endofítico tem sido muito discutido. Esses microrganismos apresentam atividades que podem afetar a planta hospedeira, como por exemplo, controle biológico contra

insetos, proteção contra animais herbívoros, controle de doenças, efeitos fisiológicos mediante a produção de promotores de crescimento (Hallmann et al., 1997; Saikkonen et al., 1998; Peixoto Neto et al., 2002; Feath, 2002) e fixação biológica de nitrogênio (Jimenez-Salgado et al., 1997). Em folhas e frutos de macieira, estudos têm mostrado a presença de leveduras e fungos endofíticos e os efeitos dos sistemas de cultivo sobre as alterações de populações de endofíticos (Camatti-Shartori et al., 2005). Os autores inferiram que alguns dos isolados obtidos poderiam ser usados como indicadores de sistemas de cultivo da macieira.

A presença de leveduras endofíticas tem sido constatada em diversas partes das plantas, como a de *Williopsis saturnus* em raiz de milho, uma produtora de ácido indol acético (IAA) e ácido indol pirúvico (IPYA) (Nassar & El-Tarabily, 2005), em caule (Wiyakrutt et al., 2004), xilema (Zhao et al., 2002), folha (Cao et al., 2002; Wiyakrutt et al., 2004, Unterseher et al., 2007), flores e frutos (Camatti-Shartori et al., 2005). Pesquisas de leveduras endofíticas têm sido conduzidas em diversas plantas, incluindo espécies de importância na agricultura como: milho (Nassar & El-Tarabily, 2005; Molnár & Prillinger, 2006), banana (Cao et al., 2002), maçã (Camatti-Shartori et al., 2005), *Pinus* (Zhao et al., 2002), em outras espécies florestais (Unterseher et al., 2007) e em bromélias (Landell, et al, 2006). Em café, os primeiros relatos da presença e da distribuição de leveduras endofíticas em frutos de café do Brasil são os constantes dos trabalhos de Yamada (1999) e Sakiyama et al. (2001).

As plantas mostram-se como excelentes habitats para leveduras, pois através da atividade fotossintética, açúcares simples são produzidos, bem como polissacarídeos e outros compostos de carbono. Assim, essa gama de compostos permite a dispersão e ocupação das leveduras que dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância; alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies estudadas, enquanto alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetrosses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente somente por algumas espécies.

A identificação de leveduras por metodologia tradicional baseia-se na morfologia celular, em reações que ocorrem durante uma fermentação

padronizada e em testes de assimilação de compostos definidos (Kurtzman & Fell, 1998). Esses testes são tediosos e às vezes geram resultados ambíguos por causa da variabilidade intrínseca ao isolado de uma espécie (Kurtzman & Robnett, 1998) e das características fisiológicas na condição de cultivo. Atualmente, os estudos da diversidade e taxonomia microbiana estão sendo realizados com base nos conhecimentos atuais da taxonomia polifásica, a qual integra diferentes dados e informações de análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas para caracterizar o microrganismo em teste (Cordero, 2008).

A análise do perfil de ácidos graxos da parede celular é aplicada também para a identificação de leveduras. A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME – “*Fatty Acid Methyl Ester*”) tem sido utilizada para identificar espécies de bactérias (Buyer, 2003) e leveduras de importância clínica e industrial (Peltroche-Llacsahuanga et al., 2000; Botha & Kock, 1993). Por meio do sistema de cromatografia cadeias longas de ácidos graxos contendo de 9 a 20 átomos de carbono são analisados, identificando e quantificando os ésteres metílicos de ácidos graxos dos microrganismos (Peltroche-Llacsahuanga et al., 2000). O perfil de FAME do isolado em estudo é comparado com os de estirpes já caracterizadas e incluídas em biblioteca de dados do *software* Sherlock^R *Microbial Identification System*, para definir a provável espécie do isolado em função da similaridade com espécies do banco de dados.

O desenvolvimento dos novos métodos para estudo da diversidade de microrganismos com base em técnicas de biologia molecular facilitou a obtenção de dados mais precisos para a taxonomia dos fungos leveduriformes que apresentam pouca variação morfológica e, também, para a construção de árvores filogenéticas.

Um método simples em que se utiliza a reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação de leveduras tem sido apontado como ferramenta confiável e rápida para uso na rotina de indústrias de vinho (Hierro, et al., 2004). Nessa técnica efetua-se a amplificação da seqüência alvo do DNA específico por reação em que se utiliza *primers* desenhados.

Outros métodos moleculares, como a amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e cariotipagem eletroforética, são procedimentos simples e de execução rápida utilizados para

identificar e diferenciar isolados de uma mesma espécie que tem possibilitado rápido avanço no conhecimento da diversidade genética, por agregar mais um parâmetro para uso na taxonomia de leveduras (Anchorena-Matienzo, 2002).

A avaliação da diversidade das leveduras em determinado habitat será mais real e completa quando se combinam métodos de isolamento e cultivo com os métodos independentes de cultivo, em que se avalia também os não cultiváveis. A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) tem sido aplicada no estudo de ecologia microbiana como forma alternativa para a análise da comunidade microbiana independente de cultivo (Muyzer & Smalla, 1998). Ela permite o estudo simultâneo e mais rápido de maior número de amostras (Masoud et al., 2004) e tem sido usada para diferenciar genes do rRNA diretamente purificado de comunidades microbianas complexas (Muyzer et al., 1993). A técnica de DGGE baseia-se na mobilidade eletroforética diferencial quanto à susceptibilidade da molécula de DNA à desnaturação parcial promovida por agentes desnaturantes e discrimina amplicons de comprimentos similares, de acordo com suas seqüências de pares de bases (Muyzer et al., 1993). Esta técnica tem se mostrado como ferramenta útil para o monitoramento da dinâmica microbiana durante processos fermentativos como o do vinho (Cocolin et al., 2000; Prakitchaiwattana et al., 2004), leite (Cocolin, et al., 2002), lingüiça (Cocolin et al., 2001), cacau (Nielsen et al., 2005) e café (Masoud et al., 2004). A análise por PCR-DGGE pode ser menos sensível do que a por cultivo em meio de cultura, como no estudo de ecologia de leveduras em uva (Prakitchaiwattana et al., 2004), onde a detecção de espécies não foi possível quando a população era menor do que 10^4 UFC g^{-1} . Estes pesquisadores propuseram o uso simultâneo desses métodos em estudos de ecologia microbiana.

O DNA ribossomal (rDNA) tem sido objeto de expressivo número de estudos, com aplicações em genética, evolução e melhoramento. Os genes ribossomais das leveduras são organizados em *clusters* gênicos das três frações de rDNA, 5,8S, 18S, e 26S, que se repetem profusamente. Estes genes são separados por dois espaços internos transcritos, denominados ITS1 e ITS2. Estas regiões, ITS1 e ITS2 são menos conservadas e apropriadas para discriminar espécies relacionadas, ou até mesmo cultivares de uma mesma espécie. Tem sido demonstrado que a seqüência nucleotídica do domínio

D1/D2 da subunidade maior do rDNA é suficientemente variável para identificar todas as espécies conhecidas de ascomicetos leveduriformes (Kurtzman & Robenett, 1998). Constatações semelhantes também foram relatadas para basidiomicetos leveduriformes, embora em alguns casos seja necessário seqüenciar também as regiões ITS do rDNA para se distinguir espécies relacionadas (Fell et al., 2000). O comprimento da região 26S estabelece o uso da região D1/D2 para análise entre espécies, sendo que um extenso banco de dados sobre D1/D2 encontra-se disponível para ascomicetos e basidiomicetos leveduriformes (Kurtzman & Robenett, 1998; Fell et al., 2000).

O relato da presença de leveduras endofíticas *in situ* (Yamada, 1999) e cultiváveis (Sakiyama, 2001) em frutos de café desperta o interesse de se conhecer a distribuição, diversidade e funcionalidade de leveduras endofíticas cultiváveis e não cultiváveis presentes nos frutos, bem como a sucessão de leveduras durante o processo de seca natural dos grãos.

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A área de estudo está localizada no município de Araponga, cidade da Zona da Mata Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil, na região geográfica compreendida entre as coordenadas 42°36'35" W a 42°22'48" W de longitude, e 20°34'12" S a 20°46'48" S de latitude. Segundo Portaria nº 773, de 12 de maio de 2006 do Instituto Mineiro de Agropecuária, o café produzido nesta região é denominado "Café das Montanhas de Araponga". A segunda área está localizada na Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, compreendida entre as coordenadas 20°44'3,48" S a 42°50'57,4" W (Tabela 1).

3.2 Amostragem dos frutos de café

O estudo foi realizado com 14 amostras de quatro cultivares de café (Catuaí Amarelo e Vermelho, Bourbon Amarelo e Vermelho) da safra 2007, retiradas de talhões localizados em diferentes altitudes na região da Zona da Mata Norte, Minas Gerais (Tabela 1).

A amostragem de frutos de café no estágio cereja correspondeu à coleta individual de frutos sadios, com pedúnculo, do terço médio de cafeeiros típicos da cultivar, escolhido durante o caminhamento pela lavoura, com registro das coordenadas geográficas e altitude em aparelho de GPS, Garmin® modelo Vista C. A amostra coletada foi de aproximadamente dois quilogramas de fruto por cultivar em cada fazenda. As amostras foram colocadas em sacos plásticos e transportadas em caixas contendo gelo para o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (DMB-UFV), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/ UFV). No LEM foram divididas em frações de 200 g e imediatamente embaladas a vácuo e mantidas a -20 °C para as análises do

total de leveduras e das endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis. As amostras utilizadas para isolamento de leveduras foram armazenadas a 4 °C e processadas em até 24 horas após a coleta.

Tabela 1 – Amostras e descrição das áreas de coleta das 14 amostras de frutos de café cereja obtidas em lavouras com cultivares de *Coffea arabica* (L.) localizadas a diferentes altitudes no Município de Araponga, MG.

Amostra	Cultivar	Localidade	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	Face de Exposição	Implantação
625	Catuaí Vermelho	Campo experimental UFV	20°44'3,48" S 42°50'57,2" W	676	W	1980
626	Catuaí Amarelo	Campo experimental UFV	20°44'3,48" S 42°50'57,2" W	676	W	1980
627	Bourbon Vermelho	Campo experimental UFV	20°44'29,5" S 42°50'47,4" W	687	W	1989
628	Bourbon Amarelo	Campo experimental UFV	20°44'29,5" S 42°50'47,4" W	687	W	1989
629	Catuaí Vermelho	Araponga, fazenda Itatiaia.	20°40'32,4" S 42°34'13,6" W	956	E	2004
630	Catuaí Amarelo	Araponga, fazenda Itatiaia.	20°39'55,2" S 42°34'13,6" W	956	E	2004
643	Catuaí Amarelo	Araponga, Serra do Boné.	20°39'16,3" S 42°27'32,0" W	1013	SE	1996
644	Catuaí Vermelho	Araponga, Serra de Boné.	20°39'16,3" S 42°27'32,0" W	1013	SE	1996
648	Bourbon Amarelo	Araponga, fazenda Santo Antônio.	20°39'57,9" S 42°30'45,4" W	1062	N	1979
631	Bourbon Vermelho	Araponga, fazenda Santo Antônio.	20°39'55,2" S 42°30'44,2" W	1067	N	1979
632	Bourbon Amarelo	Araponga, fazenda Santo Antônio.	20°39'55,2" S 42°30'44,2" W	1067	N	1979
647	Bourbon Vermelho	Araponga, fazenda Santo Antônio.	20°39'47,6" S 92°27'28" W	1101	N	1979
645	Catuaí Amarelo	Araponga, Serra do Boné.	20°39'48,2" S 42°27'27,6" W	1189	SE	1996
646	Catuaí Vermelho	Araponga, Serra do Boné.	20°39'57,9" S 42°30'45,4" W	1189	SE	1996

3.3 Processamento das amostras

Dez frutos sadios e com pedúnculo, de cada uma das amostras, foram individualmente colocados em 10 frascos erlenmeyer de 50 mL para a lavagem

em água destilada e detergente neutro, por 1 minuto, seguida de quatro enxágües em água destilada esterilizada. A seguir, foram transferidos para novos frascos contendo água esterilizada, em câmara de fluxo laminar VECO Plus Class III Tipo B III FL9210, para os procedimentos de isolamento de leveduras epifíticas e endofíticas (Sakiyama et al., 2001).

3.4 Quantificação, isolamento e cultivo de leveduras.

As leveduras de frutos de café cereja foram isoladas e cultivadas em meio de cultura MYGP (*Malt yeast glucose peptone medium*), pH 5,6 (Masoud et al., 2004), contendo 250 mg L⁻¹ de cloranfenicol. Cada fruto foi colocado em tubo contendo 9 mL de solução estéril de tampão fosfato de potássio 0,02 mM L⁻¹, pH 7,0 e triturado em homogeneizador do tipo Polytron™. A suspensão obtida foi filtrada através de malha de gaze e o filtrado recolhido em tubo de ensaio estéril, seguindo-se o preparo de diluições seriadas em solução tampão de fosfato de potássio, em triplicata, ou seja, três réplicas por amostra e por diluição. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para meio sólido MYGP contendo 250 mg.L⁻¹ de cloranfenicol e espalhadas com o uso de alça de Drigalsky, seguindo-se a incubação das placas a 28 °C durante 5 dias.

O número de UFCs por fruto obtido após 72 horas de incubação das placas a 28 °C em cada uma das amostras de café foi registrado e colônias representativas foram repicadas e purificadas em meio MYGP para as análises posteriores. As culturas de leveduras purificadas foram catalogadas e conservadas a -80 °C em caldo MYGP contendo 30% de glicerol.

3.4.1 Identificação dos isolados de leveduras.

Os isolados de levedura foram catalogados de acordo com as seguintes características macromorfológicas: crescimento, aspecto, cor, contorno, bordas, superfície e tamanho da colônia. Com base nessas características dos isolados, uma matriz binária foi construída considerando a presença ou a ausência da característica morfológica. Os isolados foram agrupados com base no coeficiente Jaccard de similaridade e no método de UPGMA (*unweighted*

pair group method with arithmetic) para gerar o dendrograma de similaridade usando o programa Genes.

Os isolados de leveduras foram identificados por meio da análise das seqüências parciais do rDNA 26S. As culturas puras dos isolados foram ativadas por cultivo em placas contendo meio sólido MYGP (pH 5,6) e incubadas a 28 °C por 24 horas. Após esse tempo, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo MYGP e novamente incubadas por 24 horas a 28 °C sob agitação a 150 rpm, em Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co, Inc. Edison, N.J, USA.

