



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEANDRO PIO DE SOUSA

AVALIAÇÃO GENÔMICA DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS COM O
CAFEEIRO

CAMPINAS

2016

LEANDRO PIO DE SOUSA

AVALIAÇÃO GENÔMICA DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS COM O CAFEIEIRO

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO LEANDRO PIO DE SOUSA E ORIENTADA PELO PROF. DR JORGE MAURICIO COSTA MONDEGO.

Orientador: JORGE MAURICIO COSTA MONDEGO

CAMPINAS

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So85a Sousa, Leandro Pio de, 1989-
Avaliação genômica da associação de bactérias com o cafeeiro / Leandro Pio de Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Jorge Maurício Costa Mondego.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Comunidades bacterianas. 2. Café. 3. Manganês. 4. *Pseudomonas*. I. Mondego, Jorge Maurício Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genomic evaluation of bacteria association with coffee plants

Palavras-chave em inglês:

Bacterial communities

Coffee

Manganese

Pseudomonas

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Jorge Maurício Costa Mondego [Orientador]

Itamar Soares de Melo

Valéria Maia Merzel

Data de defesa: 29-03-2016

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de março de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego

Prof.(a). Dr.(a) Valéria Maia Merzel

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais pela confiança e carinho despendidos estes anos todos.

Também, e principalmente, agradecer ao Dr. Jorge Mondego pela oportunidade dada a mim.

Igualmente importante, devo agradecer ao Dr. Márcio José da Silva pela chance que me deu de começar a trabalhar no seu laboratório.

Outros agradecimentos importantes devem ser feitos para a Dra. Sueli Freitas e seu aluno de doutorado Matheus Cipriano, pelo auxílio no isolamento das bactérias aqui estudadas, para a Dra. Mônica Abreu, pelo auxílio na medição de minerais nas folhas e para o Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle pelo auxílio na montagem dos genomas.

Agradeço também a Capes pela bolsa concedida a mim e a FAPESP pelo projeto aprovado.

Resumo

A cada ano o estudo de bactérias associadas às plantas tem ganhado força, principalmente visando à utilização destes organismos como promotores de crescimento vegetal. As pesquisas dessa área com ênfase no cafeeiro vêm crescendo, mas pouco se sabe sobre as comunidades bacterianas associadas às folhas. O presente trabalho buscou entender a complexidade destas comunidades em dois níveis: o de populações nas folhas de *Coffea arabica* 'Catuaí' e 'Obatã' e *Coffea canephora* em quatro tempos distintos no ano e de genômica comparativa de *Pseudomonas* spp encontradas na rizosfera, na raiz e na folha de *Coffea arabica* 'Catuaí'. O que se viu foi uma significativa diferença entre as comunidades bacterianas nos cafeeiros. De maneira geral o inverno foi o período em que as comunidades se mostraram menos diversas, aumentando a diversidade à medida que se aproximava a primavera e o verão. Fato curioso se deu com Catuaí que pouco mudou ao longo do ano, tendo *Bacillales* como ordem predominante, enquanto *Pseudomonadales* predominou em Obatã e *Enterobacteriales* predominou em Canephora. Além disso, sugerimos a correlação entre as ordens encontradas e minerais presentes nas folhas, principalmente entre *Pseudomonadales* e manganês em Catuaí, seguida de *Enterobacteriales* e cálcio em Canephora. Ao analisarmos o genoma de três linhagens de *Pseudomonas* spp isoladas da rizosfera, raiz e folha de *Coffea arabica* 'Catuaí', apesar de guardarem bastante semelhança entre si, com cerca de 60% dos seus genes sendo altamente similares, foram observadas certas adaptações das mesmas para cada ambiente de onde foram isoladas. Pelos dados genômicos é possível sugerir que a bactéria de rizosfera possui um arsenal de substâncias antimicrobianas que lhe servem de vantagem na competição por recursos, uma vez que a rizosfera é um ambiente bastante rico e passível de intensa competição. A bactéria de raiz possui mais genes relacionados com a interação planta-bactéria, provavelmente para burlar os mecanismos de defesa vegetal. E por fim a bactéria de folha parece apta a lidar com intenso estresse abiótico como alta radiação, flutuações grandes de temperatura e baixa disponibilidade de água, características marcantes da superfície foliar.

Palavras-chave: Comunidade bacteriana, café, manganês, *Pseudomonas* spp

Abstract

The study of bacteria associated with plants has gained strength, mainly targeting the use of these organisms as plant growth promoters. Research in this area with a focus on coffee has been growing, but little is known about the bacterial communities associated with leaves. This study sought to understand the complexity of these communities on two levels: the populations in leaves of *Coffea arabica* Catuaí 'and' Obatã 'and *Coffea canephora* in four different times in the year, and comparative genomics across *Pseudomonas* species found in rhizosphere, root and leaf of *Coffea arabica* 'Catuaí'. Significant difference between coffee's bacterial communities was detected. Generally, winter was the period which communities proved to be somewhat different, increasing diversity was observed as it approached spring and summer. Curiously, Catuaí bacterial community has changed little over the year, having *Bacillales* as prevailing order; while *Pseudomonadales* prevailed in Obatã and *Enterobacteriales* prevailed in Canephora. Furthermore, a positive correlation between orders and minerals found in the leaves was suggested, mainly *Pseudomonadales* and manganese in Catuaí, and *Enterobacteriales* and calcium in Canephora. When analyzing the genome of the three isolated *Pseudomonas*, despite the high level of similarities among them, with about 60% of their genes being highly similar, we found some adaptations to the environment they were isolated from. Based on genomic data it is possible to suggest that rhizosphere bacteria produce an arsenal of antimicrobial substances that provide advantage in the competition for resources, since the rhizosphere is a very rich environment and therefore subjected to intense competition. The root bacteria showed more genes related to plant-bacterium interaction, probably to evade the plant defense mechanisms. Finally, leaf bacteria seems to be able to cope with intense abiotic stress as high radiation, large temperature fluctuations and low water availability, striking features of the leaf surface.

Keywords: Bacterial community, coffee, manganese, *Pseudomonas* spp

Lista de Tabelas

Abordagem “A”

Tabela 1. Medição de macro e micronutrientes nas folhas dos cafeeiros nos quatro períodos de amostragem (CATUAI 1, 2, 3 e 4; OBATÃ 1, 2, 3 e 4; CANEPHORA1, 2, 3 e 4).**33**

Tabela 2: Dados de temperatura mínima (MinT), média (MedT), máxima (MaxT) e pluviosidade na semana antes da coleta**34**

Tabela 3: Análise PERMANOVA mostrando associação entre dados ambientais e os fatores cultivar e estação (data de coleta)**35**

Tabela 4: Dados de abundância de OTUs associadas a famílias bacterianas identificadas nas folhas dos três genótipos de cafeeiro **36**

Tabela 5: Análise PERMANOVA mostrando associação entre dados biológicos e os fatores cultivar e estação (data de coleta)**38**

Tabela 6: Análise de Distance-based linear model (DistLM) correlacionado variáveis ambientais com os dados de abundância de ordem bacterianas**39**

Abordagem “B”

Tabela 1: Dados globais das montagens das bactérias MNR3A, MN1F e EMN2 **46**

Tabela 2. Lista das sequencias de inserção encontrados nos genomas de MN1F e EMN2 (em MNR3A não foram encontradas nenhuma) com a família as quais pertencem, a possível origem, o tamanho em pares de base e o número de cópias**52**

Tabela 3. Lista com genes atuantes mais importantes no estresse oxidativo nos três isolados. As três últimas colunas dizem respeito ao número de cópias de cada gene nos respectivos genomas **55**

Tabela 4. Lista com genes atuantes mais importantes no estresse osmótico nos três isolados. As três últimas colunas dizem respeito ao número de cópias de cada gene nos respectivos genomas **56**

Tabela 5. Lista de genes induzidos por choque térmico. Destacam-se as Cold shock proteins com nove representantes.....**57**

Tabela 6. Genes responsáveis pela homeostase de cobre e que são fundamentais para uma maior tolerância ao metal **58**

Tabela 7. Genes responsáveis pela tolerância ao arsênio **59**

Tabela 8. Genes responsáveis pela tolerância a outros metais pesados como cobalto, zinco e cádmio.....**60**

Tabela 9. Genes de resistência a multidrogas encontrados nos isolados **64**

Tabela 10. Sistemas de secreção e seus respectivos genes presentes em a) MN1F b) EMN2 c) MNR3A. Cada gene aparenta possuir apenas uma cópia em cada genoma.....**65**

Tabela 11. Genes da via de quebra do ácido cinâmico em MN1F **70**

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1. Tamanho do pan-genoma vs número de genomas de *Streptococcus agalactiae* sequenciados. Mesmo sequenciando um grande número de genomas, a quantidade de novos genes cresce exponencialmente. Dados retirados do NCBI GeneBank em janeiro de 2015 **19**

Abordagem “A”

Figura 1. Gel com a PCR do DNA total de folhas dos três cafeeiros visando amplificar diferencialmente o 16S rRNA das plantas e da comunidade bacteriana. A seta vermelha indica o 16S rRNA do cafeeiro. As setas azuis indicam o 16S rRNA das comunidades bacterianas. Ladder de 1 kb**29**

Figura 2. Curvas de rarefação de a) *C. arabica* Catuaí, b) *C. arabica* Obatã e c) *C. canephora*. No eixo y está o número de OTUs novas encontradas e no eixo x o número de sequências analisadas. As quatro cores dizem respeito às quatro coletas feitas em dias distintos..... **30**

Figura 3. Distribuição de sequências (eixo y) correspondentes às ordens prevalentes nos três cafeeiros em quatro coletas (eixo x). a) Biblioteca de Catuaí b) Biblioteca de Obatã c) Biblioteca de Canephora.....**31**

Figura 4. Índice de diversidade de Shannon (eixo y) em relação às datas de coletas (eixo x) nos três cafeeiros (Losango azul: *Coffea arabica* ‘Catuaí’, quadrado vermelho: *Coffea arabica* ‘Obatã’ e triangulo *Coffea canephora*).....**32**

Figura 5: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados ambientais e as datas de coleta (‘season’). Os dados ambientais foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação.....**34**

Figura 6: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados ambientais e os cultivares. Os dados ambientais foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação **35**

Figura 7: Plot nMDS indicando a correlação entre dados biológicos e os cultivares. Os dados biológicos foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação..... **37**

Figura 8: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados biológicos e os cultivares**37**

Figura 9: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados biológicos e os cultivares**38**

Figura 10. *Distance-based linear models* (DistLM) análise como modelo ajustado visualizado através de ‘distance-based redundancy analysis’ constrained ordination (dbRDA) biplot de amostras biológicas e parâmetros ambientais. A) Variáveis biológicas foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação. B) Variáveis ambientais foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim

de visualizar a correlação. Note a proximidade dos vetores *Pseudomonales* (A) e Mn (B), e *Enterobacteriales* (A) e Ca (B)..... 40

Abordagem “B”

Figura 1. Filogenia utilizando o método UPGMA montada com as sequencias de ITS amplificadas dos isoladas. Percebe-se que os isolados conseguidos neste trabalho pertencem ao grupo da *Pseudomonas* sendo que MNR3B e EMN2B aproximam-se mais de *P. stutzeri* e *P. mendocina* enquanto o restante assemelha-se a *P. putida* 45

Figura 2. Análise ANI entre as bactérias MNR3A (a), MN1F (b) e EMN2 (c) com *P. putida* GB-1. Médias e medianas de identidade acima do valor de 95% indicam que as bactérias são da mesma espécie 47

Figura 3. Análise ANI entre as bactérias MNR3A vs MN1F (a), MNR3A vs EMN2 (b) e MN1F vs EMN2 (c). Médias e medianas de identidade acima do valor de 95% indicam que as bactérias são da mesma espécie..... 48

Figura 4. Conteúdo gênico das bactérias MNR3A, EMN2 e MN1F. Diagrama de Venn mostrando a distribuição de genes classificados como presentes nas três bactérias...49

Figura 5. Análise ontológica dos genes das bactérias MNR3A, EMN2 e MN1F realizada pelo programa RAST..... 50

Figura 6. Sintonia comparativa mostrando a relação entre os genomas de a) MN1F b) EMN2 e c) MNR3A (linha acima) e o de *Pseudomonas* GB-1 (linha abaixo) 51

Figura 7. Diagrama KEGG com a via de transformação do benzoato em acetil-CoA (em verde com as setas laranjas). A via começa com o benzoato sendo transformado em catecol, depois em cis-muconato, muconolactona, 3-oxoadipato-enol-lactona, 3-oxoadipato, 3-oxoadipil-CoA e finalmente acetil-CoA que entrará no ciclo de Krebs 54

Figura 8. a) Gene do receptor da aerobactina (em vermelho) presente em várias *Pseudomonas* e com duas cópias em EMN2. b) Gene do receptor de acromobactina (em vermelho) mais raro no gênero (ausente em *P. aeruginosa*)..... 62

Figura 9. Cluster para produção de colicina V. 4 em azul escuro) tRNA pseudouridina sintase A. 5 em amarelo) Acetil-coenzima A carboxil transferase beta chain. 3 em laranja) Dihidrolfolato sintase. 10 em azul claro) DedD protein. 1 em vermelho) Colicina V production protein..... 63

Figura 10. Fragmento do KEGG Map da síntese de IAA (Indoleacetate) dependente de triptofano comum a MN1F, EMN2 e MNR3A. As setas e os círculos em laranja indicam o caminho da reação e os produtos destas respectivamente..... 68

Figura 11. Fragmento do KEGG Map da ação negativa da enzima ACC deaminase na produção de etileno vegetal..... 69

Figura 12. Via de degradação do ácido cinâmico encontrada em MN1F. As setas em laranja indicam o caminho percorrido pelo ácido cinâmico para ser degradado em acetil-CoA..... 71

Sumário

Introdução	14
O cafeeiro	14
Sobre bactérias e plantas	15
Rizosfera	15
Endosfera	16
Ambiente foliar	16
Flores, frutos e sementes	17
<i>Pseudomonas</i>	17
Pan-genoma	18
Genômica comparativa de <i>Pseudomonas</i>	20
Justificativa	22
Objetivos	23
Material e métodos	24
Abordagem “A”	
Coleta de material foliar	24
Extração de DNA e montagem de bibliotecas de 16S rRNA	24
Classificação taxonômica/análise das OTUs, comparações entre as bibliotecas e cálculo do índice de diversidade	25
Medição de nutrientes nas folhas	25
Análise estatística.....	25
Abordagem “B”	
Isolamento e identificação das bactérias	26
Cultivo de <i>Pseudomonas</i> e extração de DNA para sequenciamento.....	26
Construção de biblioteca e sequenciamento	27
Distância entre genomas	27
Montagem e pré-anotação dos genomas	27
Análise funcional e comparativa dos genomas	28
Resultados Abordagem A	
Extração de DNA, PCR, montagem de bibliotecas e sequenciamento.....	29
Análise das bibliotecas, índice de diversidade e correlações ambientais	31
Medição de minerais nas folhas e correlação entre eles, dados meteorológicos e a comunidade bacteriana	32

Discussão

A comunidade bacteriana de Arábica varia pouco ao longo do tempo enquanto a de Canephora e Obatã mostram-se bastante dinâmicas.....	41
Cálcio e manganês tem maior importância na comunidade bacteriana	41
Conclusões da abordagem “A”	44
Resultados Abordagem “B”.	
Isolamento e sequenciamento	45
Estrutura geral dos genomas	49
Elementos móveis	51
Degradação de compostos orgânicos e aromáticos.....	52
Resposta a estresse oxidativo, osmótico e de temperatura.....	54
<i>Estresse oxidativo</i>	54
<i>Estresse osmótico</i>	55
<i>Estresse térmico</i>	56
Tolerância a metais pesados	57
Aquisição de ferro.....	61
Antibióticos, bacteriocinas e defesa contra microrganismos competidores	63
Interação planta/bactéria	64
<i>Mobilidade e fixação</i>	64
<i>Sistemas de secreção</i>	65
<i>Ácido indolacético (IAA)</i>	68
<i>ACC deaminase</i>	69
<i>Degradação de ácido cinâmico</i>	70
<i>Degradação de salicilato</i>	71
Conclusões da abordagem “B”	72
Conclusões gerais	73
Perspectivas.....	74
Bibliografia.....	75
Anexos.....	89

Introdução

O cafeeiro

O café é uma das bebidas com maior consumo no mundo, o que o leva a ser umas das dez mais valorizadas *commodities* do mercado. A cadeia produtiva da cafeicultura tem enorme impacto sócio-econômico, movimentando cerca de 90 bilhões de dólares por ano e envolvendo por volta de 500 milhões de pessoas no mundo, entre produtores, trabalhadores rurais, comerciantes e beneficiadores do café (DaMatta e Ramalho, 2006). No Brasil a cultura do café tem importância histórica, sendo cultivado desde o século XVIII, e hoje o país ocupa um lugar de destaque no mercado, sendo o maior produtor (contribui com 30% da produção) e um dos maiores consumidores do mundo, gerando quase US\$ 6 bilhões em exportações e 8 milhões de empregos diretos. Os maiores produtores do país são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná (ABIC 2015).