Os isolados foram repicados em 5 mL de meio de cultura líquido MYGP, pH 5,6, por cerca de 24 horas a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. As culturas foram centrifugadas e as células lavadas com água peptonada (0,01%) por duas vezes para, em seguida, serem transferidas para tubos *ependorfs* de 1,5 mL e centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm, 4 °C em centrífuga JOUAN, modelo MR 23i. O sedimento foi ressuscitado em 400 µL do tampão de extração de DNA (Fungaro et al. 2004) acrescido de 200 µL fenol:clorofórmio 1:1 e 0,3 g de pérolas de vidro e agitado por 2 minutos, para lisar as células antes de nova centrifugação por 10 minutos, 12000 rpm, a 4 °C. Ao sobrenadante coletado, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e realizada a agitação em vortex antes de outra centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm, 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf*. O DNA foi precipitado com 1/10 volume de acetato de potássio 5 mol.L⁻¹ e 2 volumes de etanol absoluto. As amostras foram repousadas por 2 horas a temperatura ambiente, seguindo-se a centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm, 4 °C. O sedimento lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, 4 °C, após a secagem em temperatura ambiente foi ressuscitado em 50 µL de H₂O *milli-Q* autoclavada e adicionado de 20 µg mL⁻¹ de RNase (Sigma-Aldrich). A suspensão foi incubada a 37 °C por 1 hora e, a seguir, armazenada a -20 °C.

A amplificação de rDNA 26S foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando-se os *primers* NL1 (5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3') e LS2 (5' – ATTCCCAAACAACACTCGACTC – 3') (Cocolin et al., 2000). As PCRs foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 5 µL de tampão (Taq Polymerase-Buffer - Promega), 0,2 mM de dNTPs, 1,25 U de GoTaq

Polimerase (Promega), 0,2 μM de cada *primer* e 10 ng de cada DNA extraído. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf-Germany), programado para as seguintes condições: 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento a 52 °C por 1 minuto; extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

As amostras de DNA extraídas e amplificadas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 0,8% em tampão TAE [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8,3)] e brometo de etídio (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sambrook et al., 1989). A quantificação foi feita por comparação com marcadores de quantidade de DNA de fago λ nas concentrações de 25 ng μL^{-1} , 50 ng μL^{-1} e 100 ng μL^{-1} . Para as amostras de DNA 26S amplificadas, o marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

Os DNAs extraídos e amplificados foram visualizados no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

Os produtos da PCR foram purificados por meio de Kits ExoSAP-IT™ conforme recomendações do fabricante e depois os amplicons foram enviados para sequenciamento.

As reações de seqüenciamento foram realizadas no Laboratório de Clonagem e Seqüenciamento de DNA da UFV com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados em cada uma das reações 75 ng a 100 ng de DNA, 0,5 μM do oligonucleotídeo *primer* NL1, 2,0 μL de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pre-Mix para um volume final de 5 μL . As condições da PCR foram 35 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 2 minutos. Em seguida, o DNA foi precipitado, adicionando-se 27,5 μL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 mol.L⁻¹. Após 10 minutos em temperatura ambiente as reações foram centrifugadas por 45 minutos a 2.000 g. O DNA sedimentado foi lavado com 100 μL de etanol 70%, centrifugados por 10 minutos a 2.000 g e armazenado em temperatura ambiente por 10 minutos para secar. Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 5 μL de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em seqüenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

As seqüências de nucleotídeos de rDNA 26S de todos os isolados foram alinhadas entre si por meio do programa Clustal W e a análise, correção e agrupamento com o programa MEGA 4.0[®] (Tamura et al., 2007). Seqüências de nucleotídeos representativas de cada grupo formado foram comparadas com as armazenadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O alinhamento das bases foi realizado por meio do programa Clustal W e a análise e correção com o programa MEGA 4.0[®] (Tamura et al., 2007). As inferências filogenéticas foram obtidas pelo método de máxima parcimônia, utilizando o método de distância p, (Saitou e Nei, 1987), com teste *bootstrap* (1.000 réplicas). As árvores para as análises da filogenia das seqüências foram reconstruídas com o programa MEGA 4.0[®].

3.5 Quatificação, isolamento e cultivo de leveduras endofíticas

As leveduras de frutos de café cereja endofíticas cultiváveis foram isoladas e cultivadas em meio de cultura MYGP, pH 5,6 (Masoud et al., 2004). Cada fruto foi submetido a processo de esterilização superficial (Sakiyama et al., 2001). O processo consistiu das seguintes etapas: duas lavagens do fruto em água destilada esterilizada, seguida de agitação por 15 min em solução tampão fosfato de potássio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0; imersão por 1 min em álcool 70%; agitação por 5 min em solução de hipoclorito de sódio 5% e Tween 80%; nova imersão por 1 min em álcool 70% seguida de agitação por 15 min em solução tampão fosfato de potássio 0,05 mol.L⁻¹, pH 7,0 e, finalmente, a lavagem por quatro vezes em água destilada esterilizada. O processo foi repetido por duas vezes.

Para confirmar a esterilização da superfície do fruto, alíquota da água destilada esterilizada da última lavagem foi espalhada em placa contendo o meio de cultura MYGP e incubada a 28 °C por 72 horas. Em seguida, o fruto foi transferido para tubo contendo caldo MYGP e também incubado a 28 °C por até 72 horas, para a certificação da inexistência de microrganismos na superfície do fruto a ser utilizado para o isolamento de leveduras endofíticas cultiváveis.

Para quantificar o total de leveduras endofíticas, cada fruto estéril superficialmente foi colocado em tubo contendo 9 mL de solução estéril de

tampão fosfato de potássio 0,02 mM L⁻¹, pH 7,0 e triturado em homogeneizador do tipo Polytron™. A suspensão obtida foi filtrada através de malha de gaze e o filtrado recolhido em tubo de ensaio estéril, seguindo-se o preparo de diluições seriadas em solução tampão de fosfato de potássio, em triplicata, ou seja, três replicas por amostra e por diluição. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para meio sólido MYGP contendo 250 mg.L⁻¹ de cloranfenicol e espalhadas com o uso de alça de Drigalsky, seguindo-se a incubação das placas a 28 °C durante 5 dias.

O número de UFC por fruto obtido após 72 horas de incubação das placas a 28 °C em cada uma das amostras de café foi registrado e colônias representativas foram repicadas e purificadas em meio MYGP para as análises posteriores. As culturas de leveduras purificadas foram catalogadas e conservadas a -80 °C em caldo MYGP contendo 30% de glicerol.

3.5.1 Identificação dos isolados de leveduras endofíticas

Os isolados de leveduras endofíticas foram agrupados por suas características morfológicas e submetidos a processo de identificação por meio da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos totais das células (FAME) e de análise das seqüências parciais de rDNA 26S. O perfil de badeamento de rDNA 26S dos isolados também foi analisado por meio da técnica de DGGE.

3.5.1.1 Análise do perfil de ácidos graxos

As leveduras cultiváveis foram identificadas por meio da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME – “*Fatty Acid Methyl Ester*”) utilizando cromatografia gasosa acoplada ao sistema de identificação microbiana MIDI, Inc. (Peltroche-Llacsahuanga et al., 2000). Para essa identificação, cada isolado selecionado foi transferido para o meio de cultura Sabouraud (DIFCO™ Sabouraud Dextrose Agar) e mantido a 28 °C por 24 horas.

Para a análise de FAME foi feita a remoção das células das colônias isoladas do terceiro quadrante da placa com o auxílio de uma alça de repicagem e a transferência para o fundo de um tubo de ensaio. As células

removidas foram submetidas à saponificação, por meio da adição de 1,0 mL de reagente 1 (hidróxido de sódio 45 g, metanol 150 mL e água *milli-Q* 150 mL), agitação em vórtex por 5 a 10 s, incubação em banho-maria a 100 °C por 5 min, seguida de agitação e incubação novamente a 100 °C por 25 min. Após a saponificação, a suspensão foi submetida a processo de metilação dos ácidos graxos, para a formação dos ésteres metílicos, mediante a adição de 2,0 mL de reagente 2 (ácido clorídrico 6,0 N, 325 mL e metanol 275 mL), agitação por 5 a 10 s e incubação em banho maria a 80 °C por 10 min. Foram adicionados 1,25 mL de reagente 3 (hexano 200 mL e éter metil ter-butílic 200 mL) e o volume total foi homogeneizado durante 10 minutos por inversão dos tubos. A fase aquosa foi descartada. À fase orgânica, contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, foram adicionados 3,0 mL do reagente 4 (hidróxido de sódio 10,8 g e água *milli-Q* 900 mL), o volume total foi homogeneizado por seguidas inversões do tubo durante 5 min e 2/3 da fase aquosa final foram transferidos para o tubo em que a amostra foi levada para injeção no cromatógrafo a gás.

3.5.2 Análise de seqüências de rDNA 26S

Os isolados de leveduras endofíticas foram identificados por meio da análise das seqüências parcial do rDNA 26S, empregando-se a mesma metodologia descrita acima para leveduras totais.

As identidades de todas as seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as armazenadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O alinhamento das bases foi realizado por meio do programa Clustal W e a análise e correção com o programa MEGA 4.0[®] (Tamura et al., 2007). As inferências filogenéticas foram obtidas pelo método de máxima parcimônia, utilizando o método de distância p, (Saitou e Nei, 1987), com teste bootstrap (1.000 réplicas). As árvores para as análises da filogenia das seqüências foram reconstruídas com o programa MEGA 4.0[®].

3.5.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).

Os produtos da PCR foram separados usando eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) em um equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad – Califórnia USA) (Masoud et al., 2004).

Foram aplicados 20 µL dos produtos de PCR, juntamente com 20 µL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 70% e TAE), em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE, para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb, sendo o gradiente de uréia/formamida de 40 a 60%.

O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, uma com 100% dos agentes desnaturantes, que corresponde a uréia 7 mol.L⁻¹ e formamida desionizada 40% (v/v), e outra sem esses agentes. Além das soluções-estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio [polimerizador], 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletileno diamino) e 50 µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% em TAE) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel foi de 3 horas.

Fragmentos de rDNA 26S das leveduras referências *Saccharomyces cerevisiae* – ATCC 2601, *Pichia anomala* – ATCC 36904, *Candida albicans* – ATCC 10231, *Pichia kluyveri* - CCT 3365 foram utilizados para comparação com os isolados de leveduras endofíticas. Uma mistura de fragmentos de rDNA 26S dessas mesmas espécies de leveduras referências também foram utilizadas como marcadores.

A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C e voltagem constante de 70 V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagen).

A comparação estatística dos perfis de banda dos géis obtidos após a DGGE para determinação da diversidade genética dos isolados foi realizada utilizando as imagens eletrônicas obtidas pelo sistema de digitalização, com o auxílio do programa GelCompar II® (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

3.6 Diversidade genética de leveduras endofíticas cultiváveis e não cultiváveis.

A diversidade genética de comunidades de leveduras endofíticas totais (cultiváveis e não-cultiváveis) foi analisada a partir das imagens dos perfis de bandeamentos dos amplicons nos géis de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e por meio da técnica de clonagem e sequenciamento de fragmentos de rDNA 26S.

3.6.1 Extração de DNA total de leveduras endofíticas em frutos de café.

Para a extração de DNA total de leveduras endofíticas foram utilizados 8 frutos por amostra, sendo todos previamente lavados em água destilada esterilizada e submetidos a processo de desinfecção superficial (Sakiyama et al., 2001).

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se o método descrito por et al. (2004), com modificações efetuadas no Laboratório de Ecologia Microbiana. Os frutos de café foram macerados na presença de nitrogênio líquido, em almofariz, até a obtenção de um pó fino. Esse pó fino foi transferido para tubo *ependorf* esterilizado e adicionado de 830 μ L de tampão de extração (4% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1% PVP), 4 μ L de β -mercaptoetanol, sendo a mistura incubada por 20 minutos em banho-maria a 65 °C. A suspensão foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos e o volume dividido em dois novos tubos, antes da adição de 700 μ L (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1,v/v). Os tubos foram ocasionalmente invertidos gentilmente por período de 5 minutos e a suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 5 minutos em centrífuga JOUAN, modelo MR 23i. Ao sobrenadante transferido para novo tubo foi adicionado 0,7 volume de isopropanol e o tubo incubado a temperatura ambiente por 2 horas, seguindo-se a centrifugação a 10.000 g por 5 minutos e o descarte do sobrenadante. O sedimento sofreu duas lavagens com etanol 70% gelado e foi mantido a temperatura ambiente. Após a lavagem, o sedimento foi ressuspendido em 50

μL de água *milli-Q* esterilizada e adicionado de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNase (Sigma-Aldrich), sendo a suspensão incubada a 37°C por 1 hora.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8 % em tampão TAE [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8,3)] e brometo de etídio ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sambrook et al., 1989). A quantificação foi feita por comparação com marcadores de quantidade de DNA de fago λ nas concentrações de $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

O DNA extraído foi visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

3.6.2 Amplificação do rDNA 26S de leveduras endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis

A amplificação de rDNA de comunidades de leveduras endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis foi realizada por PCR. Foram amplificados fragmentos do 26S rDNA do domínio D1/D2 em duas etapas de PCR (*Nested-PCR*) (Prakitchaiwattana et al., 2004). A primeira reação de PCR foi realizada com os *primers* denominados:

NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e

NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Prakitchaiwattana et al., 2004).

As reações foram realizadas em tubos *ependorf* de $200 \mu\text{L}$ em volume final de $25 \mu\text{L}$, contendo $5 \mu\text{L}$ do tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), $200 \mu\text{M}$ de dNTPs, $1,25 \text{ U}$ de GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), $0,2 \mu\text{M}$ de cada oligonucleotídeo *primer* e aproximadamente 20 ng de DNA total e água desionizada (*Milli-Q*) esterilizada para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: 36 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 1 min para o anelamento dos *primers* a 52°C e 2 min a 72°C para a extensão dos *primers*. O ciclo foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 min e finalmente resfriamento a 20°C .

Os produtos obtidos da primeira reação de PCR (aproximadamente 600 pb) foram usados como molde de DNA para uma segunda reação de PCR, usando como *primers* (*Nested-PCR*):

GC-clamp NL1 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGC-3') e LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') (Cocolin et al., 2000). As condições desta reação foram as mesmas já descrita para a primeira reação, exceto a concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (Promega, Madison, USA) que foi aumentada para 2,25 mM. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 2 minutos, extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Em todas as reações para os diferentes grupos foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler[®] Gradient (Eppendorf).

Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) e brometo de etídio ($0,25 \mu g mL^{-1}$) (Sambrook et al., 1989). Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

3.6.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os produtos da PCR foram separados usando eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) em um equipamento "DCode™ Universal Mutation Detection System" (BIO-Rad – Califórnia USA) (Masoud et al., 2004).

Foram aplicados 20 μL dos produtos de PCR, juntamente com 20 μL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 70% e TAE), em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE, para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb, sendo o gradiente de uréia/formamida de 40 a 60%.

O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, uma com 100% dos agentes desnaturantes, que corresponde a uréia $7 mol.L^{-1}$ e formamida desionizada 40% (v/v), e outra sem esses agentes. Além das soluções-estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio [polimerizador], 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletileno diamino) e 50 μL de corante (azul

de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% em TAE) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel foi de 3 horas.

Uma mistura de fragmentos de rDNA 26S das seguintes espécies de leveduras referências foram utilizadas como marcadores: *Saccharomyces cerevisiae* – ATCC 2601, *Pichia anomala* – ATCC 36904, *Candida albicans* – ATCC 10231, *Pichia kluyveri* - CCT 3365 compradas na Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello. A extração de DNA total destas foi realizada por protocolo já descrito para extração de DNA de isolados de leveduras endofíticas.

A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C e voltagem constante de 70 V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR[®] Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye[™] (Stratagen).