O cafeeiro é uma planta pertencente à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea* cujo centro de origem se localiza no leste africano, provavelmente na Etiópia (Lashermes *et al.*, 1999). Apesar de serem descritas mais de 100 espécies desse gênero, somente *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são efetivamente cultivadas e comercializadas. *C. arabica* é uma planta alelotetraplóide autógama, fruto de um cruzamento recente entre *C. canephora*, ou espécies aparentadas, e *C. eugenioides* ocorrido há 46,000–665,000 mil anos (Anthony *et al.* 2001). Tal autogamia leva a uma base genética estreita, agravada pelo fato de que grande parte dos cafés plantados hoje em dia tem como populações base somente duas variedades, Typica e Bourbon (Mondego *et al.*, 2011). De clima subtropical, Arábica é susceptível a várias doenças como ferrugem do café (causado pelo fungo *Hemileia vastatrix*), mancha do olho pardo (causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*), mancha de Phoma (causado por *Phoma* spp.) e também é atacada pelo inseto lepidóptero minador conhecido como “bicho-mineiro” (*Leucoptera coffeella*). Por outro lado, seus grãos dão origem a uma bebida de melhor qualidade comparada com a advinda de *C. canephora* e muito valorizada no mercado externo. O fato de que o café Arábica é o mais valorizado, mas possui baixa resistência a patógenos (quando comparado com *C. canephora*), provavelmente pela sua baixa diversidade genética, gera demanda para a busca de soluções quanto ao combate de organismos agressores e no aprimoramento de outras características agronômicas como o vigor de crescimento (Fazuoli *et al.*, 2008).

Sobre bactérias e plantas

Bactérias são ubíquas no planeta Terra, habitando quase toda sua extensão (Fredrickson *et al.*, 2004). Mesmo nós, humanos, somos substratos para o crescimento destes microrganismos (Hooper e Gordon 2001). Não seria difícil supor que, tendo tamanha habilidade para colonizar quase qualquer ambiente, as bactérias também explorariam as plantas como hospedeiras. De fato, elas não só as colonizaram como também estabeleceram relações complexas de comensalismo, protocoperação e antagonismo (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2004). Até o momento, em toda espécie estudada encontrou-se grande quantidade de bactérias, e não só no solo associado às raízes (rizosfera), mas também nos tecidos internos dos vegetais e mesmo em suas superfícies, notadamente as folhas, flores, frutos e sementes (Santoyo *et al.*, 2016). Obviamente em cada um destes locais espera-se encontrar organismos adaptados às diferentes intempéries presentes e é o que será explorado a seguir.

Rizosfera

Definida como a região do solo a qual é influenciada pelas raízes, a rizosfera é de longe o ambiente vegetal mais estudado até o momento (Haney *et al.*, 2015). Durante o crescimento do sistema radicular, as bactérias aderem-se nas superfícies das células, aproveitando exsudatos que por ventura possam ser disponibilizados durante o processo (Lugtenberg 2015). Por isso pode-se dizer que é o ambiente mais rico em recursos, o que aumenta o número de organismos possíveis colonizadores e por consequência aumenta a competição (Haney *et al.*, 2015). Fatores como pH do solo, granulometria, disponibilidade de nutrientes e umidade influenciam no desenvolvimento destas comunidades (Haney *et al.*, 2015). Por estar em contato direto com um dos pontos mais intensos de crescimento da planta, o microbioma exerce sobre ela influência considerável, não só do ponto de vista do crescimento *per se* (através da produção de hormônios, notadamente auxinas e ácido salicílico), mas também no que diz respeito à imunidade vegetal, combatendo diretamente possíveis patógenos (preponderantemente através de competição por nutrientes e espaço) e agindo como estimuladores do sistema imune do seu hospedeiro (Haney *et al.*, 2015). Diante disso, organismos rizosféricos têm sido bastante estudados visando aproveitar estas características (Lugtenberg 2015). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Serratia* são alguns dos gêneros bacterianos mais encontrados em rizosfera (Workneh e Van Bruggen 1994, Lovell *et al.*, 2000, Marilley *et al.*, 1998).

Endosfera

Trata-se da região que compreende os tecidos internos da planta. Possui grande quantidade de nutrientes, assim como a rizosfera, porém com a vantagem de ser um ambiente mais estável já que tal estabilidade é condição básica para a homeostase vegetal (Lodewyckx *et al.*, 2002). Ao contrário da rizosfera, a endosfera é de difícil colonização e permanência uma vez que a planta normalmente “enxerga” estes organismos como possíveis invasores e passíveis de combate (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2004). Por isso, as bactérias que habitam este ambiente ou desenvolvem uma série de estratégias para burlar o sistema de defesa vegetal, agindo assim de modo semelhante a um patógeno ou na falta destes supõem-se que tenha havido uma evolução no sentido de cooperação mútua como ocorre com endófitos obrigatórios ou mesmo nos rizóbios (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2004). No entanto, diferente dos patógenos, os endofíticos mostram-se como grandes promotores de crescimento assim como os rizosféricos; os mecanismos de promoção de crescimento são inclusive parecidos (Lodewyckx *et al.*, 2002). *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* e *Acinetobacter* são alguns dos gêneros bacterianos mais encontrados nesse ambiente (Bell *et al.*, 1995, Araújo *et al.*, 2002, Mendes *et al.*, 2007).

Filosfera

O ambiente foliar compreende a superfície foliar, chamada de filosfera, e o espaço interno, este fazendo parte da endosfera (Lindow e Brandl 2003). De modo geral carece de nutrientes a não ser os que são exsudados pela planta através dos estômatos ou mesmo algum ferimento que faça extravasar o conteúdo intracelular (Lindow e Brandl 2003). Além disso, a água não é abundante e, dependendo da época do ano e do local, é bastante escassa inclusive (Lindow e Brandl 2003). Somando-se a isso, por estar diretamente em contato com a atmosfera, a folha recebe grandes doses de radiação UV e correntes de ar que dificultariam ainda mais o estabelecimento de qualquer microrganismo (Kadivar e Stapleton 2003). Considera-se que esse ambiente possui baixa diversidade bacteriana (Bringel e Coué 2015; Bulgarelli *et al.*, 2013). Para se estabelecerem, as comunidades filosféricas desenvolveram uma série de estratégias, dentre elas a produção de exopolissacarídeos (EPS) para fixação e estabelecimento de um biofilme, produção de antioxidantes que evitam efeitos deletérios da radiação (principalmente carotenos), proteínas tolerantes ao ressecamento, produção de compostos antibacterianos e antifúngicos para competir por espaço e nutrientes, etc (Lindow e Brandl 2003, Vorholt 2012). *Methylobacterium*,

Pseudomonas, *Sphingomonas* são comumente os gêneros encontrados nesse ambiente (Vorholt 2012).

Flores, frutos e sementes

Como consequência da colonização das folhas, os tecidos reprodutivos das plantas também abrigam microrganismos (Gross *et al.*, 1983). Ao contrário dos ambientes supramencionados, flores, frutos e sementes são pouco estudados, só recentemente ganhando certa atenção (Glassner *et al.*, 2015). *Bacillus* é o gênero preponderante nesse nicho (Glassner *et al.*, 2015). O que se viu é, assim como no ambiente folha, uma pequena concentração de bactérias, geralmente com um grupo amplamente dominante que costuma ter a capacidade de se adaptar a efemeridade do ambiente a qual ocupa, bem como se espalhar como o vento através de endósporos (Glassner *et al.*, 2015).

Pseudomonas

Como visto anteriormente, há uma lista bastante extensa de gêneros bacterianos que colonizam as plantas. Porém o que se vê é a notável presença do gênero *Pseudomonas*. De fato, em vários estudos utilizando tanto técnicas independentes (Araújo *et al.*, 2002) ou dependentes de cultivo (Mendes *et al.*, 2007), esse grupo bacteriano é encontrado em menor ou maior nível. Tal distribuição pode significar uma estreita relação entre bactérias e plantas e possíveis efeitos benéficos para ambas, o que já foi extensamente demonstrado (Miller *et al.*, 2008). O gênero bacteriano *Pseudomonas* compreende um conjunto bastante diverso de microrganismos que podem ser isolados de diversos ambientes, tais como água doce e salgada, solo, interior das plantas, alimentos e outros (Clarke 1982). Pertencentes à classe das *Gammaproteobacterias*, as *Pseudomonas* compreendem 191 espécies diferentes até então descritas, sendo as mais estudadas *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas syringae*. Dentro deste grupo destacam-se as *Pseudomonas* do grupo fluorescente, espécies conhecidas por liberarem fluorescência quando atingidas por luz UV, fato resultante da presença de moléculas conhecidas como pioverdinas (Nelson *et al.*, 2002). Normalmente habitam o solo e a rizosfera (Patten e Glick 2002), porém também são encontradas nos tecidos internos das plantas bem como na superfície foliar (Vega *et al.*, 2005). Tal diversidade de nichos relacionados com as plantas pode refletir o fato documentado de que *Pseudomonas* fluorescentes trazem vários benefícios para a saúde do seu hospedeiro (Patten e Glick, 2002). Estes benefícios podem ser explicados pela produção de auxinas e sideróforos, que melhoram o desenvolvimento vegetal, diretamente conferindo um ganho significativo na produção ou conferindo uma

proteção maior contra possíveis patógenos (Patten e Glick, 2002). Desse modo, estas bactérias são preferidas para o desenvolvimento de biofertilizantes para a agricultura (Patten e Glick, 2002).

Pan-genoma

O advento de tecnologias de sequenciamento em larga escala como Illumina (www.illumina.com), Roche-454 Life Science (www.roche-applied-science.com) e ABI SOLiD (www.appliedbiosystems.com) tem permitido projetos que visam acessar o genoma de inúmeras espécies microbianas, principalmente organismos com interesse médico e ambiental (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>). A possibilidade de sequenciar vários genomas em pouco tempo, abriu a oportunidade de compará-los entre si, tanto entre espécies distintas como entre cepas de uma mesma espécie. Apesar dos bancos de dados possuírem centenas de genomas microbianos completos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), na maioria das vezes apenas uma ou duas cepas de cada espécie tem seu genoma depositado (Medini *et al.*, 2005). A genômica comparativa tem revelado enorme diversidade intra-específica, algo que os microbiologistas têm observado ao longo dos anos já que é comum cepas de uma determinada espécie mostrarem fenótipos radicalmente diferentes (Medini *et al.*, 2005). O primeiro trabalho com esta abordagem foi feito por Tettelin *et al.*, (2005) onde analisaram oito genomas de *Streptococcus agalactiae*, um comensal encontrado no trato gastrointestinal humano. A ideia inicial era verificar com quantas amostras seria possível montar um genoma representativo da espécie. O trabalho mostrou que analisando 2713 genes, 1806 genes são compartilhados por todas as cepas (esse conjunto formaria o genoma representativo que definiria uma espécie), 439 não são encontrados em uma ou mais cepas e 468 são únicos e não compartilhados, que juntos seriam responsáveis pela diversidade intraespecífica. Tendo em vista estes dados, uma projeção matemática mostrou que esse conjunto de genes únicos continuaria a emergir mesmo sequenciando centenas de milhares de cepas diferentes (Figura 1).

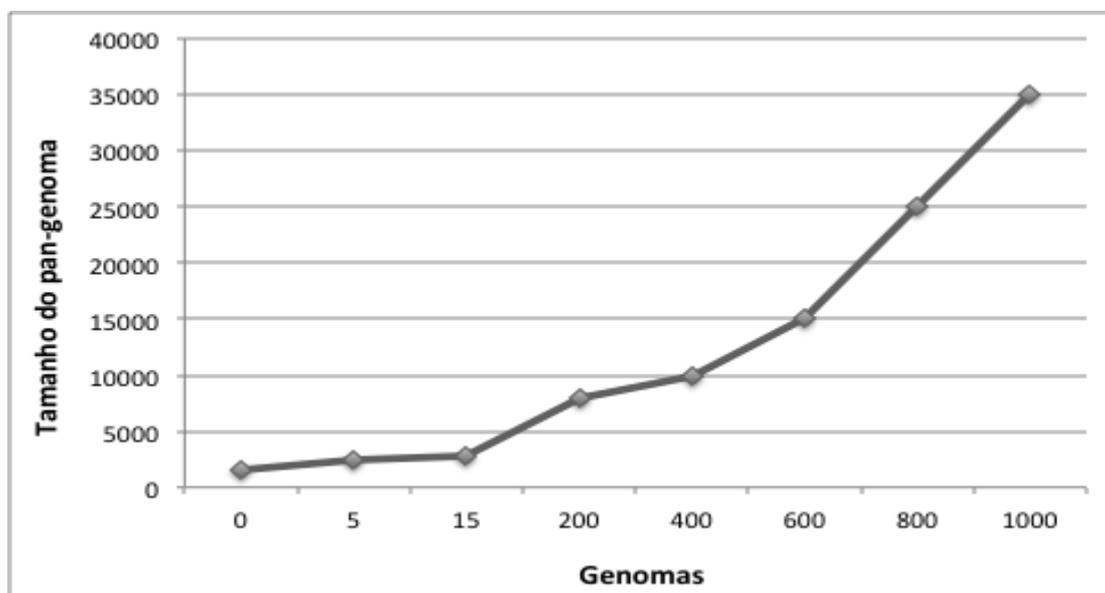


Figura 1. Tamanho do pan-genoma vs número de genomas de *Streptococcus agalactiae* sequenciados. Mesmo sequenciando um grande número de genomas, a quantidade de novos genes cresce exponencialmente. Dados retirados do NCBI GeneBank em janeiro de 2015

A conclusão chegada é que, teoricamente, algumas espécies bacterianas nunca serão plenamente descritas porque sempre haverá um conjunto de genes novos a serem adicionados mesmo aumentando incrivelmente a amostragem de genomas sequenciados. Neste cenário, os autores definiram o conceito de pan-genoma ou supragenoma como a soma de todos os genomas disponíveis de uma determinada espécie os quais são compostos de genes ‘espécie específicos’ e ‘cepa-específicos’, estes relacionados a características não essenciais para seu estilo de vida, conferindo habilidades como resistência a antibióticos e capacidade de colonizar determinados hospedeiros. No caso do *Streptococcus*, projeta-se que 27 genes são em média adicionados ao conjunto de genes específicos a cada novo genoma sequenciado; assim diz-se que *Streptococcus* tem pan-genoma ‘aberto’, ou seja, sempre veremos novos genes serem adicionados. Interessante notar que outras espécies mostram comportamento bastante diferente. No caso de *Bacillus anthracis*, por exemplo, com quatro genomas sequenciados, a projeção de novos genes chegou a quase zero, então se infere que tal espécie teria um pan-genoma ‘fechado’ porque com poucas cepas já podemos definir uma espécie (Tettelin *et al.*, 2005). O trabalho de Tettelin *et al.*, (2005) abriu uma frente bastante promissora na genômica comparativa microbiana. Viu-se que cada espécie possui um genoma representativo, chamado de ‘core genome’ que contém um conjunto de genes responsáveis pelas características básicas da espécie e que definem o fenótipo padrão, e genes facultativos que controlam características não essenciais ao funcionamento celular principalmente conferindo vantagens adaptativas em determinado ambiente. O caráter ‘dispensável’ desses

genes pode deixá-los propensos a serem deletados, apesar de tal perda poder acarretar problemas, por exemplo, na virulência de patógenos e na sua capacidade de colonizar o hospedeiro (Dobrindt *et al.*, 2004).

A quantidade desses genes não é constante entre as espécies, variando bastante conforme o tipo de pan-genoma apresentado. Um pan-genoma aberto é típico de espécies que colonizam grande quantidade de ambientes e possuem um sistema múltiplo de troca de material genético. Neste grupo enquadram-se *Streptococci*, *Meningococci*, *H. pylori*, *Salmonellae* e *E. coli*. Diferentemente *B. anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Chlamydia trachomatis* tem grande dificuldade de trocar material genético, além de possuírem um genoma compartilhado maior; assim podemos classificar esses microrganismos como possuidores de um pan-genoma fechado. Já os endosimbiontes que são altamente exigentes quanto ao seu nicho, mostram um caso extremo onde a estabilidade genômica é muito grande e por consequência a taxa de mudança no material genético é extremamente baixa, deste modo seu pan-genoma não traz grandes novidades (Medini *et al.*, 2005).

Genômica comparativa de *Pseudomonas*

Como mencionado anteriormente, *Pseudomonas* é um grupo fisiologicamente bastante diverso e por consequência, seus genomas são alvos de vários estudos principalmente em investigações quanto sua habilidade de lidar com xenobióticos, de colonizar plantas e promover crescimento nas mesmas, seja via produção de hormônios, seja na supressão de patógenos (Rodriguez e Pfender 1997, Naseby *et al.*, 2001, Haas e Defago 2005). Dada a importância destas bactérias e seu papel na saúde das plantas, ao longo dos anos várias cepas, principalmente de *Pseudomonas fluorescens*, tiveram seus genomas sequenciados (Paulsen *et al.*, 2005). Os sequenciamentos revelaram vários genes expressos quando em contato com a planta, genes estes responsáveis pelo aporte de nutrientes, produção de hormônios e controle de patógenos, além dos responsáveis pelo processo de colonização da raiz. Apesar disso, a real diversidade da espécie ainda não tinha sido verificada até que Silby *et al.*, (2009) montaram o 'pan-genoma' de três cepas isoladas do solo e da superfície foliar (*Pseudomonas fluorescens* Pfo-1, SBW25 e Pf-5). O trabalho mostrou que as amostras compartilhavam apenas 61,4% dos genes, abundante família de sequências repetitivas de DNA e grande quantidade de genes cepa-específicos. Para fins de comparação, *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea* (PsG), um conhecido patógeno de plantas, tem por volta de 90% do genoma conservado (Qi *et al.*, 2011), número muito maior que o de *Pseudomonas fluorescens*. Discute-se que provavelmente a habilidade maior de adaptar-se a diversos ambientes colabora para um pan-genoma mais aberto em *P.*

fluorescens do que em PsG. Interessante notar que em PsG a diversidade intraespecífica reside em genes provindos de transferência horizontal, principalmente genes de virulência, então neste caso a mudança na composição genética destes genomas de PsG teria como principal força motriz a aquisição de novos genes via plasmídeos. PsG e *P. fluorescens* assim, mesmo pertencendo ao mesmo gênero, tem estratégias evolutivas completamente diferentes onde *fluorescens* busca uma maior plasticidade adaptativas refletida no seu genoma altamente diverso e aberto, enquanto PsG tem um genoma mais fechado e padrão, arriscando a aquisição de genes plasmidiais importantes num determinado nicho. (Qi *et al.*, 2011)

No caso de *Pseudomonas putida*, outra *Pseudomonas* fluorescente de grande importância, Wu *et al.*, (2011) realizaram uma análise comparativa entre os genomas de quatro isolados provindos de ambientes como riacho contaminado (F-1; Choi *et al.*, 2003), água doce não contaminada (GB-1; Okazaki *et al.*, 1997), rizosfera (KT2440; Nakazawa 2002) e de dentro da raiz (endofítico; W619; Taghavi *et al.*, 2009). O trabalho mostrou uma clara adaptação ao meio em que os isolados foram conseguidos. As bactérias isoladas de ambientes contaminados possuíam ilhas gênicas especializadas no processamento dos xenobióticos e na minimização dos seus danos colaterais. Nos isolados de plantas, foram encontrados inúmeros genes responsáveis por motilidade, aderência a superfícies, além de produção de hormônios vegetais como auxinas e ácido salicílico, passando por compostos antifúngicos como os sideróforos. Neste caso, vemos uma especialização dos genomas para que o microrganismo possa estabelecer um relacionamento positivo com o hospedeiro vegetal. É justamente este bom relacionamento com a planta que pode ser aproveitado na agricultura prevendo um ganho de produção na lavoura quando a semente é inoculada com esse microrganismo.

Justificativa

Durante a anotação do banco de dados de ESTs de café para o projeto genoma do café (Brazilian Coffee Genome Project; BCGP) verificou-se que *C. arabica* continha grande quantidade de sequências de bactérias 'contaminantes' (dados não publicados), e que o gênero *Pseudomonas* tinha prevalência em comparação com outras bactérias também detectadas (Mondego *et al.*, 2011). Anteriormente, em outros trabalhos, também se tinha verificado a grande quantidade destas bactérias isoladas a partir do cafeeiro, principalmente da folha (Vega *et al.*, 2005). Uma vez que o gênero bacteriano, que é conhecido promotor de crescimento em planta, parecia abundar, buscou-se verificar a autenticidade dos dados, respondendo as seguintes questões: Existem essas bactérias e estão em que quantidade? Quais bactérias são essas e como são genomicamente?

Objetivos

O objetivo geral foi estudar a composição da comunidade bacteriana no cafeeiro, tendo como foco principal a superfície foliar.

Duas abordagens foram seguidas:

A - Estudo da diversidade bacteriana nas folhas de três variedades de cafeeiro ao longo do tempo

Buscou-se verificar quais bactérias ocorriam nas folhas e se haviam diferenças entre as comunidades nas três variedades de cafeeiro (*Coffea arabica* 'Catuai' e 'Obatã' e *Coffea canephora*) ao longo de um ano de análise. Utilizamos a técnica baseada na amplificação de uma região do gene 16S rRNA, seguida de clonagem, sequenciamento e análise das OTUs. Concomitantemente, foi feita uma análise do conteúdo de nutrientes minerais na folha e uma correlação entre esses dados fisiológicos da planta e a abundância de ordens bacterianas nos três genótipos analisados em quatro coletas sazonais ao longo de um ano.

Diante disso sentiu-se a necessidade de trabalhar também em um nível mais genômico de algumas destas bactérias encontradas, agora não mais das folhas mas também das raízes e rizosfera:

B - Genômica comparativa de espécies de *Pseudomonas* spp isoladas de rizosfera, raiz e folha de *Coffea arabica*

Com as linhagens de *Pseudomonas* spp isoladas de plantas de café, buscou-se estudar se as diferenças de nichos dos isolados refletiam em diferenças entre seus genomas. Para tal, os genomas de isolados de rizosfera, endosfera de raiz e superfície foliar (filosfera) foram sequenciados e comparados, e uma anotação funcional foi realizada.

Material e métodos

Abordagem “A”.

Coleta de material foliar

Três diferentes genótipos de *Coffea* foram analisados, um de *C. canephora* e dois de *C. arabica*: *Coffea canephora* cv. Guarini IAC 447-1, *Coffea arabica* Catuaí Amarelo IAC 62 e *C. arabica* Obatã IAC 1669-20. As folhas foram coletadas na Fazenda Santa Elisa, Fazenda experimental do Instituto Agronômico de Campinas (IAC, Campinas, Brasil; 22°5'47" S/ 47°5' 6" W, 664 m). As amostras foram coletadas em quatro diferentes tempos ao longo dos anos de 2013 e 2014 seguindo a fenologia dos cafeeiros: 11 de junho 2013 (período pós-colheita e início do repouso), 26 de setembro de 2013 (florescimento), 17 de janeiro de 2014 (começo da frutificação) e 13 de abril de 2014 (fruto maduro). A colheita foi feita entre 9:30 e 10:00 da manhã com exceção da coleta de janeiro que foi feita entre 10:30 e 11:00 (horário de verão). Para cada genótipo e cada tempo, 54 folhas jovens num total de 9 plantas foram coletadas. Vinte e sete folhas (3 três de cada planta) foram imediatamente congeladas e estocadas em nitrogênio líquido para extração de DNA. As 27 folhas restantes (3 de cada planta) foram separadas em três triplicatas de 9 folhas e armazenadas em 4 °C por no máximo dois dias até a medição de nutrientes. As folhas foram indiscriminadamente coletadas de ramos ortotrópicos e plagiotrópicos nas áreas sombreadas e não sombreadas da planta. Dados de precipitação e temperatura também foram coletados durante a semana anterior às coletas. O solo das áreas de coleta é do tipo oxissol argiloso (latossolo vermelho).

Extração de DNA e montagem de bibliotecas de 16S rRNA

DNA das folhas foi extraído utilizando o reagente Concert® kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segundo as especificações do fabricante. Amplificação via PCR do 16S rRNA do DNA total foliar foi realizado com os primers 799f/1492r (799f 5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3' / 1492r 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') de acordo com Chelius e Triplett (2001). Depois da eletroforese, duas bandas de DNA foram visualizadas: uma de 875 pb representando os fragmentos de 18S mitocondrial da planta, enquanto a outra de 750 pb consiste no 16S bacteriano que foi purificada e utilizada na biblioteca de 16S rRNA, construída de acordo com Chelius e Triplett 2001. A diversidade foi investigada pela análise da curva de rarefação calculada usando o programa FastGroupII de acordo com Yu *et al.*, 2011. Todas as sequências foram clusterizadas em operational taxonomic units (OTUs), usando o programa Mothur (version v.1.29.2) de acordo com Tielas *et al.*, (2011) com um cutoff de 97%. Estas

OTUs foram comparadas com sequências do GenBank através do BLASTn. As sequências dos nucleotídeos foram depositadas no GenBank (nº KC839477-KC839479).

Classificação taxonômica/análise das OTUs, comparações entre as bibliotecas e cálculo do índice de diversidade

Tendo a listagem de OTUs para cada amostra, usou-se o sítio Ribosomal Database Project (RDP II, <http://rdp.cme.msu.edu/>) para a classificação taxonômica das mesmas. A comparação entre as bibliotecas foi feita utilizando a ferramenta Library Compare do RDP II. O índice de diversidade de Shannon foi calculado utilizando o programa FastGroupII de acordo com as especificações de Yu *et al.*, (2006).

Medição de nutrientes nas folhas

As folhas foram cuidadosamente lavadas para limpeza superficial e secas à 60°C. Aproximadamente 1g de cada amostra foi digerida em ácido nítrico e ácido perclórico (2:1). As amostras foram então analisadas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES; Jobin Yvon, JY50P Longjumeau, France) para medição dos seguintes elementos: P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn, e B. O experimento foi realizado no laboratório de análises de solos do IAC em colaboração com a Dra Mônica Abreu.

Análise estatística

A comunidade microbiana e os dados ambientais foram comparados entre os genótipos de cafeeiro (cultivares) e as datas de coleta (estações) usando o software Primer v7 (versão 7.0.13) da PRIMER-E Ltd. (USA). Dados biológicos (abundância da comunidade microbiana) foram transformados em raiz quadrada e a similaridade de Bray-Curtis foi aplicada na matriz de semelhança. Dados ambientais (nutrientes minerais, temperatura e precipitação) foram transformados em $\log(x+1)$ e normalizados para a construção de uma matriz de semelhança baseada em distância euclidiana. Ordenações *Nonmetric multidimensional scalling* (nMDS) e *Principal coordinate analysis* (PCO) foram feitas. A ordenação *Canonical Analysis of Principal Coordinates* (CAP) foi realizada a fim de maximizar a separação entre grupos predefinidos. *Permutational multivariate analysis of variance* (PERMANOVA) foi aplicada para testar as diferenças entre as amostras. A relação entre a abundância da comunidade bacteriana e os dados ambientais foi investigada utilizando o procedimento *Distance-based linear model* (DISTLM) do PERMANOVA+.

Abordagem “B”.

Isolamento e identificação das *Pseudomonas* spp

Com o auxílio do grupo da Dra. Sueli Fretas do IAC, realizou-se o isolamento *Pseudomonas* spp de rizosfera, raiz e filosfera mediante a seguinte metodologia: solo rizosférico, raiz e folhas de plantas de um ano de *C. arabica* (cv. Catuaí Amarelo IAC 62) coletadas na Fazenda Santa Elisa, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, Campinas, Brasil, 22°53 'S / 47°5' W, 664 m), foram embebidas em tampão MgSO₄.7H₂O 10mM e agitadas (3000 rpm) durante quinze minutos. Para o isolamento de endofíticos as raízes foram esterilizadas superficialmente primeiro com uma lavagem de dois minutos com álcool 70%, depois uma lavagem com hipoclorito de sódio 0,9% por dois minutos e posterior lavagem com água MilliQ esterilizada para retirar os resíduos. Esta água final foi plaqueada em meio LB para verificar se a esterilização ocorreu de modo satisfatório. Assim, após este processo, as raízes foram maceradas no mesmo tampão usado anteriormente. O lavado e o macerado resultante foram usados para a série de diluição em placas de Petri contendo Meio B de King (King *et al.*, 1954). As placas foram então postas incubadora a 28°C e o crescimento de colônias individuais fluorescentes características de *Pseudomonas* spp foram monitoradas em até 48 horas após o plaqueamento. As bactérias de rizosfera receberam o prefixo MNR, as de raiz receberam o prefixo EMN e as de filosfera receberam o prefixo MNF. Foram conseguidos cinco isolados distintos identificados através do sequenciamento de um ITS anteriormente descrito, específico para *Pseudomonas* spp, segundo Locatelli *et al.*, (2002).