A comparação estatística dos perfis de banda dos géis obtidos após a DGGE para determinação prévia da diversidade genética foi realizada utilizando as imagens eletrônicas obtidas pelo sistema de digitalização, com o auxílio do programa GelCompar II[®] (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). No programa, as bandas foram posicionadas e identificadas para posteriores análises da estrutura de populações de leveduras presentes em cada umas das cultivares coletadas a diferentes altitudes.

A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e no método de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic*) para análise dos agrupamentos. A variável Riqueza das comunidades de leveduras também foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1) e ausência como zero (0). Para cada amostra no gel foi analisada a frequência de ocorrência de cada UTO pela contagem do número total de bandas presentes no gel por amostra.

3.6.4 Construção da biblioteca de rDNAs 26S da comunidade de leveduras endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis associadas aos frutos de café.

3.6.4.1 Amplificação dos rDNAs 26S

O DNA total foi utilizado como molde para amplificar fragmentos dos rDNAs 26S de leveduras avaliadas neste estudo. Com base nos resultados prévios sobre o perfil da comunidade de leveduras endofíticas foi escolhida a amostra 646 (Catuaí Vermelho, 1189 m) para este estudo (Tabela 1).

Fragmentos do rDNA 26S do domínio D1/D2 de leveduras endofíticas totais (cultiváveis e não-cultiváveis) foram amplificados utilizando os *primers* NL1 e NL4 (Prakitchaiwattana et al., 2004). A mistura de reação foi preparada com 5 µL do tampão GoTaq[®] Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 200 µM de dNTP's, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo *primer*, 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada, para completar o volume final de 25 µL. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (Prakitchaiwattana et al., 2004): 36 ciclos de 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 1 min para o anelamento a 52 °C e 2 min a 72 °C para a extensão dos *primers*. O ciclo foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min e finalmente resfriamento a 20 °C

Em todas as reações foi utilizado controle negativo sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler[®] Gradient (Eppendorf).

Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) e brometo de etídio (0,25 µg mL⁻¹) (Sambrook et al., 1989). Marcador de tamanho 100 *pb DNA Ladder* (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

3.6.4.2 Clonagem e sequenciamento dos rDNAs 26S

Os amplicons obtidos foram separadamente ligados ao vetor pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA), conforme recomendações do fabricante.

Células de *Escherichia coli* DH5 α foram feitas competentes pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook et al., 1989). Ao tubo contendo as células competentes adicionou-se 0,06 ng de DNA ligado ao vetor pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) e o tubo foi mantido em gelo por 30 minutos. A suspensão foi submetida a choque térmico de 42 °C por 45 segundos e, em seguida, foram adicionados 600 μ L de SOC pré-aquecidos a 37 °C (2% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 0,05% NaCl, 0,25 M KCl, 2 M MgSO₄, 5 M NaOH e 1 M Glicose) e o tubo de microcentrífuga contendo a suspensão foi incubado em banho-maria a 37°C por uma hora sob agitação.

Foram espalhados 100 μ l desta cultura na superfície de placas contendo o ágar Luria Bertani (LB), como o controle positivo de viabilidade, e ágar LB adicionado de ampicilina (50 μ g mL⁻¹), X-gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo] (80 μ g mL⁻¹) e IPTG [isopropiltio- β -D-galactosídeo] (200 μ g mL⁻¹). Um segundo controle foi feito pelo espalhamento de *E. coli* DH5 α competente na superfície de placas contendo ágar LB e ágar LB adicionado de ampicilina (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 μ g mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C por 12-16 horas.

A confirmação do fenótipo adquirido foi feita realizando-se estrias múltiplas em placa contendo o antimicrobiano na concentração de 100 μ g mL⁻¹, adicionado de X-gal e IPTG nas concentrações anteriormente citadas. Pelo menos 50 clones positivos foram repicados e a presença do inserto clonado foi confirmada pelo método de lise rápida e por amplificação a partir dos *primers* para o vetor utilizado, M13F e M13R (Promega, Madison, USA). Todos os clones contendo inserto de tamanho esperado foram armazenados a -80 °C em meio LB adicionado de glicerol 20% (v/v).

A extração de plasmídeos para o seqüenciamento do inserto clonado foi realizada com uso do Wizard[®] SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA). Foram extraídos os plasmídeos dos clones da biblioteca de rDNA 26S construída.

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Clonagem e Sequenciamento de DNA da UFV com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminators (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Foram utilizados em cada uma das reações 100 ng a 150 ng de DNA, 0,5 μ M do oligonucleotídeo *primer*

M13F, 2,0 µL de DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Pre-Mix para um volume final de 5 µL. As condições da PCR foram 35 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 2 minutos. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando-se 27,5 µL de etanol absoluto e acetato de amônio para uma concentração final de 0,75 mol.L⁻¹. Após 10 minutos em temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas por 45 minutos a 2.000 g. O DNA sedimentado foi lavado com 100 µL de etanol 70%, centrifugadas por 10 minutos a 2.000 g e armazenado em temperatura ambiente por 10 minutos para secar. Em seguida, o DNA foi ressuspendido em 5 µL de Loading Buffer (GE Healthcare). A leitura das amostras foi realizada em seqüenciador automático MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare).

3.6.5 Análise comparativa das sequências dos rDNAs 26S da comunidade de leveduras endofíticas associadas aos frutos de café.

Todas as seqüências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). Para cada seqüência foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (Altschul et al., 1990). Múltiplas seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTALW, e analisadas filogeneticamente com reconstrução de árvores filogenéticas pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o método de distância p com auxílio do programa MEGA 4.0® (Tamura et al., 2007), para esclarecer o padrão filogenético dos grupos dominantes.

3.7 Diversidade e sucessão de leveduras durante o processo de seca natural dos grãos.

O estudo foi realizado com amostras de café cultivar Catuaí Vermelho da safra 2007 cultivada a 1074 m de altitude na Fazenda Serra das Cabeças, região da Zona da Mata Norte, Minas Gerais.

Foram coletadas todos os dias amostras de grãos de café despolidos processados sob seca natural em terreiro revestido com cimento até o processo completo de secagem. As amostras foram colocadas em sacos

plásticos e transportadas em caixas contendo gelo para o Laboratório de Ecologia Microbiana, embalada a vácuo e mantida a -20 °C até o início dos procedimentos experimentais.

A extração de DNA total das amostras de grãos de café despulpados, sem apresentar injúrias, foi realizada utilizando-se o protocolo já estabelecido e descrito acima para extração de DNA de leveduras endofíticas em frutos de café cereja.

A diversidade e a sucessão de leveduras durante o processo de seca natural de café despulpado foram avaliadas pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE conforme já descrito acima.

A comparação estatística dos diferentes perfis de DGGE foi feita com o uso do programa GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) usando o coeficiente Dice de similaridade e o algoritmo de agrupamento UPGMA para calcular o dendrograma. A riqueza da comunidade de leveduras também foi estimada com base no número de bandas (UTOs) no perfil de cada amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comunidades de leveduras epifíticas e endofíticas isoladas de fruto de café cereja

O protocolo para a desinfestação superficial dos frutos de café utilizados no estudo de leveduras endofíticas, cultiváveis e não-cultiváveis, mostrou-se eficaz, garantindo para a maioria a ausência de crescimento microbiano em meio MYGP inoculado com a última água de lavagem dos frutos e em meio de cultura em que os frutos desinfestados superficialmente foram incubados por 72 horas a 28 °C. Somente frutos em que se demonstrou a ausência de crescimento microbiano foram utilizados para o isolamento dos endofíticos cultiváveis e para a extração do DNA total de leveduras endofíticas cultiváveis e não-cultiváveis.

A presença de leveduras nas 14 amostras de frutos de café cereja coletadas de quatro cultivares de *Coffea arabica* L. (Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho, Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho) retiradas de talhões georeferenciados em diferentes altitudes na região da Zona da Mata Norte, Minas Gerais, foi constatada em meio MYGP, assim como a densidade populacional total e das endofíticas foi avaliada em todas as amostras (Tabela 2).

O resultado do isolamento de leveduras mostrou variada diversidade na morfologia de colônias em meio de cultura MYGP (Tabela 3, Figura 1). Foram isoladas 36 culturas, sendo fenotipicamente caracterizadas e agrupadas em 12 diferentes macromorfotipos com base nas características culturais (Tabela 3).

Tabela 2 – Número de morfotipos e unidades fomadoras de colônia de leveduras epifíticas e endofíticas nas 14 amostras de café cereja obtidas em lavouras de cultivares de *Coffea arabica* (L.) localizadas a diferentes altitudes no Município de Araponga, MG.

Amostra	Cultivar	Altitude (m)	Leveduras Totais		Leveduras Endofíticas	
			Número de morfotipos	UFC.Fruto ⁻¹	Número de morfotipos	UFC.Fruto ⁻¹
625	Catuaí Vermelho	676	2	35,6x10 ²	-	-
626	Catuaí Amarelo	676	3	67x10 ²	1 (LEM 626)	NC
627	Bourbon Vermelho	687	2	16x10 ²	-	-
628	Bourbon Amarelo	687	1	15x10 ²	-	-
629	Catuaí Vermelho	956	4	16x10 ¹	1 (LEM 629)	NC
630	Catuaí Amarelo	956	1	32x10 ¹	-	-
643	Catuaí Amarelo	1013	4	11,2x10 ¹	1 (LEM 643)	NC
644	Catuaí Vermelho	1013	2	6,5x10 ⁴	1 (LEM 644)	9,2x10 ³
648	Bourbon Amarelo	1062	1	NC	-	-
631	Bourbon Vermelho	1067	1	47x10 ²	1* (LEM 631)	NC
632	Bourbon Amarelo	1067	2	9,4x10 ²	-	-
647	Bourbon Vermelho	1101	3	14x10 ¹	-	-
645	Catuaí Amarelo	1189	2	NC	-	-
646	Catuaí Vermelho	1189	2	NC	-	-

*Crescimento de apenas uma colônia; NC = Não calculável

Tabela 3 – Descrição das características morfológicas dos isolados de leveduras de frutos de *Coffea arabica* L. cultivados em meio MYGP por até 5 dias a 28 °C.

Isolados (LEM)	Características morfológicas
643-8; 646-3	Colônia de tamanho médio com aspecto pastoso, borda lisa, superfície plana, contorno circular, coloração branca e crescimento a 48 horas.
629-2; 644-2; 645-1; 625-9; 632-2; 643-2; 627-7; 630-1; 627-1; 627-6; 626-3; 626-7; 646-2	Colônia de tamanho médio com aspecto cremoso, borda lisa, superfície elevada, contorno circular, coloração bege e crescimento a 48 horas.
629-8	Colônia de tamanho médio com aspecto terroso, borda ondulada, superfície enrugada, contorno irregular, coloração branca e crescimento a 72 horas.
626-5, 629-3	Colônia de tamanho pequeno com aspecto cremoso, borda lisa, superfície elevada, contorno circular, coloração bege e crescimento a 72 horas.
632-6; 648-1; 629-1; 644-1; 646-1; 625-1; 628-1; 631-1; 626-1; 627-3; 625-2	Colônia de tamanho médio com aspecto pastoso, borda lisa, superfície plana, contorno circular, coloração branca e crescimento a 48 horas.
647-9	Colônia de tamanho pequeno com aspecto seco, borda ondulada, superfície enrugada, contorno irregular, coloração bege e crescimento a 96 horas.
647-10	Colônia de tamanho médio com aspecto seco, borda ondulada, superfície enrugada, contorno irregular, coloração bege e crescimento a 96 horas.
643-4	Colônia de tamanho médio com aspecto pastoso, borda dobrada, superfície pregas, contorno circular, coloração bege e crescimento a 72 horas.
647-4	Colônia de tamanho grande com aspecto pastoso, borda ondulada, superfície dobras, contorno irregular, coloração bege e crescimento a 72 horas.
643-3	Colônia de tamanho grande com aspecto pastoso, borda ondulada, superfície dobras, contorno irregular, coloração bege e crescimento a 48 horas.
645-3	Colônia de tamanho grande com aspecto terroso, borda dobradas, superfície enrugadas, contorno irregular, coloração bege e crescimento a 48 horas
629-10	Colônia de tamanho médio com aspecto terroso, borda ondulada, superfície cerebriforme, contorno irregular, coloração branca e crescimento a 72 horas

Colônia de tamanho pequeno < 2mm, médio 2-5mm e grande > 5mm.



Figura 1 – Aspecto morfológico de colônias de leveduras isoladas de frutos cereja (*Coffea arabica* L.) crescidas a 28 °C por 5 dias em meio de cultura MYGP.

A densidade de leveduras em frutos de café, que incluem as epifíticas e endofíticas, variou de $6,5 \times 10^4$ UFC.fruto⁻¹ a menos de 25 colônias por fruto, valores considerados expressivos quando comparados aos encontrados em frutos cereja da mesma região (Sakiyama, 2001). Possivelmente, o meio de cultura utilizado para o isolamento, MYGP, contribui para o fato. Sakiyama (2001) utilizou o meio R2A (Reasoner & Geldreich, 1985), pH 7,0, enquanto que no presente estudo o meio de cultura foi seletivo para levedura, MYGP, pH 5,6 adicionado de 250 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. Em fazendas de café do Sul de Minas Gerais foram encontradas até 10^6 UFC leveduras cultiváveis por fruto no estágio cereja (Silva et al., 2001).

A ocorrência de leveduras endofíticas cultiváveis em frutos de café cereja das 14 amostras é considerada como muito baixa (Tabela 2). Elas foram encontradas apenas nas amostras 626, 629, 631, 643 e 644, sendo as colônias resultantes do isolamento em meio MYGP contendo cloranfenicol, uniformes quanto à morfologia das colônias e por isso consideradas como de um morfotipo apenas. As leveduras isoladas foram cultivadas e catalogados para integrar a coleção de culturas do Laboratório de Ecologia Microbiana com a denominação de isolados LEM 626, LEM 629, LEM 631, LEM 643 e LEM 644. A ocorrência de leveduras endofíticas cultiváveis em *C. arabica* já havia sido

constatada anteriormente em três localidades de Minas Gerais, com população variando de 10^3 e 10^4 UFC.g⁻¹ de frutos (Sakiyama, 2001). Isolados de leveduras endofíticas também foram encontrados com baixa densidade quando comparado com leveduras totais de folhas e flores de bromélias do Sul do Brasil (Landell, et al., 2006).

Os isolados de leveduras endofíticas apresentam característica de crescimento rápido e colônia com aspecto pastoso, branca, circular, borda lisa, superfície plana e tamanho médio. As características morfológicas são similares às descritas para *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Candida albicans* e *Pichia kluyveri*, consideradas como as de espécie de referência (Kurtzman & Fell, 1998). A característica de morfologia de colônias de leveduras endofíticas, em fruto de *C. arabica* no estágio cereja, cultiváveis em meio MYGP contendo cloranfenicol, não discrimina as diferenças para efeito de identificação destes fungos leveduriformes pelos métodos clássicos.