Cultivo de *Pseudomonas* e extração de DNA para sequenciamento

Escolheram-se três isolados: um de rizosfera (MNR3A), um de raiz (EMN2) e um superfície foliar (MN1F). Estes foram plaqueadas em meio B de King sólido a 30° C *overnight* para a coleta de uma única colônia. A colônia escolhida foi novamente plaqueada no mesmo meio B de King líquido a 30° C *overnight* 120 rpm. Centrifugou-se o meio à 12000g por 3 minutos para se obter um sedimento que seguiu para a extração de DNA com reagente Trizol® (Life Technologies Corporation) conforme as especificações do fabricante. O DNA extraído sofreu eletroforese em gel de agarose 1,5% TAE 1X para verificar sua integridade. A concentração das amostras de DNA foi medida utilizando o Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Construção de biblioteca e sequenciamento

Os genomas foram sequenciados usando a plataforma MiSeq (Illumina) alocada no Centro de Ciências Genômicas da Universidade da Carolina do Norte (*University of North Carolina High Throughput Sequencing Facility*), sob colaboração e supervisão do Dr. Piotr Mieczowski. A partir dos DNAs fragmentados em 300 pb, foram produzidas bibliotecas *paired-end* (PE) para determinar a orientação e posição relativa dos *contigs* produzidos pelo sequenciamento. As bibliotecas foram produzidas usando os kits *TruSeq sample preparation* (Illumina).

Distância entre genomas

O cálculo que estima a identidade média de nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity ANI*) entre dois genomas foi feito usando-se tanto o método de melhor identidade (*Best hits, one-way ANI*) assim como o método de melhores identidades recíprocas (*reciprocal best-hits, two-way ANI*) como demonstrados por Goris *et al.*, (2007) no site <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani>. Dois genomas com valores ANI maiores que 95% denotam serem da mesma espécie.

Montagem e pré-anotação dos genomas

A montagem dos *reads* foi feita com o montador Velvet (Zerbino e Birney, 2008) com o auxílio do Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle (LGE, UNICAMP). Usou-se a ferramenta NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>) para anotar automaticamente os genomas. A predição de genes foi feita combinando GeneMark e Glimmer (Borodovsky *et al.*, 1993; Lukashin *et al.*, 1998; Delcher *et al.*, 2007). Para detectar genes, uma tradução em seis matrizes de leitura (*frames*) das sequências dos genomas foi executada. Todas as predições gênicas foram lançadas no programa BLAST contra proteínas de genomas microbianos completos. Anotação de termos de ontologia de genes (GO) foi executada usando o programa Gene Ontology (GO) (Conesa *et al.*, 2005). As anotações foram complementadas através de buscas por domínios conservados usando RPS-BLAST no banco de dados CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). Rotas metabólicas foram preditas através de buscas no banco de dados KEGG (Ogata *et al.*, 1999). Procurou-se RNAs ribossomais verificando similaridade com o banco de dados usando o BLAST. RNAs transportadores foram encontrados pelo software tRNAscan-SE (Lowe e Eddy, 1997). Elementos móveis foram encontrados utilizando o software ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/>) de acordo com Siguier *et al.*, (2006) e os profagos foram encontrados utilizando o software PHAST (Phage Search Tool) de acordo com Zhou *et al.*, (2011). O diagrama de sintenia foi feito utilizando a ferramenta Conserved Synteny LinePlot do software MaGe

(<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>) comparando os três genomas entre eles e com *Pseudomonas putida* GB-1.

Análise funcional e comparativa dos genomas

A anotação funcional e comparativa foi realizada utilizando o programa RAST de acordo com as especificações dos desenvolvedores (Aziz *et al.*, 2008). Os mapas metabólicos foram construídos com ajuda do KEGG (Kanehisa e Goto 2000). A possível produção de metabólitos secundários foi verificada mediante uso do software antiSMASH 2.0 segundo Blin *et al.*, 2013.

Abordagem “A”: Estudo da diversidade bacteriana nas folhas de três variedades de cafeeiro ao longo do tempo

Resultados

Extração de DNA, PCR, montagem de bibliotecas e sequenciamento

DNA de todas as amostras foi extraído com sucesso para posterior utilização. A PCR foi feita com os primers supracitados (799f/1492r) esperando-se que aparecessem nos géis duas bandas: a de 875 pb correspondente ao gene rRNA 16S mitocondrial da planta e uma de 750 pb correspondente ao gene rRNA 16S das bactérias propriamente ditas (Chelius e Triplett, 2001). No entanto o que se observou foi a formação de somente uma banda nas amostras de Catuaí e Obatã e duas na de Canephora (Figura 1).

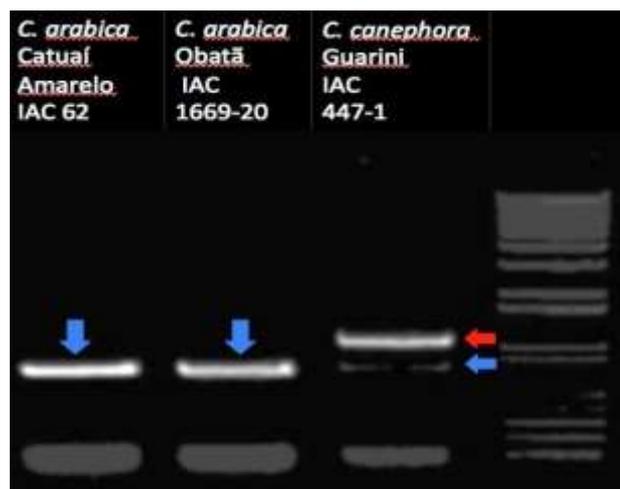
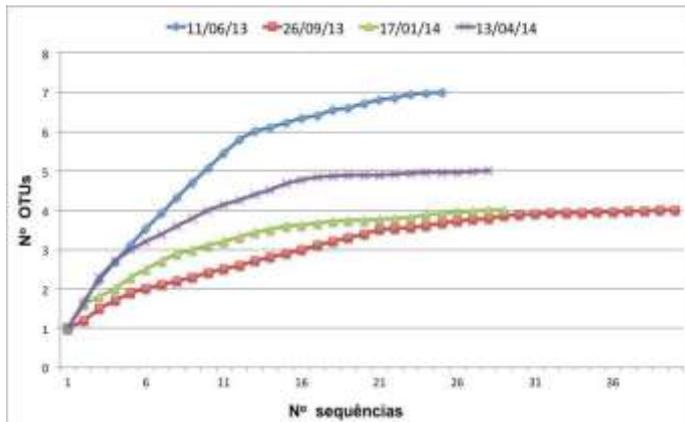


Figura 1. Gel com a PCR do DNA total de folhas dos três cafeeiros visando amplificar diferencialmente o 16S rRNA das plantas e da comunidade bacteriana. A seta vermelha indica o 16S rRNA do cafeeiro. As setas azuis indicam o 16S rRNA das comunidades bacterianas. Ladder de 1 kb.

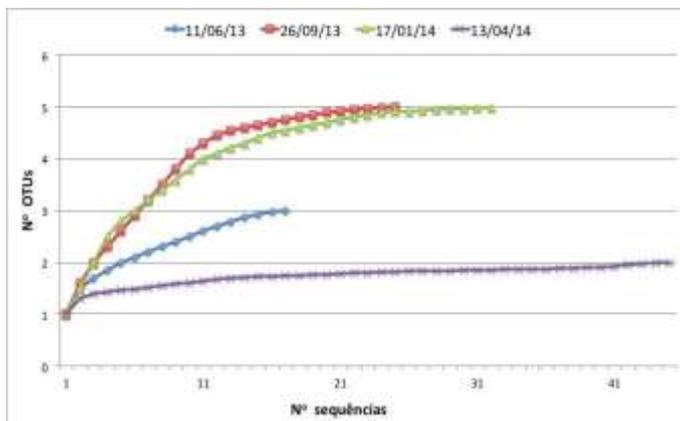
O resultado pode ser explicado pelo fato de que os primers utilizados foram desenhados originalmente para arroz e neste caso em função da diferença no número de nucleotídeos entre o gene rRNA 16S da mitocôndria vegetal e das bactérias, havia visualmente uma clara separação. No caso de Catuaí e Obatã foi verificado que os primers não anelavam nos seus rRNA 16S (essa verificação foi feita utilizando a ferramenta Primer-BLAST do NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) o que explica o não aparecimento de uma das bandas de amplificação no gel desses dois cafeeiros. Já em Canephora, o anelamento ocorre perfeitamente, por isso vemos duas bandas, uma mais fraca representando o 16S rRNA das bactérias e a mais forte representando o 16 rRNA das células vegetais. Havendo esta separação, foi possível

excisar as bandas de interesse, coletando o amplificado para posterior montagem das bibliotecas. Essa operação foi feita com todas as amostras. A montagem das bibliotecas foi feita com o sistema de clonagem pGEM-T, tendo um índice de aproveitamento de 85% em média por biblioteca. Já o sequenciamento dos clones foi feito aos poucos pelo método de Sanger tradicional conforme a curva de rarefação foi sendo estabilizada (Figura 2). O número mínimo de clones variou entre 20 e 40 dependendo da quantidade de novas OTUs que surgiam.

a)



b)



c)

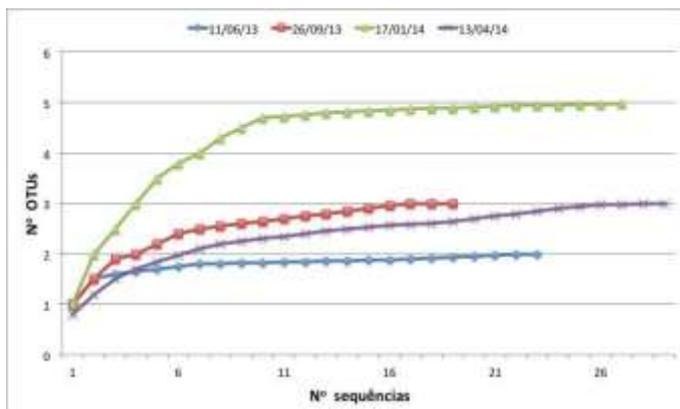
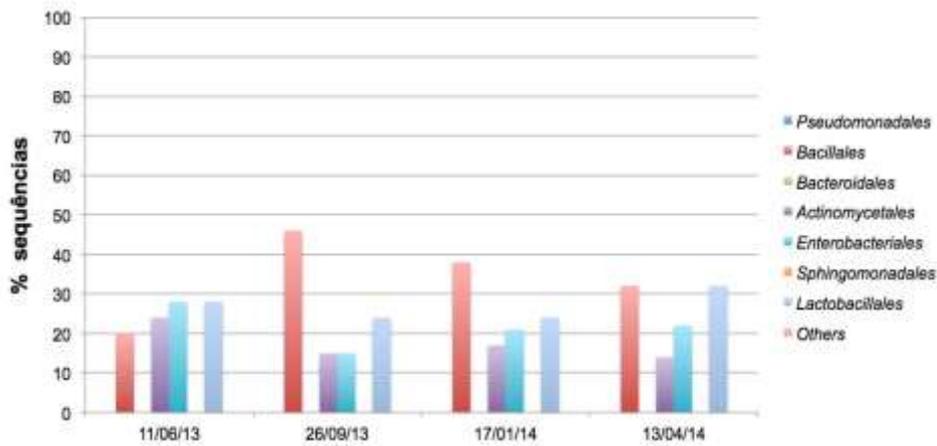


Figura 2. Curvas de rarefação de a) *C. arabica* Catuaí, b) *C. arabica* Obatã e c) *C. canephora*. No eixo y está o número de OTUs novas encontradas e no eixo x o número de sequências analisadas. As quatro cores dizem respeito às quatro coletas feitas em dias distintos.

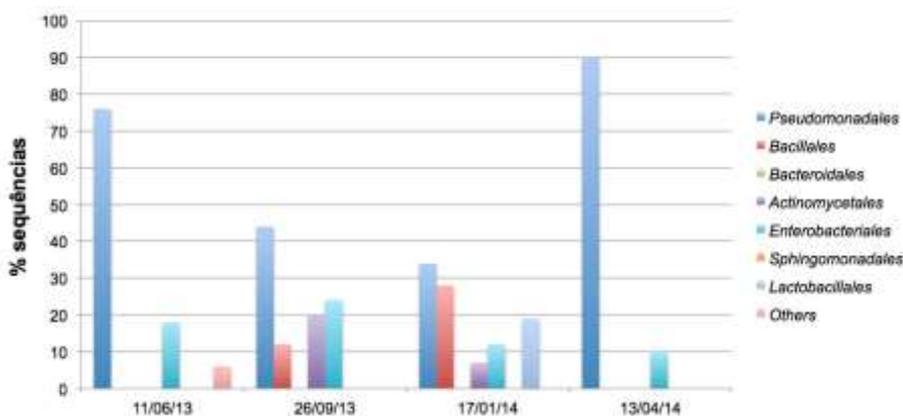
Análise das bibliotecas, índice de diversidade e correlações ambientais

Uma vez que nem todas as OTUs geradas eram plenamente identificadas pelo RDP em nível de Espécie ou Família, visando uniformizá-las, decidiu-se que todas seriam agrupadas até Ordem como mostrado na figura 3.

a)



b)



c)

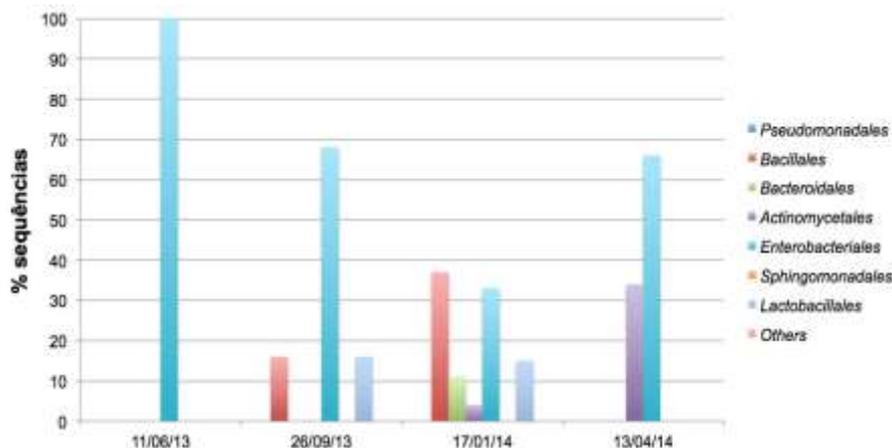


Figura 3. Distribuição de seqüências (eixo y) correspondentes às ordens prevalentes nos três cafeeiros em quatro coletas (eixo x). a) Biblioteca de Catuaí b) Biblioteca de Obatã c) Biblioteca de Canephora.