A maior densidade de leveduras endofíticas cultiváveis foi constatada em frutos no estágio cereja da amostra de Catuaí Vermelho cultivado a 1013 metros de altitude, $9,2 \times 10^3$ UFC fruto⁻¹ (Tabela 2), isolado LEM 644. Nas demais amostras o número de colônias foi inferior a 25 UFC fruto⁻¹. A constatação de que a frequência de isolamento de leveduras endofíticas cultiváveis em meio MYGP contendo cloranfenicol é maior em amostras da cultivar Catuaí pode estar refletindo a existência de relação entre as variáveis cultivar e altitude. Possivelmente, o componente ambiente ao refletir na composição química dos frutos das cultivares, a exemplo dos distintos teores de açúcares nos frutos das cultivares de Catuaí e Bourbon (Guyot et al., 1996; Buenaventura & Castaño, 2002) tenha concorrido para acentuar a diferença na ocorrência das leveduras.

Na etapa de isolamento de leveduras foi constituída uma coleção com 41 culturas no LEM, das quais 5 de endofíticas. As 41 culturas desses morfotipos constituíram o universo-base para a identificação por seqüenciamento direto dos amplicons de rDNA 26S obtidos por PCR. As 5 culturas de endofíticos foram ainda indentificadas por FAME/MIDI e tiveram seus perfis de mobilização eletroforética de fragmentos de rDNA 26S analisados por DGGE.

4.2 Identificação dos isolados de leveduras

O sequenciamento e análise de seqüências de rDNAs 26S dos isolados foram utilizados para identificação das espécies cultiváveis de leveduras, epifíticas e endofíticas, em frutos de café no estágio cereja. Todos os 36 isolados tiveram parte do rDNA 26S sequenciados. As seqüências foram alinhadas e agrupadas entre si (Figura 2) e representantes de cada grupo ou ramo formado tiveram suas seqüências comparadas com seqüências já depositadas no NCBI.

A árvore filogenética reconstruída com dados de seqüências de bases de rDNA 26S mostra o agrupamento de leveduras com seqüência de rDNA 26S de espécies já depositadas no NCBI pertencentes a *Candida smithsonii*, *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus flavescens*, *Meira geulakonigii*, *Pseudozyma* sp e *Sporobolomyces* sp. (Figura 3), sendo 2 espécies com afinidade ascomicética e 4 com basidiomicéticas, respectivamente.

A análise filogenética não permitiu separação entre as leveduras ascomicéticas *C. smithsonii* e *P. guilliermondii* que tem como anamorfa *C. guilliermondii*. Onze isolados de diferentes cultivares e altitudes fizeram parte desse grupo (Figura 2). Possivelmente, são todos da mesma espécie e provavelmente as espécies não se distinguem por cultivares em altitudes diferentes ou, ao contrário, cultivares distintas podem abrigar a mesma espécie em altitudes similares, sob as condições geográficas e climáticas da área amostrada.

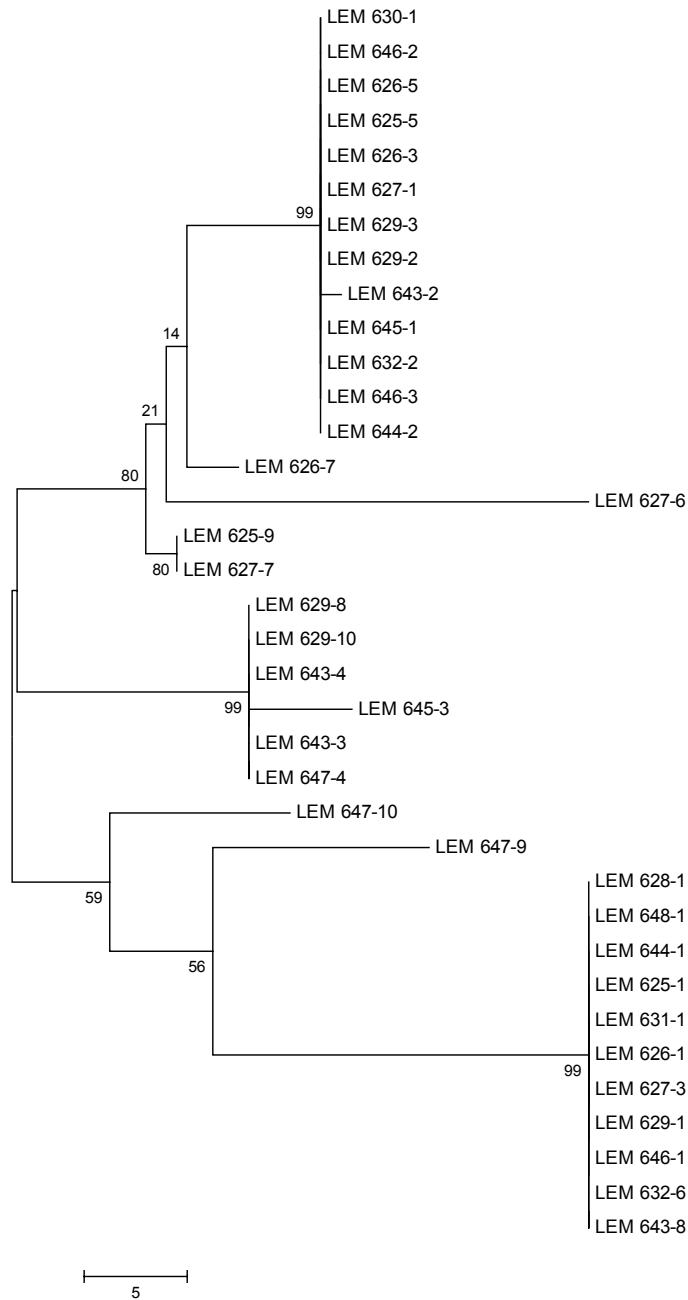


Figura 2 – Árvore mostrando o agrupamento filogenético entre todos os isolados de leveduras totais taxonomicamente similares baseado nas seqüências de rDNA 26S. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro Nearest Neighbor Interchange (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®].

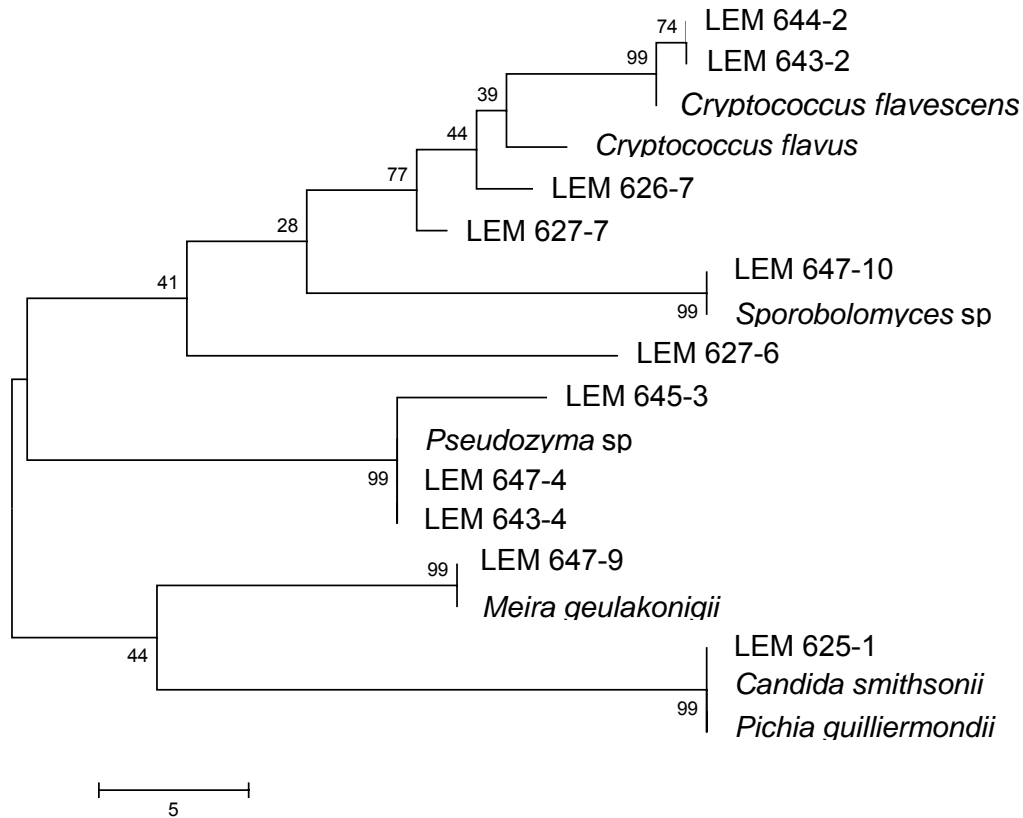


Figura 3 – Árvore mostrando o agrupamento filogenético dos representantes dos grupos de isolados de leveduras totais (epifíticas e endofíticas) em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuai Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, a microrganismos taxonomicamente similares baseado nas seqüências de rDNA 26S. A barra de escala indica 5% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro *Nearest Neighbor Interchange* (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®].

A comunidade de leveduras em frutos de café está composta basicamente dos gêneros *Candida/Pichia* (30,6%) e *Cryptococcus* (36,0%) e uma menor porcentagem de *Pseudozyma* (16,7%), *M. geulakonigii* (2,8%); *Sporobolomyces* sp (2,8%) (Tabela 4). Entre os isolados, 11,1 % não formaram

agrupamento com sequências já depositadas no NCBI, fato interpretado como indicativo da existência de espécies novas ou da inexistência de depósito de sequências rDNAs 26S de espécies conhecidas no banco de dados do NCBI. *Candida smithsonii*/*P. guilliermondii* e *C. flavescens* estão presente na maioria das cultivares e altitudes (Tabela 4), sendo que *Candida* spp., *Pichia* spp., (Silva et al., 2000; Masoud et al., 2004) e *Cryptococcus* (Avallone et al., 2001; Avallone et al., 2002) já foram isoladas de frutos de café. *Pichia guilliermondii* é uma das espécies mais frequentes durante a fermentação e secagem de frutos de café (Silva et al., 2008).

Espécies de leveduras têm sido usadas para controle biológico de fungos, inclusive *P. guilliermondii* para inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* em soja, a inibição do crescimento do fungo é significativa quando as sementes são coinoculadas com *P. guilliermondii* (Paster et al., 1993). Estudos com espécies de *Pseudozyma* (Avis & Belanger, 2002), *Cryptococcus* e *Sporobolomyces* (Willianson & Fokkema, 1985) também demonstram o potencial destas leveduras para o biocontrole de fungos fitopatogênicos. Comunidades de leveduras compostas por espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Pichia* e *Candida* são encontradas em flores e frutos tropicais (Santos et al., 1996). Espécies de *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma* e *Sporobolomyces* também já foram isoladas de flores e frutos de diversas espécies vegetais da mata atlântica (Ruivo, 2005). Espécies de *Sporobolomyces* tem mostrado potencial para produção de 4-decalactona (aroma de pêssego) por síntese de novo (Janssens et al., 1992) e também têm sido sugeridas como indicadores de diferentes sistemas de cultivos de maçã (Camatti-Shartori et al., 2005).

O isolado LEM 647-9 proveniente de lavoura de Bourbon Vermelho situada a 1101 m de altitude foi o único em que a seqüência de nucleotídeos resultante da análise da seqüência parcial de rDNA 26S apresentou identidade com a de *Meira geulakonigii* isolada de citrus (Boekhout et al., 2003). Morfologicamente, este fungo é similar à levedura (*yeast-like*), classificado dentro de Ustilaginales, tal como espécies de *Pseudozyma*. No entanto, análise de seqüência de rDNA mostra ser ela representativa de linhagem pertencente a Exobasidiomycetidae, de Ustilaginomycetes, sendo mais relacionada com *Dicellomyces scirpi* e *Kordyana* spp. (Boekhout et al., 2003), para este último, a

fase leveduriforme não é bem entendida. Estes fungos são os carvões pertencentes a Basidiomycota, estão inseridos na classe Ustilaginomycetes e ordem Ustilaginales. Eles são normalmente dimórficos, apresentando uma fase leveduriforme haplóide sapróbia e uma fase hifal dicariótica parasítica (Begerow et al., 2006). Durante a fase saprofitica (anamorfa, estágio assexual) estes fungos podem crescer como leveduras ou hifas que desenvolvem blasto – ou balistosporos (Piepenbring, 2003). A fase haplóide normalmente inicia com a formação de basidiósporos após a meiose do núcleo diplóide no basídio e finaliza como a conjugação de células haplóides compatíveis para produzir o dicariótico, fase micelial parasítica (Begerow et al., 2006). Tem sido mostrado que o cruzamento é essencial para a infecção da planta hospedeira ((Kahmann & Kamper, 2004). *Ustilago maydis* é amplamente utilizado como organismo modelo para fungos fitopatogênicos (Kahmann & Kamper, 2004) e foi o primeiro basidiomiceto parasita de planta a ter o genoma completamente sequenciado e disponível (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>). As espécies classificam-se como homotáticas, heterotáticas ou secundariamente homotáticas. Espécies homotáticas não são muito frequentes em basidiomicetos. A maioria das espécies é heterotática, destas de 20% a 25% são heterotáticas bipolares ou unifatoriais, isto é, o tipo de pareamento é determinado por alelos de um só *locus* gênico. Os heterotáticos tetrapolares ou bifatorias têm essa denominação relacionada com o conhecimento inicial de que um par de genes estaria envolvido. *Ustilago maydis* é também uma espécie com alternância das fases haplóide e dicariótica durante seu ciclo de vida, mas o pareamento entre os esporídios (fase unicelular haplóide) e o estabelecimento de dicário e a patogenicidade do organismo são controlados por dois *locus*: **a** e **b**. Um cruzamento compatível só é possível quando tanto **a** como **b** são distintos, o que significa que existe um heterotalismo tetrapolar, pois ocorrem quatro produtos da segregação: dois parentais e dois recombinantes (Esposito & Azevedo, 2004).

A espécie, *M. geulakonigii*, já foi encontrada em pêra no Japão (Yasuda et al., 2007) e também de forma endofítica em frutos de toranja (*Citrus paradisi* Macfad) que coloniza a casca e protege contra o ácaro da ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) (Paz et al., 2007). No entanto, em frutos de café no estágio cereja este é o primeiro relato desta espécie.

Treze isolados de leveduras entre os 36 da coleção do LEM resultantes do isolamento em frutos das quatro cultivares em altitudes diversas foram agrupados com altos valores de *bootstrap* com seqüência de *C. flavescens*, uma indicação de que esta espécie não apresenta especificidade quanto aos cultivares de *C. arabica* em altitudes entre 676 e 1189 metros. O questionamento sobre a existência de especificidade entre leveduras e cultivares de *C. arabica* e os sobre a influência da altitude, bem como da contribuição destas como produtoras de compostos precursores daqueles que compõem a qualidade da bebida superior do café requer a realização de estudos mais específicos e aprofundados.

Tabela 4 – Identificação por meio de sequência de rDNA 26S e distribuição taxonômica dos isolados de leveduras obtidos de frutos de café cereja de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L.