Também se calculou o índice de Shannon para verificar se havia alguma diferença de diversidade dentro da mesma variedade de cafeeiro e se ela variava no

tempo (Figura 4). Vê-se que para Obatã e Canephora na primeira amostra (11/06/2013) que corresponde ao período mais seco do ano, o índice mostra-se muito baixo e a medida que passamos pela primavera e o verão o índice sobe, chegando ao seu ápice em janeiro. Depois, já em abril, no outono, o índice volta a cair já que a estação seca aproxima-se. A diversidade de Catuaí, no entanto, mostra-se surpreendentemente indiferente quanto à variação sazonal, variando seu índice entre 1,3 e 1,5.

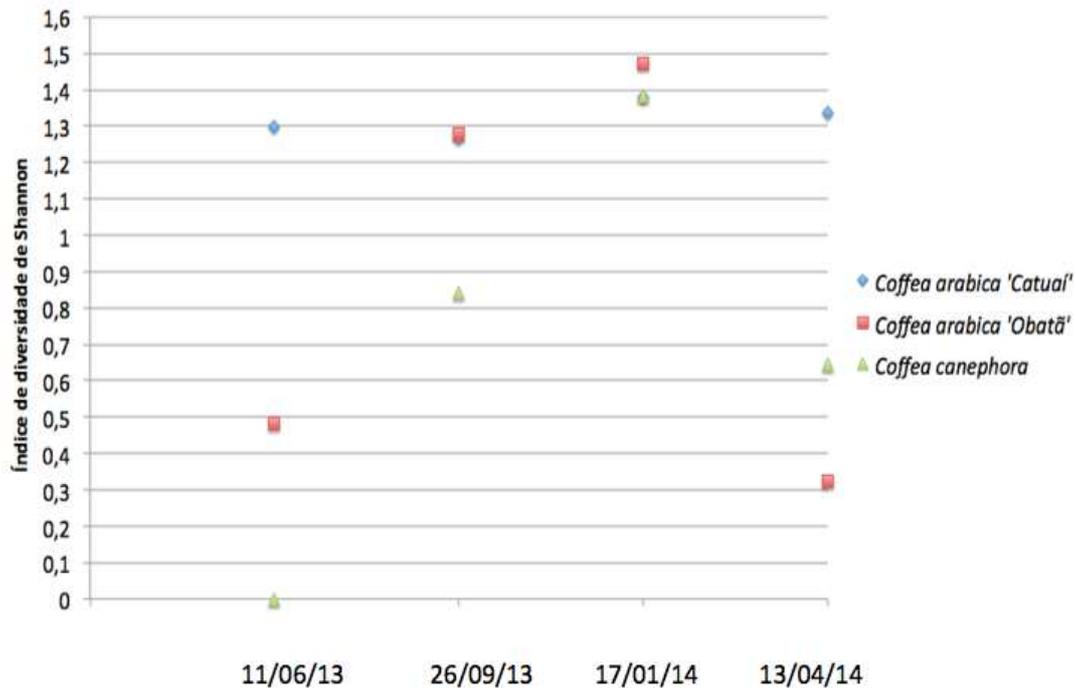


Figura 4. Índice de diversidade de Shannon (eixo y) em relação às datas de coletas (eixo x) nos três cafeeiros (Losango azul: *Coffea arabica* 'Catuaí', quadrado vermelho: *Coffea arabica* 'Obatã' e triângulo *Coffea canephora*)

Medição de minerais nas folhas e correlação entre eles, dados meteorológicos e a comunidade bacteriana

Avaliou-se se macro (P e K) e micronutrientes (Mg, Ca, Mn, S, B, Fe, Zn e Cu) presentes nas folhas poderiam modular a comunidade bacteriana associada às folhas dos cafeeiros (Tabela 1). Os minerais foram determinados por ICP-OES, e utilizados como parâmetros ambientais, juntamente com a temperatura máxima, média e mínima bem como pluviosidade na semana que antecedeu a coleta (Tabela 2).

Tabela 1. Medição de macro e micronutrientes nas folhas dos cafeeiros nos quatro períodos de amostragem (CATUAI 1, 2, 3 e 4; OBATÃ 1, 2, 3 e 4; CANEPHORA 1, 2, 3 e 4)

Date	Cultivar	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	S (g/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	B (mg/kg)
		Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
11/06/2013	Catuaí1	2,53 (2,5-2,7)	26,6 (27,6-25,6)	14 (16-10,4)	3,13 (3,3-2,8)	2,86 (2,9-2,8)	102,9 (125,8-85,1)	163,5 (250,2-98,5)	16,4 (18,4-13,9)	18,7 (35,9-10,0)	52,7 (59,1-46,5)
	Obatã1	1,8 (1,9-1,7)	22,2 (23,8-19,9)	11,4 (13,6-10,3)	2,1 (2,3-1,9)	2,43 (2,5-2,4)	102,4 (130,4-79)	426,6 (502,1-289,6)	10,1 (10,5-10,0)	9,93 (11,3-9,6)	42,0 (44,2-38,5)
	Canephora1	1,7 (1,9-1,5)	23 (24,3-20,9)	26 (30,2-20,3)	2,56 (3-2,2)	3,0 (3,1-2,8)	266,8 (356,3-210,5)	169,2 (179,6-159,5)	11,1 (12,5-8,7)	9,36 (9,7-8,9)	72,6 (87,9-64,1)
26/09/2013	Catuaí2	1,66 (1,9-1,5)	22,4 (23,9-21,6)	11,5 (12,2-11)	3,43 (3,8-3,1)	2,13 (2,4-2,0)	171,7 (187,5-162,8)	149,3 (166,4-128,2)	10,2 (12,7-8,8)	7,6 (8,8-6,5)	32,3 (35,9-30,4)
	Obatã2	1,23 (1,3-1,1)	24,1 (24,9-23,7)	9,36 (10,7-8,1)	1,8 (1,9-1,6)	1,86 (2,0-1,8)	135,7 (144,7-129,5)	431,5 (442,3-419,6)	7,5 (7,7-7,2)	5,5 (5,7-5,4)	27,9 (33,4-25,2)
	Canephora2	0,93 (1-0,9)	22,9 (27,1-17,1)	23,2 (29,6-18,6)	2,5 (3,2-1,9)	2,26 (2,3-2,2)	275,6 (312,4-210,8)	182,7 (280,8-102,1)	7,0 (8,1-6,1)	7,0 (7,5-6,3)	58,7 (69,3-49,2)
17/01/2014	Catuaí3	1,36 (1,4-1,3)	22,1 (22,7-21,8)	13,2 (13,5-12,9)	3,46 (3,6-3,3)	2,23 (2,4-2,1)	73,9 (83,6-61,2)	101,1 (102,5-99,6)	11,0 (12,3-9,7)	7,9 (8,5-7,4)	48,9 (56,8-42,7)
	Obatã3	1,43 (1,5-1,4)	22,1 (23,4-21,3)	8,4 (9,2-7,2)	2 (2,2-1,8)	2,13 (2,5-1,9)	60,4 (64,6-59,3)	259,8 (272,9-242,3)	12,0 (12,7-11,4)	7,63 (8,3-7,1)	45,0 (46,8-43,1)
	Canephora3	1,43 (1,7-1,2)	19,1 (20,6-16,9)	10,6 (11,6-9,5)	1,73 (1,9-1,5)	1,76 (1,9-1,7)	105,9 (142,9-68,7)	106,4 (164-57,3)	10,0 (10,6-9,7)	7,4 (7,7-7,1)	28,1 (31,5-25,8)
13/04/2014	Catuaí4	1,5 (1,6-1,4)	22,0 (23,2-21,5)	15,5 (16,3-14,3)	4,26 (4,6-3,9)	1,96 (2,2-1,7)	123,9 (130,8-111,2)	120,9 (141,3-99,4)	9,93 (10,6-8,6)	8,0 (8,5-7,5)	24,7 (27,9-21,8)
	Obatã4	1,43 (1,5-1,3)	24,1 (24,8-23,1)	12,6 (13,2-12,4)	2,56 (2,9-2,4)	2,0 (2,1-1,9)	134,8 (135,9-132,7)	443,5 (492,6-391,0)	9,4 (10,8-8,1)	8,0 (8,3-7,8)	27,1 (32,4-21,5)
	Canephora4	1,43 (1,6-1,3)	21,0 (21,4-20,4)	12,5 (15,5-10,1)	2,0 (2,2-1,8)	1,9 (2,1-1,8)	189,0 (214,9-197,9)	144,2 (186,4-103,8)	11,1 (12,2-10,1)	7,43 (7,8-7,1)	21,9 (24,9-21,1)

Tabela 2: Dados de temperatura mínima (MinT), média (MedT), máxima (MaxT) e pluviosidade na semana antes da coleta.

Data	Min T (Celsius)	Med T (Celsius)	Max T (Celsius)	Pluviosidade na semana (mm)
11/6/2013	12,97	19,1	25,24	0.00
26/9/2013	16,89	22,73	28,57	3,3
17/1/2014	19,33	26,18	33,02	88,14
13/4/2014	18,25	25,16	32,07	0.00

Para avaliar se os dados ambientais poderiam modular ou serem correlacionados à presença dos minerais na folha, foi aplicado o método de ordenação de análise multivariada conhecido como CAP (do inglês ‘Canonical Analysis of Principal Coordinates’). Por essa ordenação foi possível verificar agrupamentos tanto usando cultivares quanto estações (datas de coleta) como fatores de análise (Figs 5 e 6).

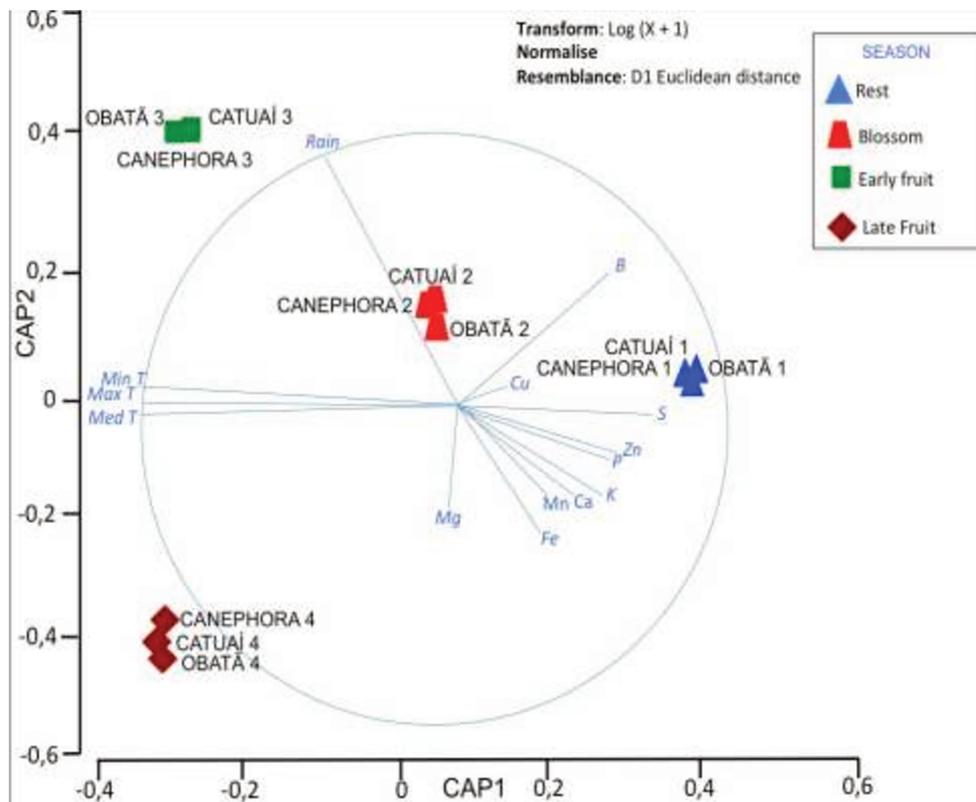


Figura 5: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados ambientais e as datas de coleta ('season'). Os dados ambientais foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação.

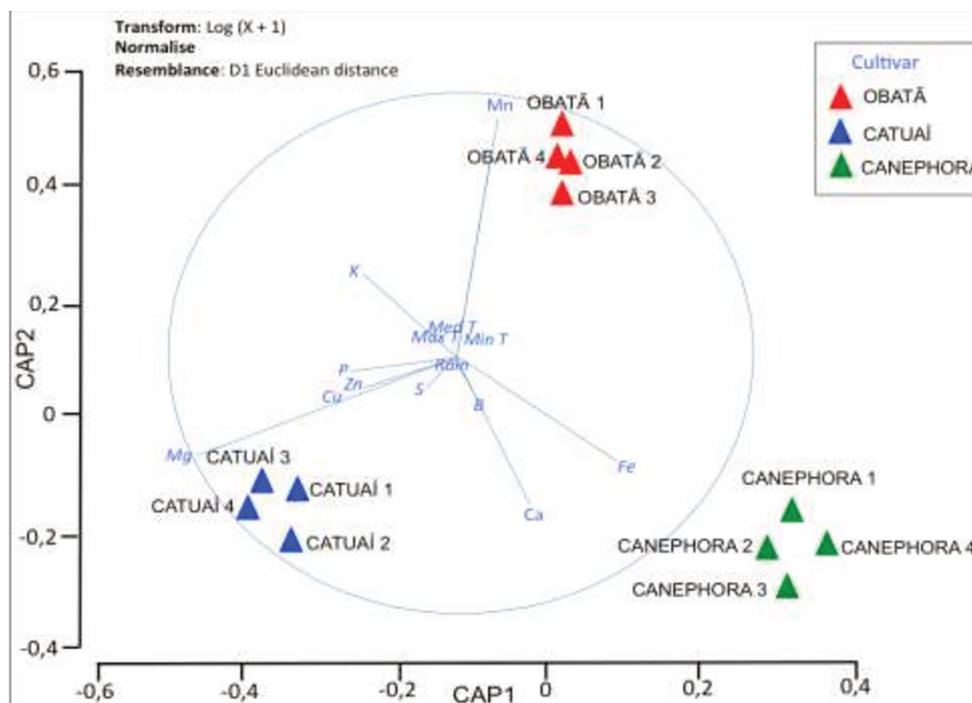


Figura 6: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados ambientais e os cultivares. Os dados ambientais foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação.

Foi realizada também a análise PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) para a verificação estatística, que indicou que as concentrações de minerais foram significativamente diferentes entre as cultivares ($p > 0,004$) e estações ($p < 0,003$). Os dados de interação entre cultivares e estações foi calculado pela utilização das médias das amostras ao invés da utilização das repetições.

Tabela 3: Análise PERMANOVA mostrando associação entre dados ambientais e os fatores cultivar e estação (data de coleta)

	Graus de liberdade	SS*	MS**	pseudo F	P
Cultivar	2	35,87	17,93	4,12	0,004
Estação (coleta)	3	92,05	30,68	7,06	0,003
Residual	6	26,06	4,34		
Total	11	154			

*SS = Soma dos quadrados, **MS = Quadrado médio

A sobreposição dos valores médios dos minerais como vetores no gráfico CAP indica que esses elementos tendem a acumular-se nas folhas durante a temporada de repouso em comparação com outras amostras (Figura 6). Além disso, é possível

observar a tendência de maior quantidade de manganês em plantas de Obatã, ferro e cálcio em Canephora e magnésio em Catuai (Figura 7).