Amostra	Cultivar	Espécie identificada	Total de isolados
625	Catuaí Vermelho	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1)*	2
626	Catuaí Amarelo	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (2);	3
627	Bourbon Vermelho	<i>Candida smithsonii</i> <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1);	2
628	Bourbon Amarelo	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1);	1
629	Catuaí Vermelho	<i>Candida smithsonii</i> <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (2); <i>Pseudozyma</i> sp (2)	5
630	Catuaí Amarelo	<i>Cryptococcus flavescens</i> (1)	1
643	Catuaí Amarelo	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Pseudozyma</i> sp (2); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1)	4
644	Catuaí Vermelho	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1)	2
648	Bourbon Amarelo	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1)	1
631	Bourbon Vermelho	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1)	1
632	Bourbon Amarelo	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1)	2
647	Bourbon Vermelho	<i>Pseudozyma</i> sp (1); <i>Meira geulakonigii</i> (1); <i>Sporobolomyces</i> sp (1)	3
645	Catuaí Amarelo	<i>Pseudozyma</i> SP (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1)	2
646	Catuaí Vermelho	<i>Candida smithsonii</i> / <i>Pichia guilliermondii</i> (1); <i>Cryptococcus flavescens</i> (1)	2

* número da ocorrência do isolado.

4.3 Identificação dos isolados de leveduras endofíticas

Os resultados de sequenciamentos dos rDNA 26S dos 5 isolados de leveduras endofíticas cultiváveis em meio MYGP mostraram identidade entre 96 e 100% com seqüências de rDNA de espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Brettanomyces*. No entanto, o agrupamento por meio da análise filogenética pelo método de distância e máxima parcimônia, de acordo com a busca de identidade com seqüências disponíveis no banco de

dados GenBank utilizando o algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), demonstram maior identidade às seqüências de rDNA de *Candida* e *Pichia* (Figura 4). A árvore filogenética reconstruída apresenta três dos isolados de leveduras, LEM 626, LEM 643 e LEM 644, agrupados no mesmo ramo e com alta identidade, pertencentes ao clado de *C. smithsoni* e *P. guilliermondii*; um isolado agrupado com as seqüências do clado de *C. parapsilosis*, o LEM 631, e, finalmente o LEM 629 com alta identidade com *C. diddensiae* e *C. germanica* (Figura 4). No Brasil, representantes endofíticos dos gêneros *Candida* e *Pichia* já foram encontrados em folhas, flores e frutos de maçã sob três sistemas de cultivo (Camatti-Shartori et al., 2005). Em folhas e flores de bromélias autores já relataram a ocorrência de *Candida* (Landell, et al., 2006). *Candida diddensiae* é uma espécie encontrada na cutícula e intestino de *Hypothenemus hampei*, o inseto-praga da broca-do-café (Pérez et al., 2003). A constatação desta como endofítica em frutos de café sadios no estágio cereja se configura como relato novo sobre nicho de ocorrência da espécie *C. diddensiae* e possibilita a formulação de hipóteses sobre a origem da levedura endofítica.

As pesquisas sobre leveduras endofíticas têm sido conduzidas em diversas plantas, naturalmente incluindo as de importância agrícola e florestal, como: milho (Nassar & El-Tarabily, 2005; Molnár & Prillinger, 2006), banana (Cao et al., 2002), maçã (Camatti-Shartori et al., 2005), *Pinus* (Zhao et al., 2002) e outras espécies florestais (Unterseher et al., 2007). Em café, os primeiros relatos da presença e da distribuição de leveduras endofíticas em frutos de café são os constantes dos trabalhos de Yamada (1999) e Sakiyama (2001) realizados na Universidade Federal de Viçosa, no Brasil, mas as leveduras não foram identificadas. Portanto, o presente trabalho se constitui no primeiro estudo e relato de ocorrência e identificação de espécies de leveduras com potencial endofítico em frutos de *C. arabica* no estágio cereja na planta. *Pichia guilliermondii* (Silva et al., 2008) e *C. parapsilosis* (van Pee & Castelein, 1971) já foram encontradas em frutos de café, porém, não como endofíticas. A constatação da presença dessas leveduras como endofíticas em frutos de café amplia o relato de nichos em que são encontradas e também o questionamento sobre o papel delas nessa associação.

Os perfis eletroforéticos de DGGE dos amplicons de rDNA 26S dos 5 isolados de leveduras submetidos a análise com o software GelCompar II[®] (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) demonstraram que os isolados LEM 626, LEM 643 e LEM 644 se agrupam no mesmo ramo e com alta identidade entre eles (Figura 5), enquanto os outros dois, LEM 629 e LEM 631 se agrupam em ramos distintos, com identidade baixa. A confirmação do agrupamento com a DGGE é uma demonstração a mais do poder de resolução dessa técnica quando a qualidade das seqüências é adequada e, também, da relação com resultados da análise filogenética.

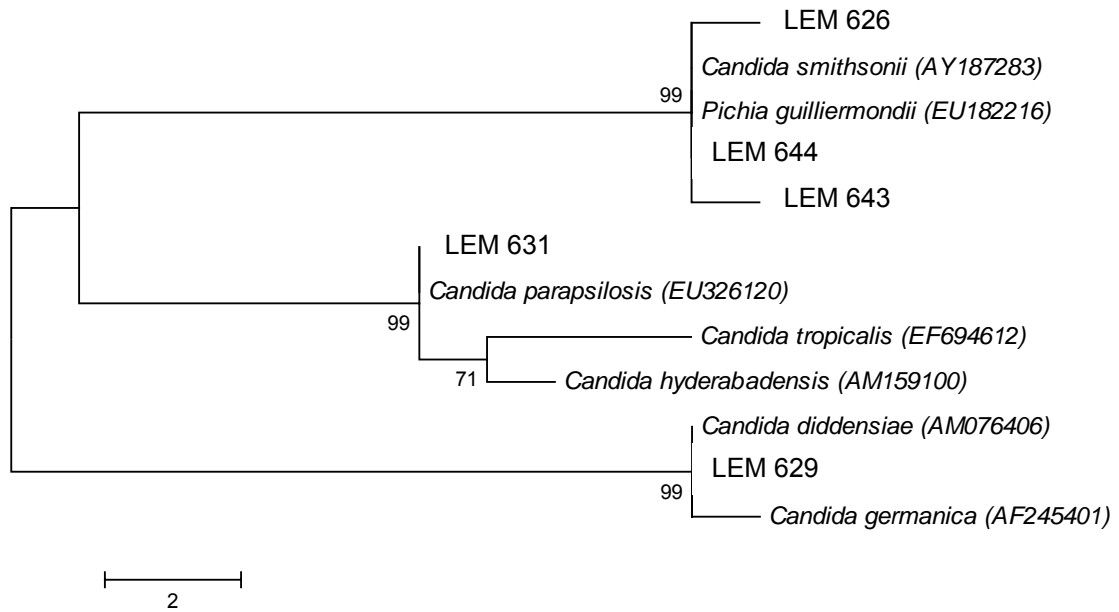


Figura 4 – Árvore mostrando o agrupamento filogenético dos isolados de leveduras endofíticas em frutos de café cerejeira (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, a microrganismos taxonomicamente similares baseado nas seqüências de rDNA 26S. A barra de escala indica 2% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro *Nearest Neighbor Interchange* (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®]. Os números indicados entre parênteses referem-se aos números de acessos no Banco de Dados GenBank.

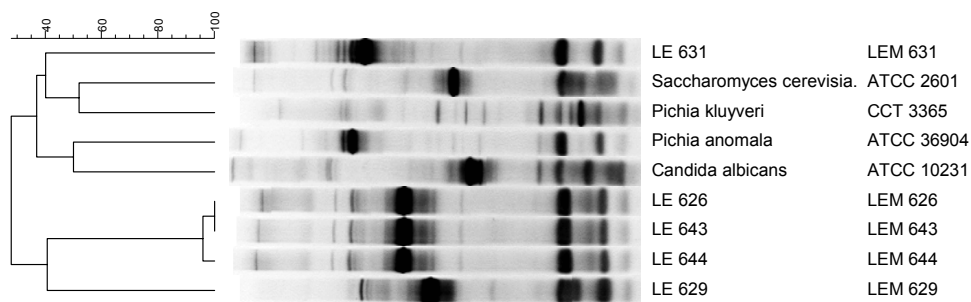


Figura 5 – Perfil eletroforético de fragmentos de rDNA 26S dos isolados de leveduras endofíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil, e leveduras referências e agrupamento utilizando o programa GelCompar II[®].

A identificação de leveduras cultiváveis com base no perfil FAME, pelo sistema Sherlock[®] (MIDI) encontrou, na biblioteca de referência armazenada em banco de dados para leveduras (YST28 3.80), perfil comparável para 4 dos 5 isolados, sendo LEM 626 e LEM 644 identificados como *C. polymorpha*; LEM 631 como *C. parapsilosis* e o LEM 643 como o que apresentou maior similaridade com *C. vartiovaarae*. Ressalta-se que o índice de similaridade resultante da identificação do isolado LEM 629 foi baixo, uma evidência de que o método não é o de escolha para identificação dessa levedura, embora o tenha agrupado com *Lipomyces starkeyi* e espécies do gênero *Candida* (Tabela 5).

A identificação com base no perfil de FAME foi similar aos métodos anteriores apenas para LEM 631, o isolado incluído no clado de *C. parapsilosis*. Embora os isolados LEM 626 e LEM 644 tenham se agrupados no mesmo ramo e com alta identidade entre eles, eles foram identificados na análise filogenética como pertencentes a uma espécie distinta, *C. polymorpha*, enquanto LEM 643, anteriormente no mesmo grupo com LEM 626 e LEM 644, foi identificado como *C. vartiovaarae*. Embora a ocorrência dessa espécie associada a fruto de café no Brasil já tenha sido demonstrada (Silva et al, 2000), a constatação de que é também uma levedura endofítica em frutos cereja constitui-se em conhecimento novo sobre os nichos ocupados por essa espécie.

As diferenças encontradas entre os métodos utilizados na identificação dos isolados de leveduras endofíticas cultiváveis em meio MYGP, identificações fenotípicas e genotípicas, suportam a afirmativa de que elas não se anulam mas, ao contrário, geram informações complementares e que contribuem substantivamente para melhor conhecimento da comunidade analisada.

Tabela 5 – Identificação com base no perfil FAME, pelo sistema Sherlock® (MIDI), dos isolados de leveduras endofíticas em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.

Origem	Isolado	Identificação	Índice de Similaridade
Catuaí Amarelo	LEM 626	<i>Candida polymorpha</i>	0,770
Catuaí Vermelho	LEM 269	<i>Lipomyces starkeyi</i>	0,278
		<i>Candida lusitaniae</i>	0,226
		<i>Candida famata</i>	0,204
Bourbon Vermelho	LEM 631	<i>Candida parapsilosis</i>	0,634
Catuaí Amarelo	LEM 643	<i>Candida vartiovaarae</i>	0,754
		<i>Candida norvegica</i>	0,727
Catuaí Vermelho	LEM 644	<i>Candida polymorpha</i>	0,607

4.4 Análise da diversidade de leveduras epifíticas e endofíticas cultiváveis e não cultiváveis por PCR-DGGE

A análise da diversidade genética das comunidades de leveduras utilizando-se de *primers* para a região D1/D2 do rDNA de leveduras e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) dos amplicons possibilitou a determinação do variado perfil genotípico na amostra de DNA das leveduras totais (epifíticas e endofíticas) e das endofíticas, cultiváveis em meio MYGP e também das não cultiváveis, associadas com os frutos de café cereja (Figura 6 e 7).

O padrão de bandejamento dos fragmentos de DNA no gel mostrou a existência de diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de leveduras totais e endofíticas associadas aos frutos de café, sendo o padrão de distribuição das UTOs diverso nas cultivares e altitudes estudadas (Figura 6). A análise visual dos géis revela a existência de UTOs dominantes para leveduras totais e endofíticas, que estão presentes em todas as amostras provenientes de diferentes cultivares e altitudes, contudo, a imagem do géis de DGGE analisadas com auxílio do programa GelCompar II[®] (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) revela nos perfis genotípicos a existência de até 16 UTOs em leveduras totais e 14 UTOs em endofíticas por amostra de frutos das quatro cultivares de *C. arabica* L. (Figura 6 e 7).

A estimativa de Riqueza de espécies (R) mostra que os maiores valores são os referentes a leveduras totais em todas as amostras, quando comparados com as de endofíticas (Figura 8), diferença que evidencia também a eficiência do protocolo de desinfestação superficial dos frutos. A eficiência desse processo de desinfestação para remoção da microbiota epifítica e de moléculas de DNA dela originados já havia sido anteriormente demonstrada (Santos, 2008), assegurando que o DNA proveniente da microbiota epifítica não estaria contaminando o *pool* de DNA metagenômico de interesse.

Com relação à altitude, os maiores valores de R de endofíticas foram observados para a amostra originárias de lavouras localizadas nas maiores altitudes, das seis amostras em que os valores de R foram os maiores, cinco foram coletadas em altitudes superiores a 1.000 metros (Figura 8). Embora os resultados não possam ser submetidos a desejável rigor de análises estatísticas, por limitações inerentes aos objetivos do estudo e procedimentos utilizados, infere-se como provável a confirmação da leitura de que os maiores valores de R para comunidades de endofíticas venham a ser encontradas nas maiores altitudes. O efeito da altitude sobre diversidade de bactérias endofíticas nas mesmas amostras utilizadas no presente trabalho já foi demonstrado (Cordero, 2008).

O menor número de isolados em meio de cultivo, em contraste com o maior número de UTOs nos géis de DGGE, mostra que grande parte das leveduras totais e endofíticas presentes nos frutos de café não são cultiváveis ou de mesmo morfotipo. No entanto, essa afirmação deve ser feita com

algumas ressalvas impostas pelas limitações da técnica de PCR-DGGE. A resolução dos perfis genotípicos em termos de número de bandas (UTOs) no gel nem sempre é suficiente para ilustrar a diversidade microbiana. Alguns autores demonstram que fragmentos de diferentes seqüências podem migrar para a mesma posição no gel (Vallaeyts et al., 1997) e, especialmente, que as diferentes bandas exibidas podem não corresponder exatamente a diferentes espécies de leveduras pelo fato desse microrganismo possuir múltiplas cópias do rDNA e polimorfismos passíveis de detecção pela técnica de DGGE. Outra restrição dessa metodologia é que o método de extração não permite a separação de DNA, originalmente de células ativas, dos de células mortas ou DNA livre. Consequentemente, seria distorcida a imagem da análise de DGGE de fragmentos de rDNA 26S amplificados em termos de comunidade microbiana ativa. Análise da estrutura da comunidade de leveduras em vinhos, por meio de PCR-DGGE, mostrou que a intensidade da banda se relaciona com o número inicial de DNA alvo e que um número mínimo do genoma alvo é necessário para ser detectado na DGGE (Prakitchaiwattana et al., 2004). Isso permite a suposição de que os perfis de DGGE obtidos no presente estudo representam a microbiota dominante no ambiente em estudo. Em futuro, próximo a pesquisa deverá distinguir a origem do DNA de microrganismos ativos de outras fontes de DNA, provavelmente fazendo uso do RNA ao invés de DNA como molde para a PCR.

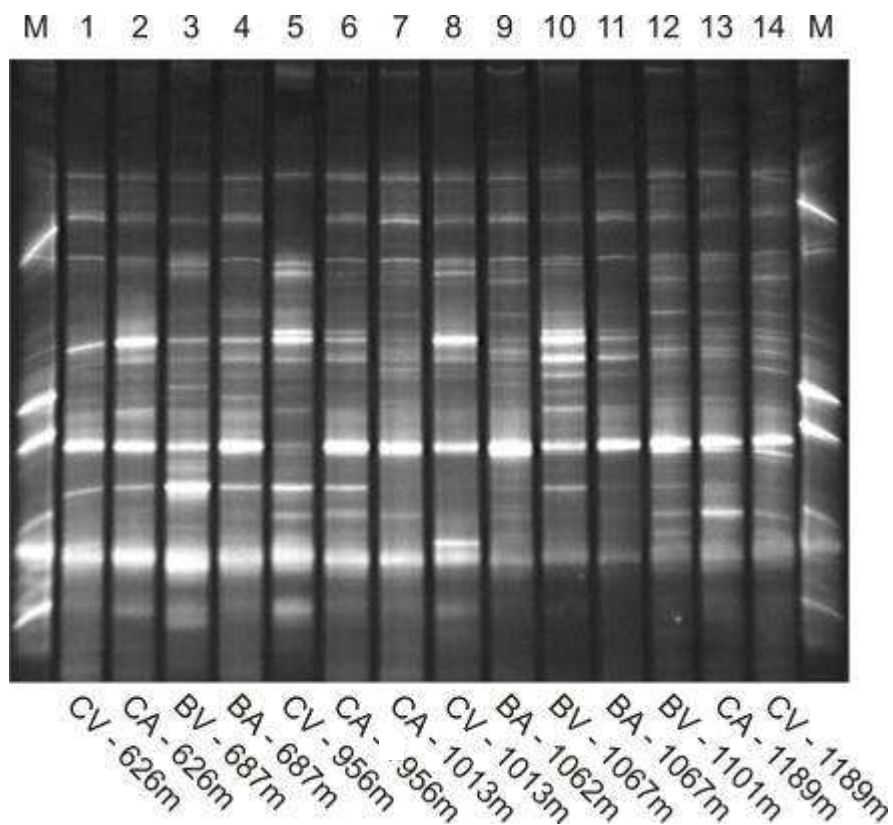


Figura 6 – Perfis eletroforéticos de DDGE de seqüências de rDNA 26S, leveduras epifíticas e endofíticas presentes em frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes. Catuaí Vermelho (CV), Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Vermelho (BV), e Bourbon Amarelo (BA). Amostras de plantações localizadas em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.

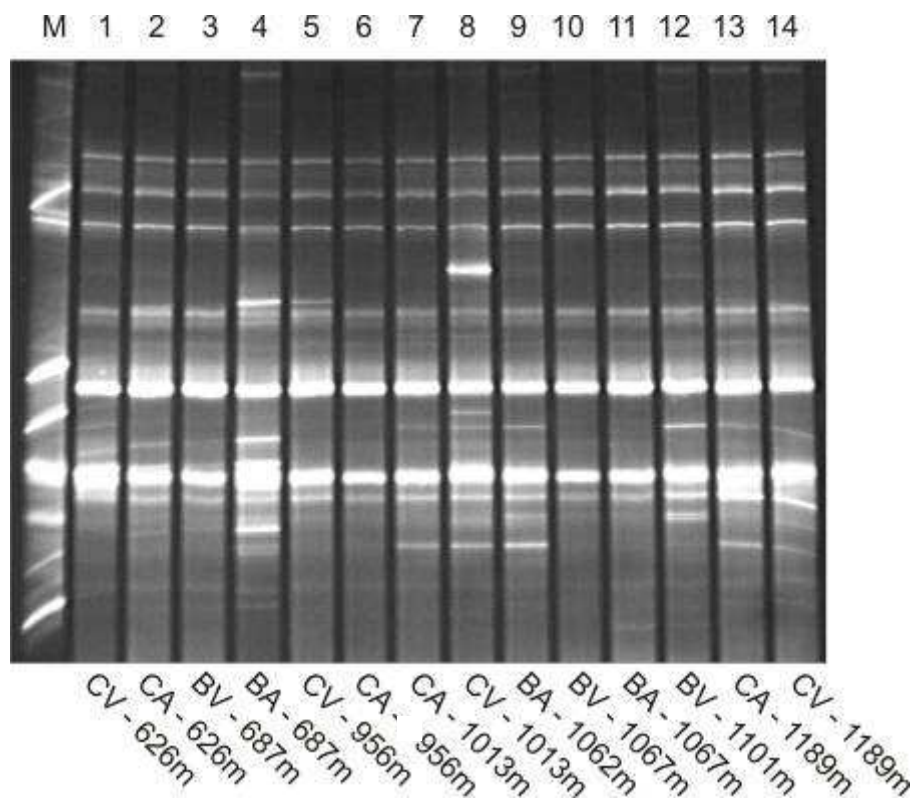


Figura 7 – Perfis eletroforéticos de DDGE de seqüências de rDNA 26S, leveduras endofíticas presentes em frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes. Catuaí Vermelho (CV), Catuaí Amarelo (CA), Bourbon Vermelho (BV), e Bourbon Amarelo (BA). Amostradas de plantações localizadas em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.

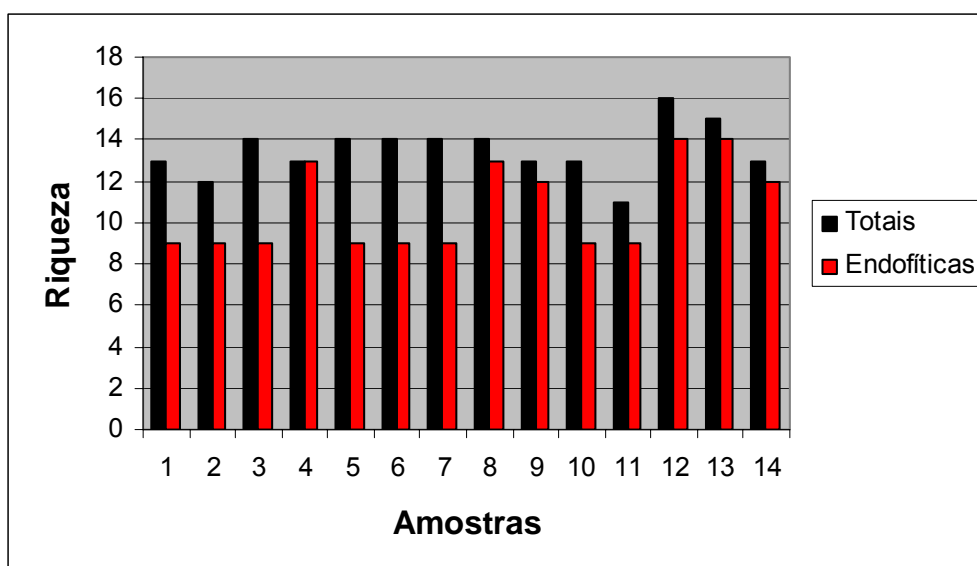


Figura 8 – Riqueza (R) das comunidades de leveduras epifíticas e endofíticas presentes em frutos de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes em metro. 1 = CV-676; 2 = CA-676; 3 = BV-687; 4 = BA-687; 5 = CV-956; 6 = CA-956; 7 = CA-1.013; 8 = CV-1.013; 9 = BA-1.062; 10 = BV-1067; 11 = BA-1067; 12 = BV-1.101; 13 = CA-1.187; e 14 = CV-1.187 m. CA = Catuaí Amarelo; CV = Catuaí Vermelho; BA = Bourbon Amarelo; e BV = Bourbon Vermelho.

A comparação das imagens dos perfis eletroforéticos em DGGE dos fragmentos de rDNA 26S da comunidade de levedura associada a frutos cereja de 4 cultivares de *C. arabica* em diferentes altitudes no programa GelCompar II[®], resultou em agrupamentos que propiciam uma interpretação mais segura da diversidade visualizada (Figura 9). Dois grandes grupos diferentes foram formados, porém com similaridade relativamente baixa entre os representantes de cada grupo. As amostras de Catuaí Vermelho da menor e da maior altitude se mostraram bem diferentes das demais, ficaram distanciadas nos grupos formados, e apresentaram similaridade de apenas 30,31% entre si (Tabela 6). Nota-se tendência de agrupamento por altitude pelos perfis, três das quatro amostras coletadas no Campus experimental da UFV, altitude entre 676 e 687 m, embora com baixa similaridade entre si, ficaram todas no mesmo clado. Por outro lado, os perfis das demais amostras coletadas em altitudes superiores a 950 m ficaram dentro do outro grande grupo (Figura 9).

No geral, os perfis das populações apresentaram baixos índices de similaridade, sendo os maiores valores os das amostras de Bourbon Amarelo e Bourbon Vermelho de uma mesma altitude, porém com similaridade de apenas 64,29% (Tabela 6).

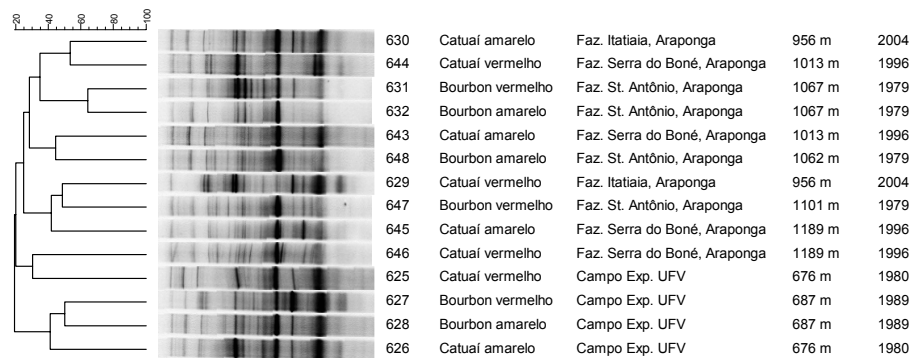


Figura 9 – Perfis eletroforéticos de DDGE e a comparação das imagens dos perfis de DGGE baseado em fragmentos de rDNA 26S de leveduras associadas a frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes no programa GelCompar II®. Dados de amostragem são indicados. Escala (20-100) indica o nível de similaridade.

Tabela 6 - Matriz de similaridade da comunidade de leveduras com base na análise das imagens dos perfis de DGGE de rDNA 26S de frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuaí Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.

Amostra	630	644	631	632	643	648	629	647	643	625	646	627	628	626
630	100													
644	53,33	100												
631	20	33,33	100											
632	35,72	50	64,29	100										
643	28,57	28,57	22,86	36,37	100									
648	12,91	45,17	32,26	20,69	44,45	100								
629	50	0	18,75	26,67	21,63	12,13	100							
647	38,71	12,91	32,26	27,59	33,33	37,5	48,49	100						
643	31,25	12,5	12,5	20	37,84	18,19	35,3	48,49	100					
625	12,13	30,31	24,25	32,26	15,79	17,65	28,57	29,41	5,72	100				
646	20	26,67	0	14,29	17,15	19,36	12,5	32,26	18,75	30,31	100			
627	25,81	12,91	12,91	6,9	5,56	18,75	18,19	12,5	18,19	0	12,91	100		
628	51,61	12,91	25,81	34,49	33,33	12,5	24,25	31,25	30,31	17,65	19,36	50	100	
626	18,19	6,06	12,13	6,45	10,53	5,89	40	35,3	11,43	27,78	18,19	41,18	41,18	100

Com relação à leveduras endofíticas, as maiores diferenças na comparação dos perfis de DGGE foram constatadas em fragmentos de rDNA 26S provenientes das amostras de Catuaí Vermelho coletadas em localidades de altitudes distintas, a exemplo da amostra 625 originária de plantação a 676 m e 646 a 1189 m; elas constituíram ramos distintos (Figura 10). O perfil eletroforético em DGGE de Catuaí Vermelho coletada na localidade de menor altitude (amostra 625, a 676 m), também mostrou-se completamente diferente (0% de similaridade) dos perfis de Bourbon Vermelho e do Amarelo (amostras 631 e 632) a 1067 m e apenas 6,25% de similaridade com o perfil da Catuaí Amarelo a 1189 m (Tabela 7). Por outro lado, oito das 10 amostras coletadas em altitudes superiores a 950 m formaram um clado com mais de 50% de similaridade entre os integrantes, índice de similaridade de até 77,42% entre os perfis de Bourbon Vermelho e do Amarelo coletadas a 1067 m. Com base nessas constatações, infere-se que o fator altitude tem maior influência que o fator cultivar na comunidade de leveduras endofíticas.

No geral, os valores de similaridades entre os perfis de endofíticos foram maiores que os de totais, indicando que a comunidade de endofíticos é mais homogênea (Figura 9 e 10). Este resultado de agrupamento se confirmou também nos géis de DGGE das comunidades totais e endofíticas (Figura 6).

No entanto, os estudos em ecologia microbiana não envolvem somente a estrutura da comunidade, mas também da função de cada grupo microbiano em um ecossistema determinado. Avaliações representativas de comunidades microbianas endofíticas não só devem considerar a abundância e a distribuição de espécies, mas, também, a diversidade funcional nas comunidades microbianas. Este é o primeiro trabalho realizado com estrutura de leveduras totais e endofíticas associadas a frutos de café em diferentes cultivares e altitudes. O conhecimento da estrutura e composição da comunidade de leveduras associada à frutos de diferentes cultivares é de fundamental importância para a compreensão da influência das condições do ambiente sobre ocorrência e diversidade de leveduras totais e endofíticas em fruto de café. No entanto, outros estudos são necessários para conhecer o possível papel funcional e aplicações biotecnológicas dessa comunidade em *C. arabica*.

Neste trabalho foi demonstrada a existência de alta diversidade de leveduras epifíticas e endofíticas cultiváveis e não cultiváveis associadas aos frutos de café no estágio cereja, originários de lavouras em diferentes altitudes da Zona da Mata Norte, Minas Gerais. Provavelmente, as estruturas das populações de leveduras, totais e das endofíticas, são influenciada por estas variáveis.

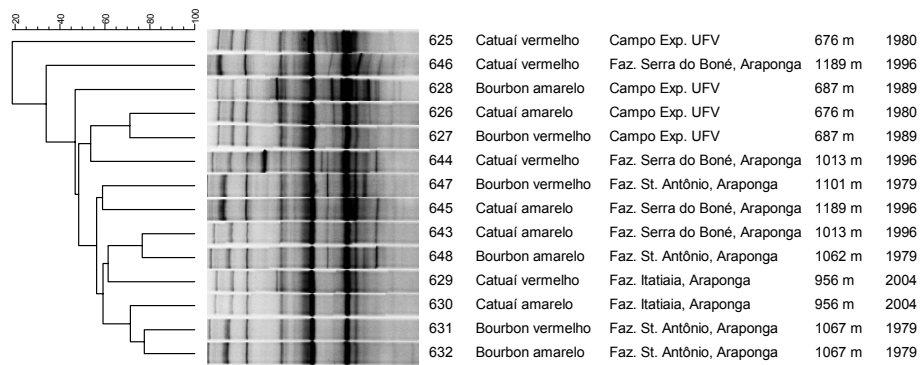


Figura 10 – Perfis eletroforéticos de DDGE e a comparação estatística dos perfis de DGGE baseado em fragmentos de rDNA 26S da comunidade de levedura edofítica associada a frutos cereja de 4 cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes altitudes, utilizando o programa GelCompar II[®]. Dados de amostragem são indicados. Escala (20-100) indica o nível de similaridade.