Quanto aos dados de abundância de ordens bacterianas nas folhas dos três genótipos analisados, estes foram compilados na tabela 4.

Tabela 4: Dados de abundância de OTUs associadas a famílias bacterianas identificadas nas folhas dos três genótipos de cafeeiro

Amostra	Actinomycetales	Enterobacteriales	Bacillales	Lactobacillales	Bacteroidales	Pseudomonadales
CATUAI 1	2	7	5	7	0	0
OBATÃ 1	0	3	0	0	0	13
CANEPHORA 1	0	23	0	0	0	0
CATUAI 2	6	6	19	10	0	0
OBATÃ 2	5	6	3	0	0	11
CANEPHORA 2	0	13	3	3	0	0
CATUAI 3	5	6	6	7	0	0
OBATÃ 3	2	4	9	9	0	11
CANEPHORA 3	1	9	10	4	3	0
CATUAI 4	4	6	9	9	0	0
OBATÃ 4	0	4	0	0	0	36
CANEPHORA 4	10	19	0	0	0	0

Análises de NMDS foram realizadas para avaliar os padrões multivariados em conjunto com a distribuição bacteriana. Parcelas com base nos fatores “cultivares” e “estações” foram avaliadas (stress 2D = 0,07), indicando uma clara separação entre os três genótipos de café, mas não foi observada clara diferença entre as estações (Figura 7). As variáveis ambientais e a abundância bacteriana foram representados como vetores sobrepostos que sugerem uma correlação entre *Pseudomonadales* e Obatã (Figura 7).

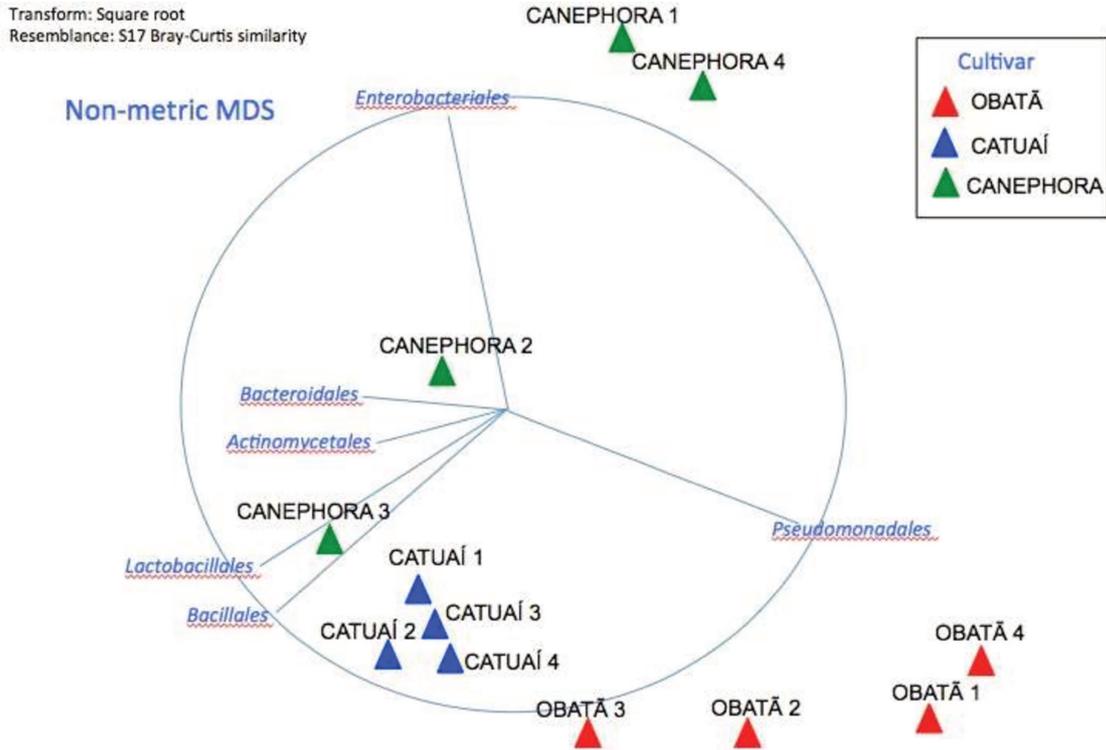


Figura 7: Plot nMDS indicando a correlação entre dados biológicos e os cultivares. Os dados biológicos foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação.

Uma análise de CAP (Figuras 9 e 9) e PERMANOVA (tabela 5) corrobora com NMDS indicando que não houve correlação entre a comunidade bacteriana e a estação ($p > 0,11$), mas houve correlação positiva entre a comunidade e o cultivar ($p > 0,001$).

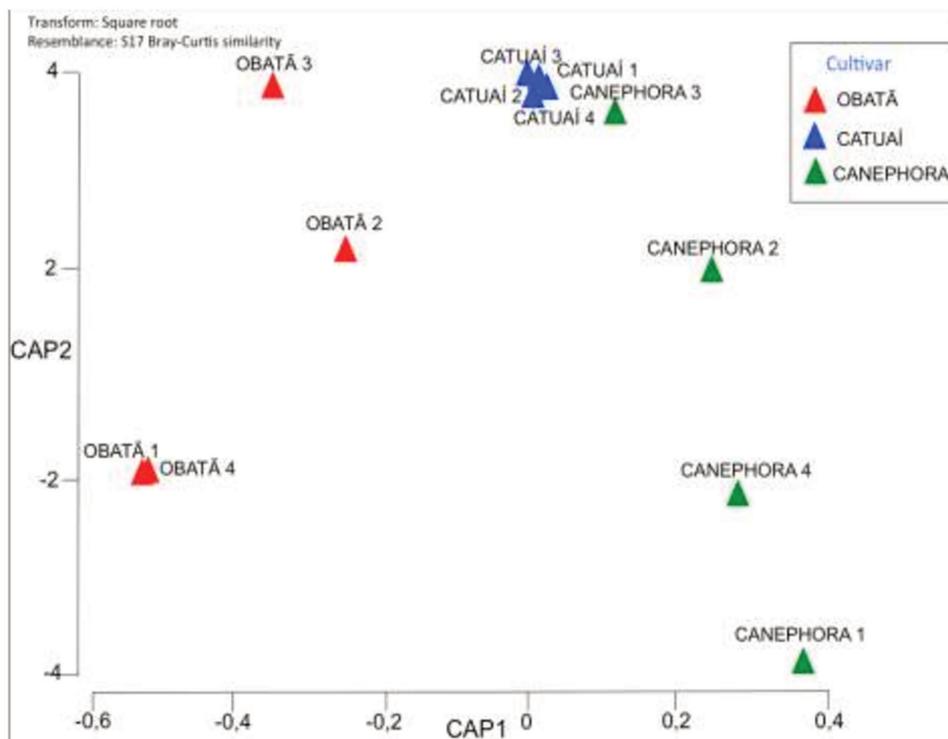


Figura 8: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados biológicos e os cultivares.

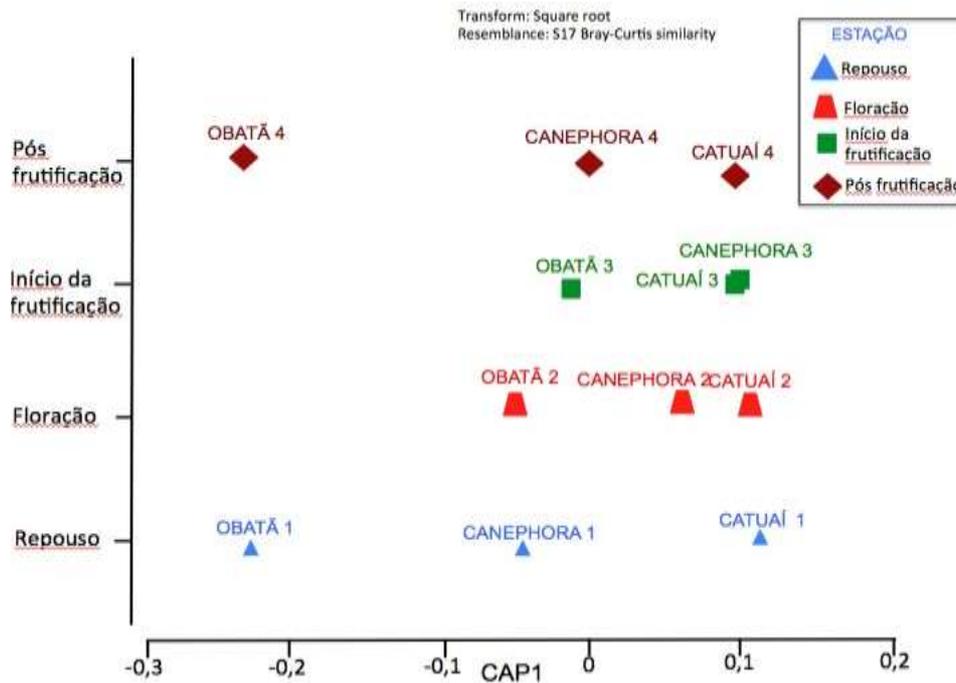


Figura 9: Ordenação CAP indicando a correlação entre dados biológicos e as datas de coleta.

Tabela 5: Análise PERMANOVA mostrando associação entre dados biológicos e os fatores cultivar e estação (data de coleta)

	Graus de liberdade	SS	MS	pseudo F	P
Cultivar	2	9628,8	4814,4	12,06	0,001
Estação (coleta)	3	2975,3	991,7	2,48	0,112
Residual	6	2395,3	339,2		
Total	11	14999			

*SS = Soma dos quadrados, **MS = Quadrado médio

Dois métodos foram utilizados para explorar as relações dos dados ambientais e biológicos. BVSTEP indicou que os minerais Ca e Mn foram as variáveis ambientais que poderiam explicar a composição da comunidade bacteriana ($p > 0,95$; $\Delta p < 0,001$). Finalmente, DistLM foi utilizado para quantificar as variáveis ambientais. O modelo mais parcimonioso indicou que Mn ($p < 0,001$) e Ca ($p < 0,02$) explicaram quase 70% de variação total (48,99 por Mn e 20,34 para o Ca; Tabela 6, figura 10) e que estariam relacionados respectivamente com Obatã / Pseudomonadales e com Canephora/ Enterobacteriales (Tabela 6, Figura 10).

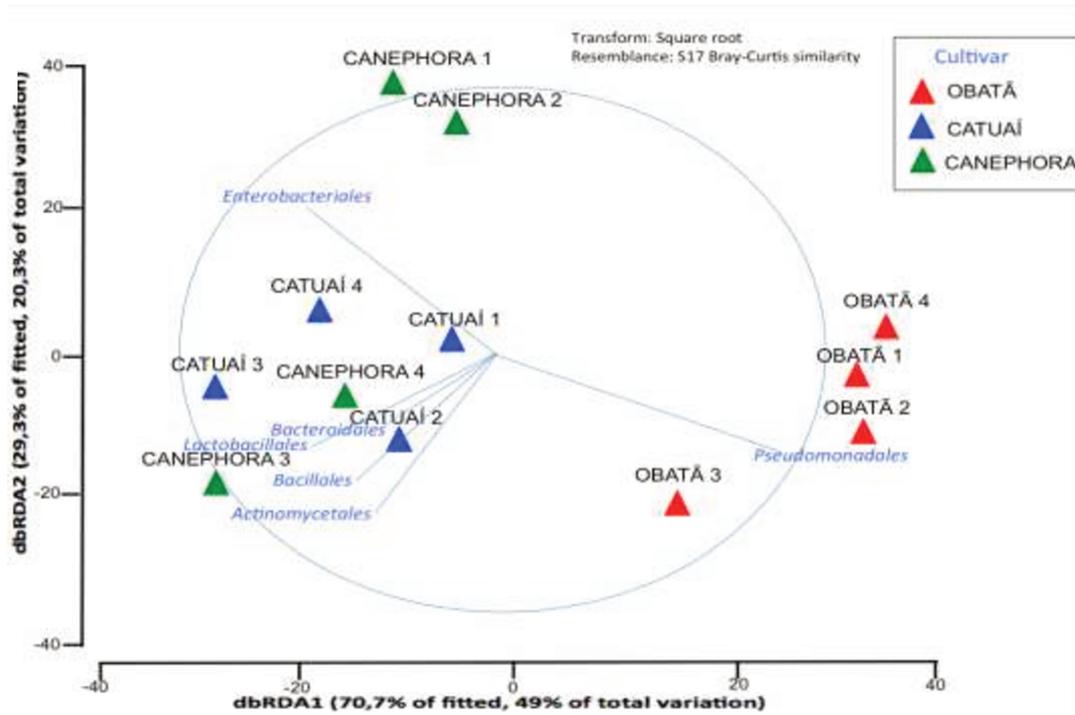
Tabela 6: Análise de Distance-based linear model (DistLM) correlacionado variáveis ambientais com os dados de abundância de ordem bacterianas.

<u>Testes marginais</u>			
	SS	Pseudo-F	P
P	-73,06	-0,048	0,975
K	429,09	0,339	0,738
Ca	3382,7	2,912	0,066
Mg	1791	1,356	0,293
S	1102,2	0,793	0,477
Fe	3227,6	2,85	0,076
Mn	7700,4	10,55	0,002
Cu	510,7	0,35	0,741
Zn	123,03	0,082	0,947
B	1341,5	0,98	0,405
<u>Testes sequenciais</u>			
	SS	Pseudo-F	P
1-Mn	7700,4	10,55	0,001
2-Ca	3188,5	6,98	0,027

Porcentagem da variação explicada pelos eixos individuais

Eixo	% variação explicada pelo modelo ajustado		% variação explicada pela variação global	
	Individual	Cumulativa	Individual	Cumulativa
1	70,67	70,67	48,99	48,99
2	29,33	100	20,34	69,33

A)



B)

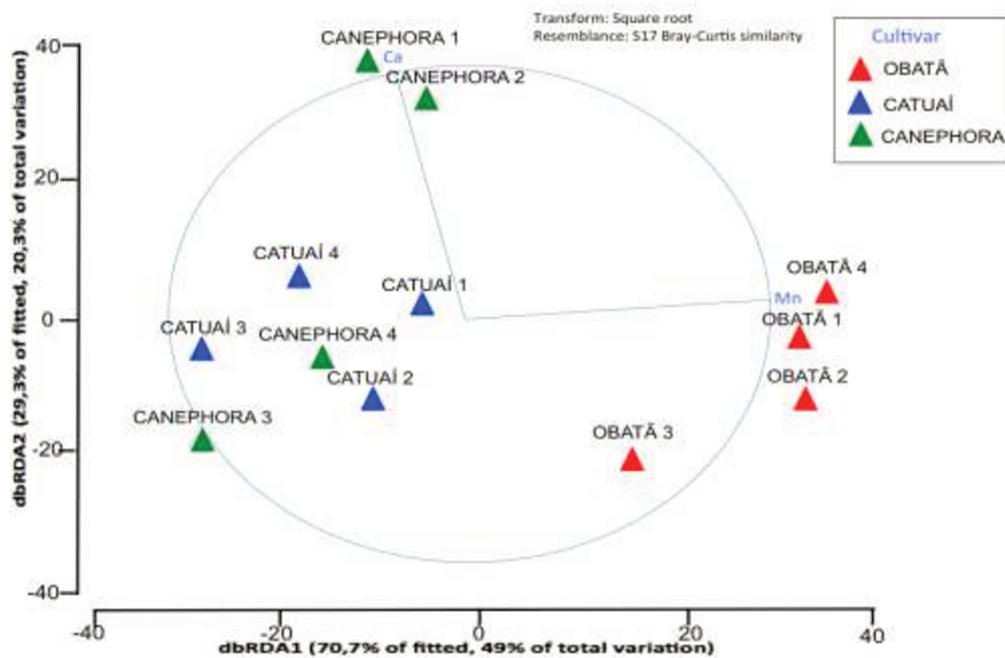


Figura 10. *Distance-based linear models* (DistLM) análise como modelo ajustado visualizado através de ‘distance-based redundancy analysis’ constrained ordination (dbRDA) biplot de amostras biológicas e parâmetros ambientais. A) Variáveis biológicas foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação. B) Variáveis ambientais foram sobrepostos aos gráficos como vetores a fim de visualizar a correlação. Note a proximidade dos vetores *Pseudomonadales* (A) e Mn (B), e *Enterobacteriales* (A) e Ca (B).

Discussão

A comunidade bacteriana de *Arábica* varia pouco ao longo do tempo enquanto a de *Canephora* e *Obatã* mostram-se bastante dinâmicas

A identificação de bactérias associadas ao café com potencial para a agricultura e/ou aplicação industrial tem crescido nos últimos anos (Vaughan *et al.*, 2015). Estes estudos tem sido focados principalmente no microbioma da rizosfera (Caldwell *et al.*, 2015), nos grãos (Oliveira *et al.*, 2013) e até nos resíduos de lixiviação nas máquinas de café (Villanova *et al.*, 2015). Embora a filosfera seja um habitat microbiano pouco explorado (Lindow e Brandl, 2003; Vorholt, 2012) e as principais doenças do cafeeiro sejam por vias foliares, ainda não há dados com relação à microbiota de folhas de café. Sabe-se que a composição, a diversidade e a abundância de bactérias nas folhas depende de vários fatores, como o genótipo da planta hospedeira, a idade da folha, as condições ambientais (isto é, a umidade, radiação UV, temperatura) e disponibilidade de macro e micronutrientes (Lindow e Brandl, 2003). Outro aspecto que deve ser considerado no estudo da comunidade filosférica é sua flutuação sazonal. Por exemplo, o cafeeiro é uma planta perene e como tal perpassa por várias fases ao longo do ano, com períodos de florescimento, frutificação, repouso, intenso brotamento etc. Estes aspectos podem contribuir também para uma flutuação da diversidade bacteriana (Lindow e Brandl, 2003).

Tem sido demonstrado que o local de coleta e a espécie vegetal influenciam na comunidade bacteriana (Knief *et al.*, 2010). O que se viu no presente trabalho foi a constatação e uma ampliação desta perspectiva. Se antes os trabalhos versavam em comparar diferentes espécies de plantas tão dispares quanto as encontradas na Mata Atlântica por exemplo (Lambais *et al.*, 2006), aqui se pensou o contrário: e se compararmos espécies diferentes mas bastante similares (*Coffea arabica* X *Coffea canephora*)? E se uma das espécies fosse descendente da outra (*Coffea arabica* descende de *Coffea canephora*)? E se uma das plantas fosse híbrido da “mãe” e da “filha” (*Coffea arabica* ‘Obatã’ é híbrido de *Coffea arabica* com *Coffea canephora*)? *A priori* esperavam-se diferenças porque mesmo indivíduos diferentes da mesma espécie mostram diferenças entre si quanto à estrutura das comunidades bacterianas como demonstrado por Yang *et al.*, (2001) em *Citrus sinensis*. Então, era esperado o quadro mostrado na figura 4 onde cada cafeeiro era composto por distintas comunidades. *Canephora* e *Obatã*, por exemplo, apresentaram índices de Shannon muito baixos na coleta de 11 de junho (figura 4), o que pode ser explicado pelo fato deste mês ser tradicionalmente um dos mais secos no Estado de São Paulo. Conforme transcorre o

ano e a primavera vai se aproximando, o índice vai aumentando, chegando no seu ápice no verão, onde a umidade costuma ser maior, voltando a cair em abril no outono. Este tipo de correlação *estação do ano vs diversidade* já tinha sido vista em inúmeros casos como por exemplo, para citar alguns, na magnólia (Jackson e Denney, 2011), na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Bodenhausen *et al.*, 2013) e beterraba (Thompson *et al.*, 1993). Jackson e Denney (2011), trabalhando com *Magnolia grandiflora*, nativa do hemisfério norte, viram que no verão a comunidade bacteriana era sensivelmente distinta das de outras estações, mostrando-se mais diversa e complexa, o que mais uma vez corrobora com os dados deste trabalho. A disponibilidade de água decorrente da estação poderia estar envolvida. Porém quando se olha Catuaí, o que chama a atenção é a enorme estabilidade, onde o índice de Shannon varia pouco, em torno de 1,3, mesmo nos meses mais secos. Os plots CAP e nMDS (Figuras 7 e 8) também mostraram que as comunidades de Catuaí formam um aglomerado coeso, bastante distinto de Obatã e Canephora. Sugere-se que como as OTUs foram agrupadas até o nível de ordem, pode ser que haja variação em níveis inferiores (família, gênero e espécie) porém não conseguiu-se percebê-las até o presente momento.

Qualitativamente, Obatã mostrou claro domínio de *Pseudomonadales*, assim como dezenas de estudos prévios demonstraram que essa ordem é uma das mais prevalentes em folhas (Vorholt, 2012). *Pseudomonas*, um gênero dentro de *Pseudomonadales*, é largamente encontrado no solo e associado aos mais diferentes vegetais, além de ser a bactéria com maior quantidade de literatura a respeito (Miller *et al.*, 2008). O fato de ser encontrado em grande número no cafeeiro despertou interesse no presente trabalho e resultou no delineamento da abordagem “b”. Em Catuaí não se vê predominância de nenhum grupo além da já referida estabilidade temporal que permanece sem explicação conclusiva. E por fim, Canephora é dominada por *Enterobacteriales*, principalmente na primeira amostragem. Sugere-se que pelo fato de Canephora Guarini, na Fazenda Santa Elisa, ser plantada nos corredores da plantação e receber acidentalmente adubação orgânica aspergida nas folhas, possa levar a uma prevalência de enterobactérias. Em alguns estudos com filosfera tem sido visto grandes quantidades destas bactérias associadas (Cooley *et al.*, 2003) ou não (Hunter *et al.*, 2010) a contaminações, reforçando esta hipótese.

Cálcio e manganês tem maior importância na comunidade bacteriana

Como dito anteriormente as condições climáticas e disponibilidade de nutrientes nas folhas podem alterar a comunidade bacteriana. Por isso os minerais foram escolhidos como principais fatores ambientais nestas análises devido a sua importância na colonização bacteriana. As análises de CAP e PERMANOVA indicaram

que as folhas dos três genótipos de *Coffea* tendem a acumular maiores quantidades de minerais durante o "repouso" (Figura 5 e Tabela 3). Isto é consistente com a concentração de minerais em folhas jovens de plantas perenes durante a fase vegetativa, antes da transição para a fase reprodutiva, quando a floração e a frutificação demandam mais nutrientes (Vaast et al., 2005). Curiosamente, a maior diversidade na comunidade bacteriana, com exceção de Catuaí, foi encontrada em "floração" e "pré-frutificação" (primavera e verão), e não em "repouso" (inverno). Sugere-se que o aumento da diversidade nestas amostras pode estar relacionado com um possível maior conteúdo e disponibilidade de água em estações chuvosas. A disponibilidade de água é um dos fatores mais flutuantes sobre as superfícies da folha, e pode ser modulador da população microbiana de folhas, especialmente filosféricas, espalhando as bactérias através da superfície da folha, permitindo a procura por nutrientes (Lindow e Brandl, 2003).

Ao explorar as relações entre dados ambientais e biológicos, detectou-se que a maior concentração de Mn em Obatã em todas as quatro amostras foi positivamente correlacionada com a prevalência da Ordem *Pseudomonadales*. Além disso, Mn explicou quase 49% da variação total na composição da comunidade microbiana. Mn é extremamente importante para as plantas uma vez que várias proteínas fotossintéticas e enzimas contêm Mn em suas estruturas (Anjum et al., 2015). A absorção de Mn pode ocorrer pela captação inicial de Mn^{2+} no apoplasto de células de raiz, que envolvem a adsorção por constituintes da parede celular com carga negativa (Anjum et al., 2015). Em seguida, o transporte de Mn^{2+} é feito pelo simplasto por meio de processos metabólicos (Rengel 2000), acumulando em tecidos aéreos (Page e Feller 2005), mais especialmente nas folhas (Lidon 2001). É interessante mencionar que *Pseudomonales*, particularmente do grupo fluorescente, tais como *Pseudomonas putida* GB-1 e MnB1 são modelos de bactérias oxidantes de Mn (Parker et al., 2014). Elas conseguem oxidar Mn^{2+} solúvel em óxidos insolúveis de Mn(IV), que revestem as células com precipitados castanhos escuros de MnO_2 nanoparticulados que eficientemente adsorvem os metais tóxicos, influenciando no ciclo ambiental destes compostos (Villalobos et al., 2006). A capacidade de *Pseudomonadales* em oxidar Mn poderia ser uma vantagem competitiva sobre outras bactérias na colonização da Obatã, o que, conseqüentemente, pode evitar efeitos tóxicos do excesso de Mn nas folhas, tais como diminuição da taxa fotossintética (Li et al., 2010). A causa de maior acúmulo de Mn em Obatã em comparação com os outros genótipos analisados é desconhecida e merece uma investigação mais aprofundada, o que poderá igualmente incluir testes experimentais para verificar se a inoculação artificial de Mn pode modular

as populações *Pseudomonadales* em *Coffea*. Apesar de estatisticamente não confirmado, outro traço que pode explicar a prevalência de *Pseudomonadales* em Obatã é o pequeno teor relativo de Fe em Obatã quando comparado com plantas *Canephora* por exemplo (Tabela 1). *Pseudomonas* são competentes em lidarem com baixo teor de ferro, devido à sua capacidade de sequestrar este mineral através da ação de sideróforos (Cornelis, 2010).

O cálcio foi o outro mineral que poderia estatisticamente explicar a variação total na composição da comunidade bacteriana (cerca de 20%). As amostras de *C. canephora* “repouso” e “florescimento” continham as maiores concentrações de Ca nas folhas. Curiosamente, estas amostras têm maior proeminência do *Enterobacteriales* na folhas. Íons de cálcio são extremamente importantes para as plantas, agindo como elementos estabilizadores de membranas e agentes de fortalecimento da parede celular (Gilliam *et al.*, 2011; Dodd *et al.*, 2010). Além disso a sinalização de Ca tem implicações na estrutura dos tricomas, que são considerados sítios preferenciais de adesão bacteriana (Dobney *et al.*, 2009) o que facilitaria uma maior contaminação de *Enterobacteriales* e posterior colonização das folhas.

Conclusões da abordagem “A”

Apesar dos três cafeeiros serem filogeneticamente aparentados, suas comunidades bacterianas são bastante distintas. A de Catuai oscila pouco no tempo e é indiferente às estações do ano e estados fisiológicos da planta. As comunidades de *Canephora* e de Obatã no entanto variam bastante, tendo seu índice de Shannon crescente a medida que a estação chuvosa se aproxima e decrescente no outono e inverno. *Enterobacteriales* e *Pseudomonadales* formam os grupos dominantes, estando correlacionadas com as concentrações de cálcio e manganês respectivamente. A correlação entre estas bactérias e as plantas não está clara mas sugerem que *Enterobacteriales* possa ser uma contaminação decorrente da posição dos *Canephoras* na área experimental e que *Pseudomonadales* seja selecionada pela concentração alta de manganês nas folhas de Obatã.

Abordagem “B”: Genômica comparativa de espécies de *Pseudomonas* spp isoladas de rizosfera, raiz e folha de *Coffea arabica*

Resultados

Isolamento e sequenciamento

Duas bactérias de rizosfera (MNR3A, MNR3B), duas de raiz (EMN2B, EMN2) e uma da superfície foliar (MN1F) foram isoladas. Nenhuma foi encontrada no interior foliar. O sequenciamento da região ITS mostrou que todos os isolados pertenciam ao gênero *Pseudomonas* (Figura 1).

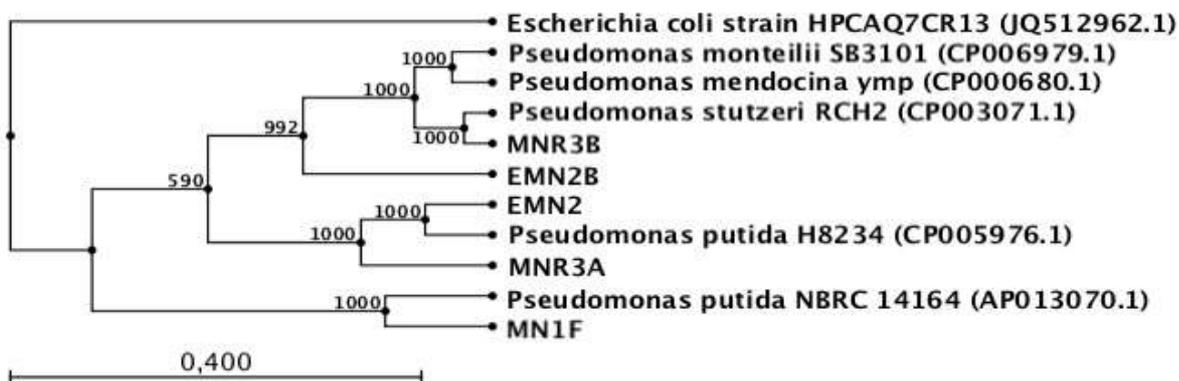


Figura 1. Filogenia utilizando o método UPGMA montada com as sequências de ITS amplificadas dos isolados. Percebe-se que os isolados conseguidos neste trabalho pertencem ao grupo da *Pseudomonas* sendo que MNR3B e EMN2B aproximam-se mais de *P. stutzeri* e *P. mendocina* enquanto o restante assemelha-se a *P. putida*.