Tabela 7 - Matriz de similaridade da comunidade leveduras endofíticas com base na análise das imagens dos perfis de DGGE de rDNA 26S de frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivares Catuai Vermelho e Amarelo e Bourbon Vermelho e Amarelo, em lavouras situadas a diferentes altitudes na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.

Amostra	626	627	644	647	645	643	648	629	631	632	630	628	646	625
626	100													
627	70,97	100												
644	54,06	52,95	100											
647	34,29	31,25	47,37	100										
645	36,37	40	44,45	58,83	100									
643	43,75	62,07	57,15	54,55	45,17	100								
648	50	48,49	56,41	59,46	68,57	76,47	100							
629	64,52	57,15	41,18	56,25	53,33	62,07	60,61	100						
631	37,5	55,17	51,43	54,55	58,07	60	64,71	55,17	100					
632	36,37	53,33	38,89	58,83	62,5	58,07	51,43	46,67	77,42	100				
630	51,61	64,29	52,95	50	53,33	75,87	54,55	64,29	75,87	66,67	100			
628	40	62,5	36,85	38,89	41,18	48,49	54,06	56,25	42,43	41,18	50	100		
646	35,3	45,17	43,25	22,86	42,43	37,5	27,78	38,71	31,25	18,19	32,26	28,57	100	
625	42,43	13,33	44,45	23,53	6,25	12,91	11,43	26,67	0	0	13,33	17,65	30,31	100

4.5 Sequenciamento das bibliotecas de rDNAs 26S das populações de leveduras endofíticas associadas aos frutos de café.

A análise aleatória de cinquenta clones positivos na biblioteca construída com fragmentos de rDNAs 26S amplificados a partir do DNA metagenômico, com *primers* NL1 e NL4, mostrou apenas 26 clones com as sequências próprias para análises, todos apresentando 93 a 99% de identidade com seqüências de rDNA já depositadas no NCBI. Destas, 14 sequências apresentaram de 93 a 99% de identidade com rDNA de *Coffea arabica* (EU650386), *C. liberica* (EU650387) e de *Mitchella repens* (AF148279), que também pertencem a mesma família do cafeeiro (Rubiaceae). A construção de novos conjuntos de *primers* mais específicos poderá contribuir para minimizar a constatada interferência do DNA de origem vegetal neste tipo de estudo. Estudo de diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café cereja (Santos, 2008) detectou problema similar resultante da amplificação de DNA de cloroplasto.

Do total de sequências analisadas, 12 clones mostraram 98-99% de identidade com rDNAs de fungos filamentosos. A análise das sequências de acordo com a busca de identidade com seqüências disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando o algoritmo BLASTn, mostrou a ocorrência de quatro gêneros na biblioteca. Entre os gêneros encontrados, 6 clones corresponderam ao gênero *Mycosphaerella*, 2 ao de *Glomerella*, 1 ao de *Microdiplodia* e 1 ao de *Phaeosphaeria*. Além desses gêneros, 3 clones mostraram alta identidade com sequências de fungos endofíticos, sendo 2 clones com fungos isolados de Cupressaceae (Coniferales) e 1 clone com fungos isolados de gramíneas.

4.5.1 Filogenia de leveduras endofíticas presentes em frutos de café

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia, com as sequências dos genes rDNA 26S obtidas a partir de clones componentes da biblioteca, agrupou 46,15% das sequências com sequências de fungos filamentosos (Tabela 8 e Figura 11).

Nenhuma das sequências mostrou identidade com as de leveduras, resultado interpretado como uma limitação associada à amplificação de rDNAs 26S de plantas e fungos filamentosos uma vez que o conjunto de *primers* utilizado foi construído com base no rDNA 26S da *S. cerevisiae*. É recomendável que outros conjuntos de *primers* específicos sejam construídos para minimizar a interferência de DNA que não seja o de interesse. Adicionalmente, os *primers* de escolha devem ser mais seletivos para as espécies já descritas como endofíticas em frutos de café, a exemplo, espécies de *Candida*.

Tabela 8 - Identificação dos clones presentes na biblioteca de rDNA 26S de microrganismos presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, 1189 metros de altitudes, na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil.

Clone	Total de clones	Seqüência mais similar presente no banco de dados ^A	% de identidade	Número de acesso
LEM 1-1	5	<i>Mycosphaerella keniensis</i>	99	DQ246239
LEM 1-21	1	<i>Mycosphaerella pini</i>	98	EF114697
LEM 1-10	1	Fungo endofítico	99	EU687141
LEM 2-14	2	<i>Glomerella acutata</i>	99	DQ286133
LEM 1-43	1	<i>Microdiplodia</i> sp.	98	DQ377913
LEM 2-20	1	<i>Phaeophaeria</i> sp.	99	EF590319
LEM 1-14	2	Fungo endofítico	99	EF420023

^{A/} NCBI, National Center for Biotechnology Information.

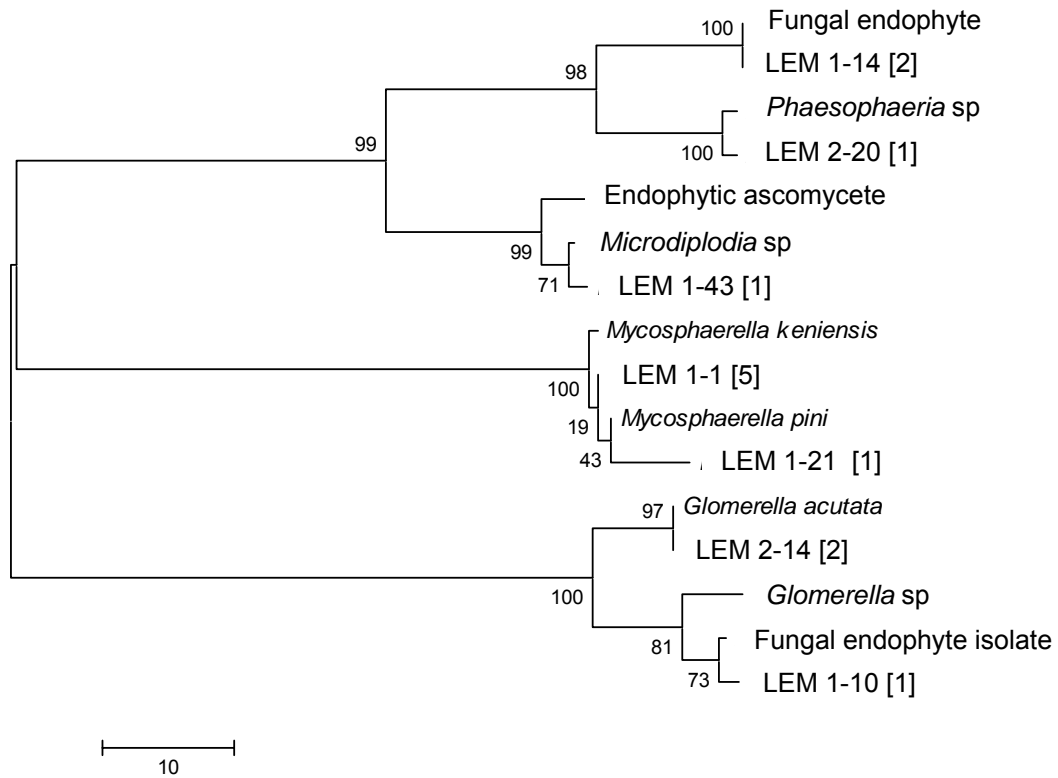


Figura 11 - Árvore mostrando o agrupamento filogenético das seqüências dos genes rDNA 26S obtidas a partir de clones componentes da biblioteca de rDNAs 26S de microrganismos presentes em frutos de café cereja (*Coffea arabica* L.), cultivar Catuaí Vermelho, 1189 metros de altitudes, na Zona da Mata Norte em Minas Gerais, Brasil. A barra de escala indica 10% de divergência. Valores de *bootstrap* (1000 replicatas) são mostrados nos nós dos ramos. A história evolucionária foi inferida pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o parâmetro *Nearest Neighbor Interchange* (NNI), para uma busca heurística. Análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA versão 4.0[®]. Número entre colchetes corresponde ao total de clones do grupo.

4.6 Diversidade e sucessão leveduras durante o processo de seca natural dos grãos

As amostras de DNA total extraídas de leveduras presentes em grãos de café despulpados coletados durante o processo de secagem natural em terreiro revestido com cimento mostraram-se com qualidade adequada para as análises do DNA das populações de leveduras. As imagens dos perfis eletroforéticos em DGGE dos fragmentos de rDNA 26S da comunidade de leveduras totais durante o período de secagem dos grãos de café despulpados em terreiro de cimento comprova a existência de um variado perfil de diversidade genética nas amostras de DNA (Figura 12). Todos esses fragmentos de DNA apresentam o mesmo tamanho, em pares de bases, mas diferem quanto ao conteúdo G+C presente na seqüência. Quanto maior o conteúdo G+C presente na seqüência, maior é a mobilidade eletroforética da banda no gel de DGGE. A análise do gel revelou as variações no número das denominadas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) e a diversidade durante o período de secagem dos grãos de café despulpados e secos em terreiro de cimento (Figuras 11).

Pela comparação das imagens dos perfis eletroforéticos em DGGE dos fragmentos de rDNA 26S da comunidade de levedura realizada com o programa GelCompar II® (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) existem até 16 UTOs diferentes, o que traduz a Riqueza em cada amostra de grãos de café (Figura 13). A análise revela a existência de UTOs dominantes; aquelas que estão presentes durante os 14 dias do período de secagem (Figuras 11) e, também que as grandes mudanças, em termos de presença ou ausência e dominância de diferentes bandas ocorreu durante os 4 primeiros dias de secagem dos grãos de café (Figura 12, linhas 1-4). Embora o perfil das bandas no gel a partir do quinto dia sofra alterações, a dominância de 2 bandas específicas que se encontram também presente durante os 4 primeiros dias permanece. O aparecimento de bandas totalmente novas e o desaparecimento de bandas dominantes foram as causas das mudanças no perfil de DGGE. No quinto dia, duas bandas dominantes vistas do 1º ao 4º dia desapareceram juntamente com outras bandas menos dominantes e durante os nove dias seguintes, os perfis de diferentes amostras mostram variações, indicando que

ocorreram mudanças na comunidade de leveduras. No último dia (linha 14), o perfil de DGGE mudou novamente. Porém, esta mudança não foi tão forte como no período inicial, exemplo dos 4 primeiros dias.

As análises estatísticas dos perfis de DGGE obtidas com rDNA 26S amplificado mostram que eles formam dois grandes grupos (Figura 14) e um ramo isolado para o perfil da amostra do último dia de secagem (linha 14). Desta forma, conclui-se que cada grupo corresponde a um diferente período durante a secagem. Todos os perfis do período inicial, os quatro primeiros dias, ficaram em um grande grupo, assim como os perfis do período mediano (linha 5-13) formaram outro grande grupo. Apenas o perfil da amostra coletada no final do experimento não agrupou com os demais. Dentro de cada grupo formado, os perfis de DGGE correspondentes aos dias subsequentes foram se agrupando de dois a dois até o 12º dia de secagem, indicando as mudanças que ocorreram na comunidade de leveduras a cada dois dias (Figura 14).

A maior diferença entre os perfis do primeiro e do último dia de secagem correspondem ao índice de similaridade de apenas 23,1% (Tabela 9), indicando que a comunidade inicial é distinta da final no processo de secagem natural dos grãos de café despulpados. No entanto, dentro do período mediano apresentam-se mais próximos (Figura 14), com índice de similaridade acima de 80% (Tabela 9), indicando a tendência para o clímax na sucessão. Possivelmente este clímax na comunidade não resulta apenas das constantes mudanças no ambiente, a exemplo da exaustão de nutrientes e a redução da umidade. Outros autores relatam alterações na diversidade de populações de leveduras em fruto de café cereja e durante o processamento dos frutos (Masoud et al., 2004), com aumento da densidade de leveduras durante a secagem.

Contudo, questões principais ainda continuam carentes de maior entendimento sobre o papel das espécies de leveduras presentes, sobre a diversidade e a estabilidade funcional da contínua presença da espécie na comunidade durante o processo. A DGGE na análise da sucessão de leveduras totais demonstrou a diversidade de leveduras associados aos grãos de *C. arabica* durante todo o processo de secagem (Figura 12) e, como conseqüência, nos argumentos científicos para justificar a necessidade de se esclarecer o papel funcional delas no processo.

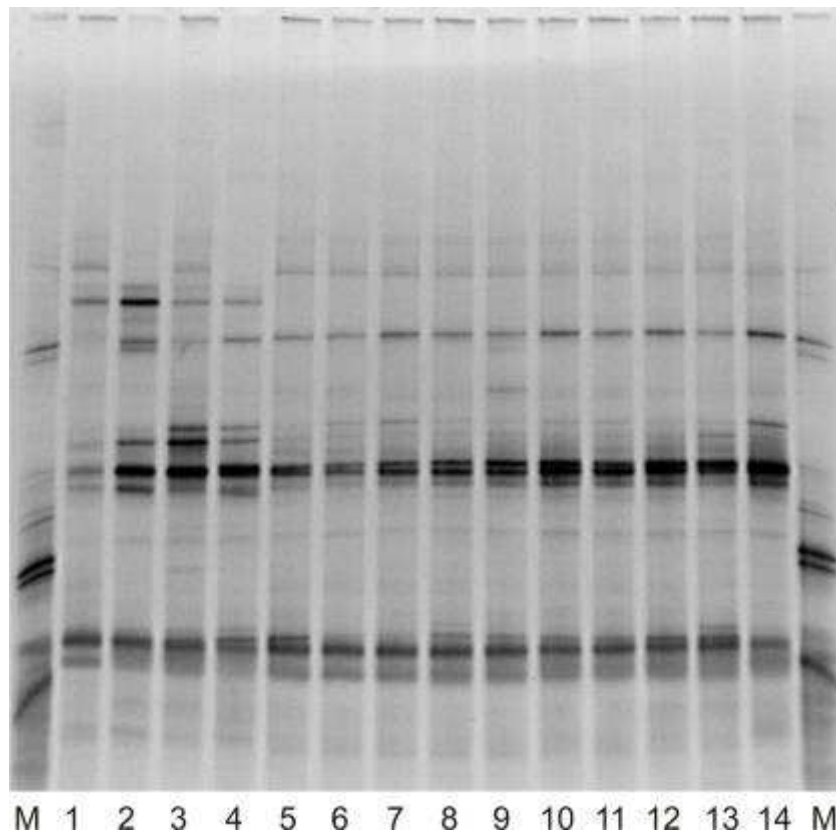


Figura 12 – Perfis eletroforéticos de DDGE baseado em fragmentos de rDNA 26S da comunidade de levedura associada a grãos de café (*Coffea arabica* L) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural. M = marcadores e linhas 1-14 = dias de secagem.

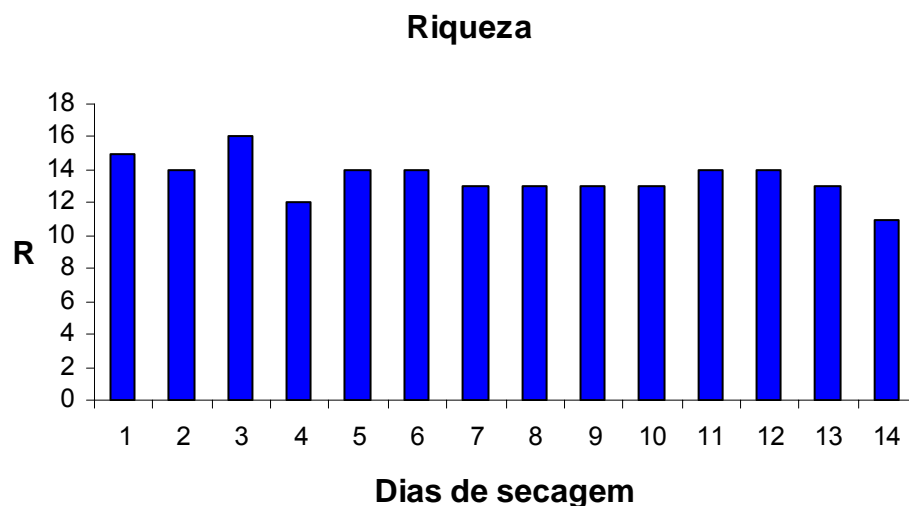


Figura 13 – Riqueza (R) da comunidade de levedura da comunidade de levedura associada a grãos de café (*Coffea arabica* L) despulpados, cultivar Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido de cimento.

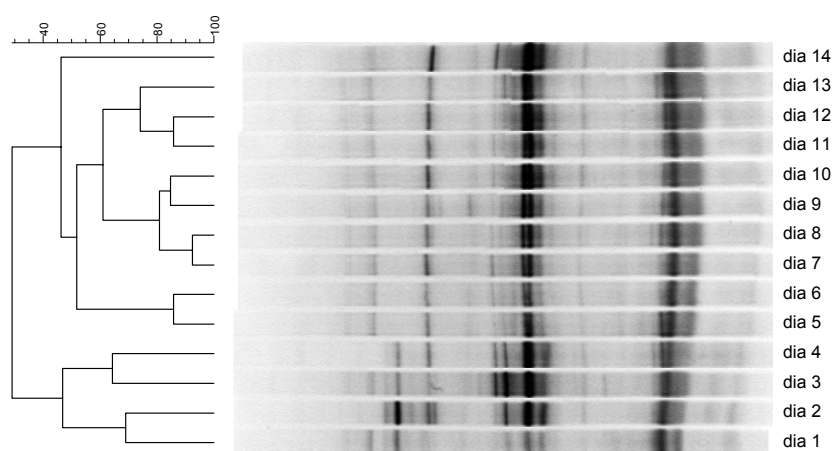


Figura 14 – Perfis eletroforéticos de DDGE e a comparação estatística dos perfis de DGGE da comunidade de levedura associada a grãos de café despulpados, Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural. Dias de amostragem são indicados. Escala (40-100) indica o nível de similaridade.

Tabela 9 - Matriz de similaridade com base nos perfis de DGGE de rDNA 26S da comunidade de levedura associada a grãos de café despolidos, Bourbon Vermelho, coletados durante a seca natural em terreiro revestido de cimento.

Dias	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
14	100													
13	58,33	100												
12	56,01	81,49	100											
11	64	66,67	85,72	100										
10	41,67	61,54	81,49	74,08	100									
9	33,33	53,85	59,26	74,08	84,62	100								
8	41,67	38,47	51,85	74,08	84,62	84,62	100							
7	50	30,77	59,26	74,08	76,93	76,93	92,31	100						
6	40	37,04	50	50	66,67	66,67	44,45	81,49	100					
5	32,01	29,63	42,86	57,15	44,45	51,85	44,45	59,26	85,72	100				
4	26,09	40	30,77	30,77	32,01	24	16	16	15,39	38,47	100			
3	37,04	41,38	40	40	41,38	20,69	20,69	27,59	26,67	26,67	64,29	100		
2	32,01	29,63	35,72	28,57	37,04	29,63	14,82	14,82	14,29	14,29	46,15	53,33	100	
1	23,08	35,72	41,38	27,59	42,86	28,57	28,57	28,57	34,49	27,59	29,63	58,07	68,97	100

5 CONCLUSÕES

As populações de leveduras epifíticas e endofíticas associadas aos frutos de café apresentam variado perfil genotípico e as densidades não apresentam uma relação clara entre as diferentes cultivares e altitudes.

A comunidade de leveduras em frutos de café está composta basicamente de organismos dos gêneros *Candida/Pichia*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Meira* e *Sporobolomyces*.

As leveduras identificadas como pertencentes aos gêneros *Candida* e *Pichia*, com base na análise das seqüências de rDNA 26S, são pela primeira vez relatadas como endofíticas em frutos de café.

Na biblioteca de rDNAs 26S de endofíticos foram identificados 4 gêneros de fungos filamentosos que, pela análise das seqüências, corresponderam a *Mycosphaerella*, *Glomerella*, *Microdiplodia* e *Phaeophaeria*. Além destes, outras seqüências corresponderam a fungos potencialmente endofíticos ainda não identificados.

A DGGE da sucessão de leveduras associadas aos grãos de *C. arabica* durante os 14 dias do período de secagem natural revelou UTOs dominantes já nos 4 primeiros dias. Esta análise demonstrou que o perfil de UTOs da comunidade é alterado a cada dois dias, até o 12º dia de secagem.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café: Estatísticas - Indicadores da Indústria. Disponível em: <http://www.abic.com.br/estatisticas.html>. Acesso em 12 de maio de 2009.

AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Applied Microbiology**. v.14, p.256-260, 1966.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; , W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410. 1990.

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

ALVES, H. A. **Análise da variabilidade espacial da qualidade do café cereja produzido em região de montanha**. Viçosa, 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

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

ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. Piracicaba, 2002. 65p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

AVALLONE, S., GUYOT, B., BRILLOUET, J-M., OLGUIN, E., GUIRAUD, J-P. Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. **Current Microbiology**, v.42, p.252-256. 2001.

AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Technology**. v.37, p.191-198, 2002.

AVIS, T.J. & BELANGER, R.R. Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. **FEMS Yeast Research** v.2, p. 5-8, 2002.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal Food Microbiology**, v.85, p.293-300. 2003.

BEGEROW, D.; STOLL, M.; BAUER, R. A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. **Mycologia**. v.98, p. 906–916, 2006.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HOUBRAKEN, J.; ROBERT, V.; SCORZETTI, G.; GAFNI, A.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Novel anamorphic mite-associated fungi belonging to the Ustilaginomycetes: *Meira geulakonigii* gen. nov., sp. nov., *Meira argovae* sp. nov. and *Acaromyces ingoldii* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1655-1664, 2003.

BOTHA, A.; KOCK, J. L. F. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. v.19, p. 39-51, 1993.

BUENAVENTURA, C.; CASTAÑO, J. Influencia de la altitud en la calidad de la bebida de muestras de café procedente del ecotipo 206B en Colombia. **Cenicafé**, v. 53, p. 119-131, 2002.

BUYER, J. Improved fast gas chromatography por FAME analysis of bacteria. **Journal of Microbiological Methods** v.54, p. 117-120, 2003.

CAMATTI-SHARTORI, V.; DA SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**. V.45, p.397-402, 2005.

CAO, L. X.; YOU, J. L.; ZHOU, S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.18, p. 169 – 171, 2002.

COCOLIN, L.; AGGIO, D.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. **International Dairy Journal**. v.12, p. 407-411, 2002.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p. 81-87, 2000.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the 16S rRNA Gene V1 Region to Monitor Dynamic Changes in the Bacterial Population during Fermentation of Italian Sausages. **Applied and Environmental Microbiology**. V.67, p. 5113-5121, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Levantamento de café 2007/2008. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>. Acesso em 22 de janeiro de 2007.

CORDERO, A. F. P. **Diversidade de bactérias endofíticas em frutos de café**. Viçosa, 2008. 78p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

COSTA, L; CHAGAS, S. R. J. Gourments – Uma alternativa para o mercado de café. **Informe Agropecuário**. v.18, p. 63-67, 1997.

ENCARNAÇÃO, R. O.; LIMA, D. R. Café & Saúde Humana. Brasília, DF. (EMBRAPA - Documentos 1). p.64, 2005.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul. Rio Grande do Sul. 510p. 2004.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. **OIKOS**, v.98, p. 25-36, 2002.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELLTALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading**. v. 50, p. 1351-71, 2000.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p. 11 – 22, 2003.

FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BORGES, M. L. A.; VITORINO, M. D. Evolução da composição do extrato aquoso de café durante o processo de torrefação. **Revista Brasileira de Armazenamento**. (ESPECIAL) v.2, p. 37-47, 2001.

FUNGARO, M.H.P., VISSOTTO, P.C., SHARTORI, D., VILAS-BOAS, L.A., FURLANETO, M.C., TANIWAKI, M.H. A Molecular Method for Detection of *Aspergillus carbonarius* in Coffee Beans. **Current Microbiology**. v.49, p. 123-127, 2004.

GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J. C.; PERRIOT, J.; GIRON, J.; VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafes arabica. **Plantations Recherche Développement**, v. 3, p. 272-283, 1996.

HALLMANN, J.;QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 895-914, 1997.

JANSSENS, L.; DePOOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process in Biochemistry**. v.27, p. 195-215, 1992.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p. 3676-3683, 1997.

KAHMANN, R. & KÄMPER, J. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. **New Phytologist**. v.164, p. 31–42, 2004.

KRUG, H. P. Cafés duros. **Revista do Instituto do café**, São Paulo, v.26, p. 636-638, 1940a.

KRUG, H. P. Cafés duros: II – Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto do café**, São Paulo, v.27, p. 393-1396, 1940b.

KURTZMAN C.P. & FELL J. W. The yeast: a taxonomic study. 4th Ed. Elsevier Science New York, 1998.

KURTZMAN, C. P. & ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.73, p. 331-371, 1998.

LANDELL, M. F.; MAUTONE, J. N.; VALENTE, P. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã Park, Viamão – RS. **Biociências**, v.14, p.144-149, 2006.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Imprensa. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 13 de dezembro de 2006.

MASOUD, W.; CESAR, L.; JESPERSEN L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, v.21, p. 549-556, 2004.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**. v.110, p. 291-296, 2006.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts invold in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Tecnology**. v.106, p. 229-234, 2006.

MASOUD, W.; POLI, L.; JAKOBSEN, M. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Yeast**, v.22, p. 1133-1142, 2005.

MOLNÁR, O. & PRILLINGER, H. *Cryptococcus zaeae*, a new yeast species associated with *Zea mays*. **Microbiological Research**, v.161, p. 347-354, 2006.

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

MUYZER, G., DE WALL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, p. 695-700, 1993.

NASSAR, A. H. & EL-TARABILY, K. A. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**. v.42, p. 97–108, 2005.

NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Yeast**. v.22, p. 271–284, 2005.

PARDO, E.; MARIN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of Ochratoxigenic fungi and ochratoxin a in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**. v.10, p. 45-50, 2004.

PASTER, N., DROBY, S.; CHALUTZ, E. Evolution of the potencial of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of the stores Soya beans. **Mycological**. v.10, p.1201-1206. 1993.

PAZ, Z.; BURDMAN, S.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p. 2570 – 2579, 2007.

PEIXOTO NETO, P.A. de S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. de. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.29, p. 62-77, 2002.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; SCHMIDT, S.; LÜTTICHEN, R.; HAASE, G. Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the Microbial Identification System (MIS) for *Candida (Torulopsis) glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.38, p. 213-221, 2000.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; VEJA, F. E.; HOLGUI'N, F.; MACÍAS, J.; VALLE, J.; NIETO, G.; PETERSON, S.W.; KURTZMAN, C.P.; O'DONNELL, K. Mycobiota associated with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. **Mycological Research**. v.107, p. 879–887, 2003.

PETRACCO, M. Our everyday cup of coffee: The Chemistry behind its magic. **Journal of Chemical Education**, v.82, p. 1161-1167, 2005.

PIEPENBRING, M. Smut fungi (Ustilaginomycetes P.P. and Microbotryales, Basidiomycota). **Flora Neotropica** 86: 1-291. 2003.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Editora UFLA - LAVRAS, 304p. 2003.

PRAKICHAIWATTANA, C.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**. v4, p. 865-877, 2004.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p. 1-7, 1985.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p. 169–180, 2003.

RUIVO, C. C. C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da Mata Atlântica, Parque Estadual de Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, São Paulo**. 80 f. 2005. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.29, p. 319-343, 1998.

SAITON, N.; NEI, M. The neighbor method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v.4, p. 4006-425, 1987.

SAKIYAMA, C. C. H. **Bactérias endofíticas em *Coffea arabica* L.: incidência e colonização**. Tese (Doutorado). Viçosa: UFV, 2001. 72p. Universidade Federal de Viçosa.

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**. v.33, p. 117-121, 2001

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, p.125 – 128, 1989.

SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, R.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brasil. **Microbiology**. v.27, p. 33-40, 1996.

SANTOS, T. M.A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação (Mestrado). Viçosa: UFV, 2008. 112 p.

SCHWAN, R.F. E WHEALS, A.E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout, T. e Robert, V. (eds) **Yeasts in Food – beneficial and detrimental aspects**. Behr's Verlag, Hamburg, p. 429-444, 2003.

SIEZEN, R. J. Wine genomics. **Microbial Biotechnology**, v.1, p. 97-103, 2008.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p. 251-260, 2000.

SILVA, C.F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L.M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**. v.25, p.951–957, 2008.

SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**. v18, p. 21-26. 1997.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599. 2007.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**. v.82, p. 173-179, 2003.

UNTERSEHER, M.; ALMUT REIHER, A.; KNUT FINSTERMEIER, K.; PETER OTTO, P.; MORAWETZ, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. **Mycological Progress**. v.6, p. 201–212, 2007.

VALLAEYS, T., TOPP, E., MUYZER, G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, v.24, p. 279-285. 1997.

van PEE, W. & CASTELEIN, J. The yeast flora of fermenting robusta coffee. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v.36, p. 308-310, 1971.

VEGAS, F. E.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; GIANFAGNA, T. J.; CHAVES, F. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, v.98, p. 31-42, 2006.

WILLIANSO, M.A. & FOKKEMA, N.J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from appressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **European Journal of Plant Pathology**. v.91 p. 265-276, 1985.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.20, p. 265–272, 2004.

YAMADA, C. M. **Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de café**. Dissertação (Mestrado), Viçosa. UFV. 1999. 56p.

YASUDA, F.; YAMAGISHI, D.; IZAWA, H.; KODAMA, M.; OTANI, H. Fruit stain of Japanese pear caused by basidiomycetous, yeast-like fungi *Meira geulakonigii* and *Pseudozyma aphidis*. **Japanese Journal of Phytopathology**. v. 73, p. 166-171, 2007.

ZHAO, J. H.; BAI, F. Y.; GUO, L. D.; JIA, J. H. *Rhodotorula pinicola* sp nov., a basidiomycetous yeast species isolated from xylem of pine twigs. **FEMS yeast research**. v.2, p. 159-163, 2002.