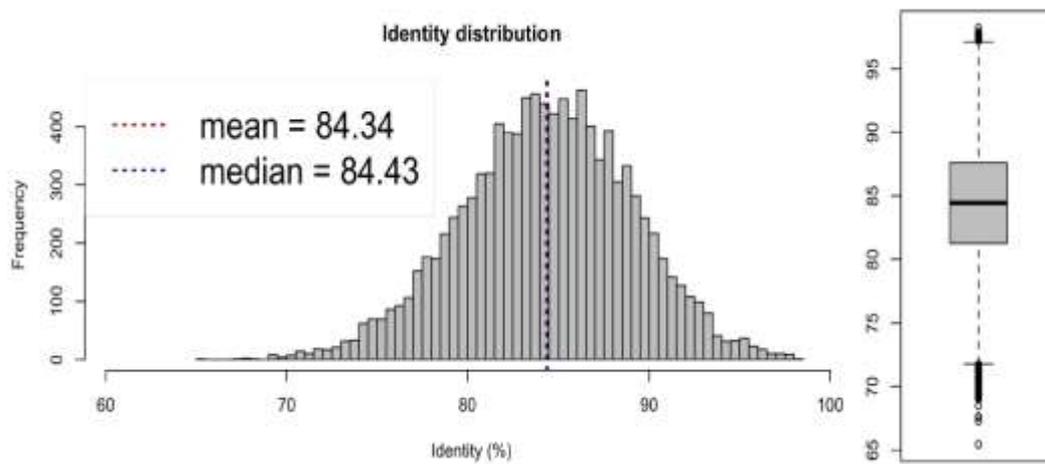
Com base na similaridade entre si, os isolados de *Pseudomonas* sp. MNR3A, EMN2 e MN1F (um de rizosfera, um de raiz e um de filosfera) foram selecionados e sequenciados usando a plataforma MiSeq (Illumina) alocado no Centro de Ciências Genômicas da Universidade da Carolina do Norte (*University of North Carolina High Throughput Sequencing Facility*), sob colaboração e supervisão do Dr. Piotr Mieczkowski. Os DNAs foram fragmentados em 300 pb e foram produzidas bibliotecas *paired-end* (PE) para determinar a orientação e posição relativa dos *contigs* produzidos pelo sequenciamento. Os *reads paired-end* foram montados em *scaffolds* usando o montador VELVET com o parâmetro de *K-mers* otimizado para o tamanho ‘N50’. Para MNR3A, MN1F, EMN2 os *K-mers* foram maximizados para os valores de 93, 83 e 79 resultando em montagens com N50 de 182.362, 125.670 e 63.365, respectivamente. Abaixo a Tabela 1 mostrando os dados gerais das montagens.

Tabela 1: Dados globais das montagens das bactérias MNR3A, MN1F e EMN2

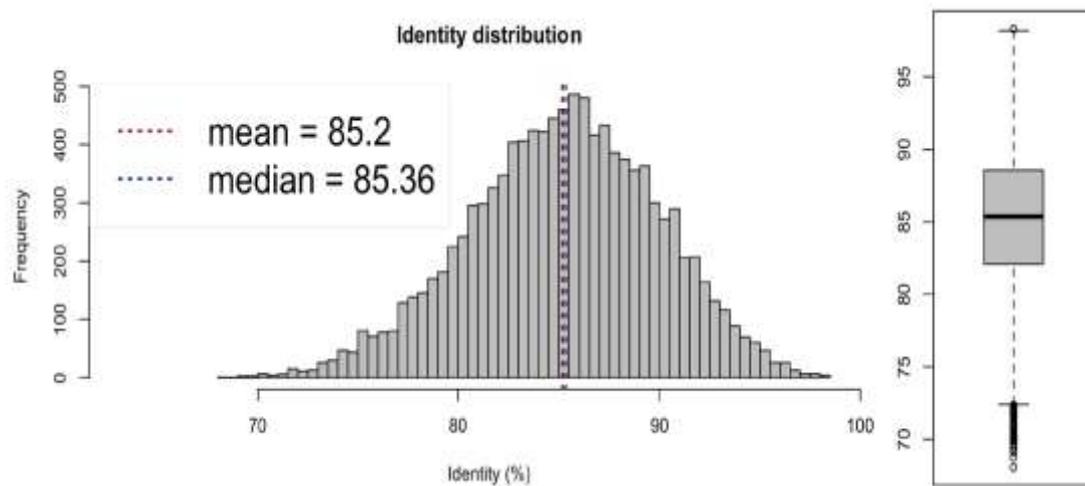
	<i>Reads</i> na montagem (%)	<i>Reads</i> fora da montagem (%)	Total de Contigs	Tamanho hipotético do genoma	N50	Contigs em N50
MNR3A	70%	30%	49	5,6 Mb	182000	9
MN1F	53%	47%	79	6,07 Mb	125670	15
EMN2	55%	45%	134	5,83 Mb	63364	27

Baseados nos dados de sequenciamentos via NCBI de bactérias da espécie *P. putida* (linhagens KT2440, NBRC14164, W15Oct28, F1, GB-1, W619, S16, BIRD1, ND6, DOT-T1E e LS46) que contêm genomas de tamanhos que vão de 5,73 Mb (BIRD1) até 6,3 Mb (ND6), infere-se que as predições de tamanho do genoma das bactérias analisadas condizem com o tamanho de um genoma de *P. putida*. Entretanto, ao avaliar a distância entre os genomas dos isolados e *P. putida* GB-1 utilizando o ANI, verificou-se que eles não se aproximavam (Figura 2) ficando em torno de 85% de similaridade, porcentagem muito abaixo do que se considera a ideal para afirmar tratarem-se da mesma espécie que é de 95% (Goris *et al.*, 2007). O resultado mostra que MNR3A, MN1F e EMN2 não são *P. putida* a despeito da similaridade no ITS, podendo ser assim bactérias aparentadas.

a)



b)



c)

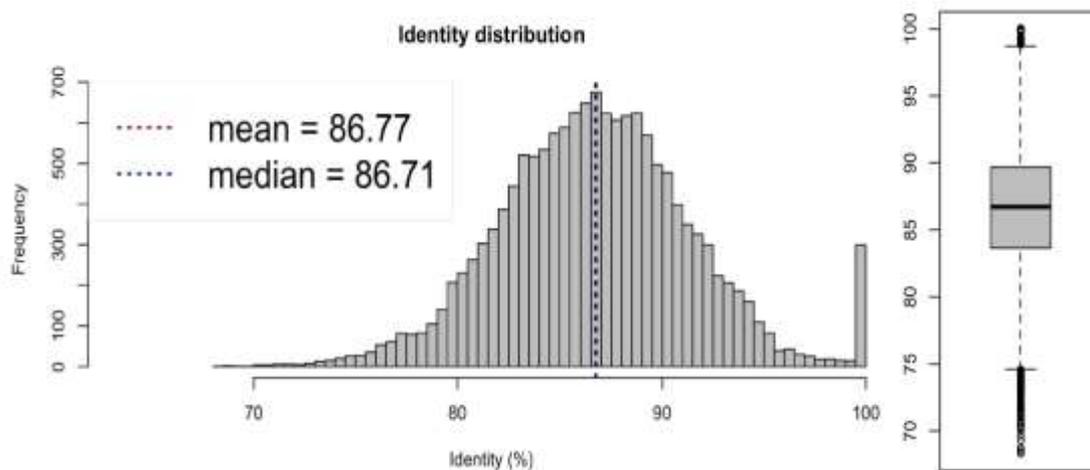
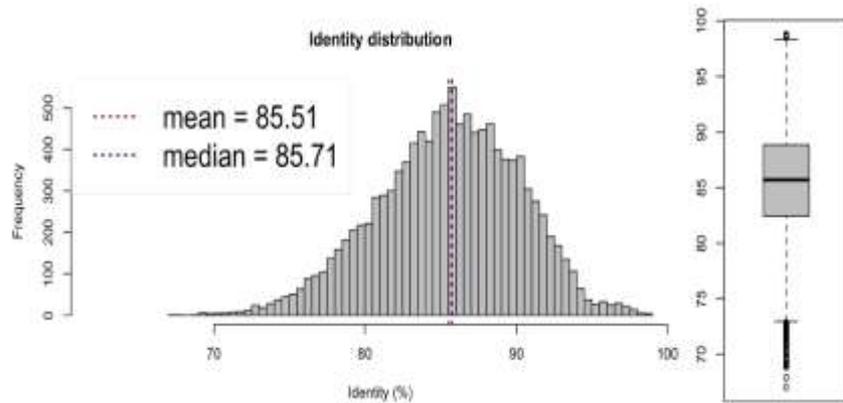


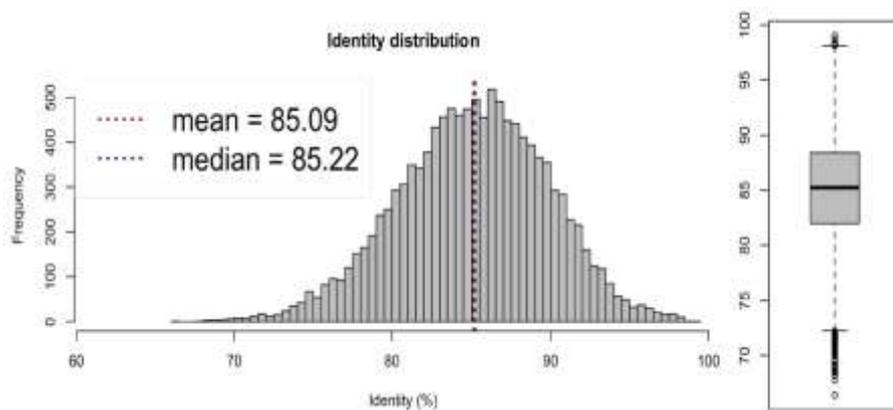
Figura 2. Análise ANI entre as bactérias MNR3A (a), MN1F (b) e EMN2 (c) com *P. putida* GB-1. Médias e medianas de identidade acima do valor de 95% indicam que as bactérias são da mesma espécie

Ao realizar-se as análises ANI com outras *Pseudomonas* do grupo Putida (i.e., *P. montelli*; Mulet *et al.*, 2010), encontrou um valor de identidade em torno de 85%. As análises contra *P. fluorescens* indicaram identidade menor ainda, em torno de 80% o que mostra que os isolados se aproximam mais do grupo de *P. putida* do que de *P. fluorescens*. Resolveu-se então comparar os isolados, dois a dois, e os resultados são similares em termos de identidade entre eles, em média identidade de 85% (Figura 3).

a)



b)



c)

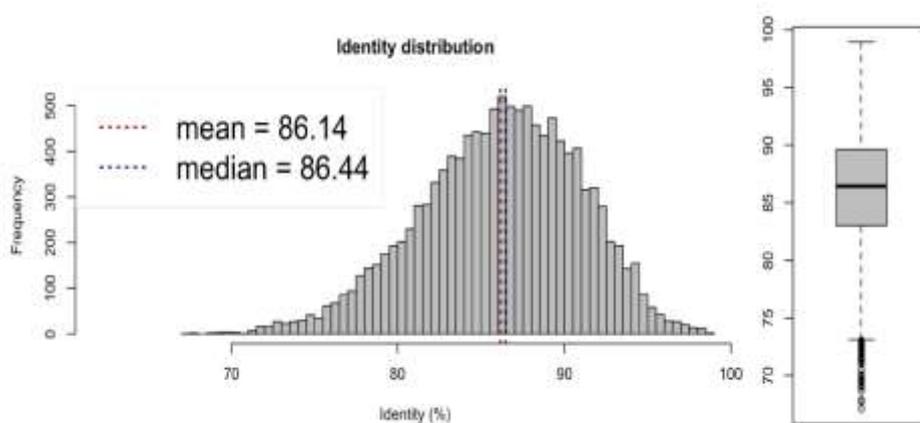


Figura 3. Análise ANI entre as bactérias MNR3A vs MN1F (a), MNR3A vs EMN2 (b) e MN1F vs EMN2 (c). Médias e medianas de identidade acima do valor de 95% indicam que as bactérias são da mesma espécie.

Os resultados mostraram que os três isolados não são de *P. putida*, mas de possíveis espécies novas e relacionadas. Uma análise taxonômica polifásica (Biolog, FAME, hibridização DNA-DNA, filogenômica) deverá ser conduzida para a identificação e possível caracterização dos mesmos.

Estrutura geral dos genomas

A pré-anotação foi realizada utilizando o programa RAST de acordo com as especificações dos desenvolvedores (Aziz *et al.*, 2008) buscando sempre a comparação entre os genomas. A anotação via RAST fornece o número hipotético de genes (ORFs) de cada bactéria, assim como uma anotação ontológica da função desses genes. Para MNR3A foram anotados 4972 genes codantes, 5232 genes para EMN2 e 5265 para MN1F. Quanto aos tRNAs, MN1F possui 54, EMN2 57 e MNR3A 55. Foi feita uma análise comparativa do conteúdo gênico compartilhado entre as três bactérias estudadas que pode ser verificada através do diagrama de Venn mostrado abaixo (Figura 4).

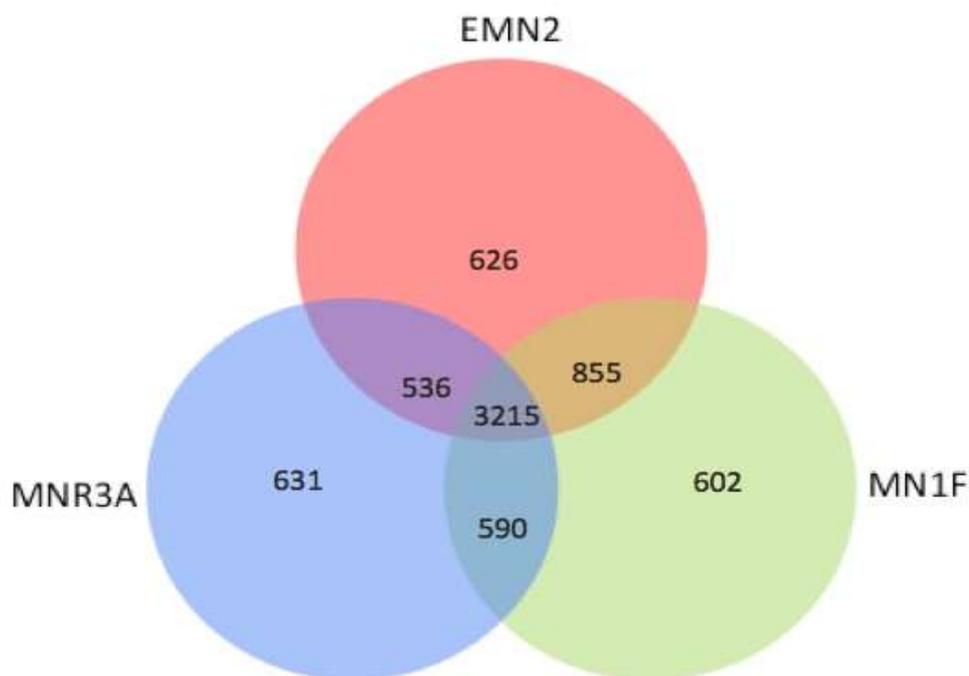


Figura 4. Conteúdo gênico das bactérias MNR3A, EMN2 e MN1F. Diagrama de Venn mostrando a distribuição de genes classificados como presentes nas três bactérias.

Pelo diagrama verificou-se que 3215 genes estão presentes nas três bactérias, equivalendo a aproximadamente 60% dos genes de cada isolado. Este seria o *core-genome*, o conjunto de genes compartilhados entre todos os isolados. Doze por cento

dos genes seriam específicos de cada cepa, e o restante (em torno de 28%) são compartilhados por duas das três bactérias. As porcentagens batem com os estudos antecessores (Silby *et al.*, 2009).

A análise de anotação ontológica (*Subsystem feature distribution*) dos genes das três bactérias foi disposta em gráficos de barras e pode ser verificada na figura 5.

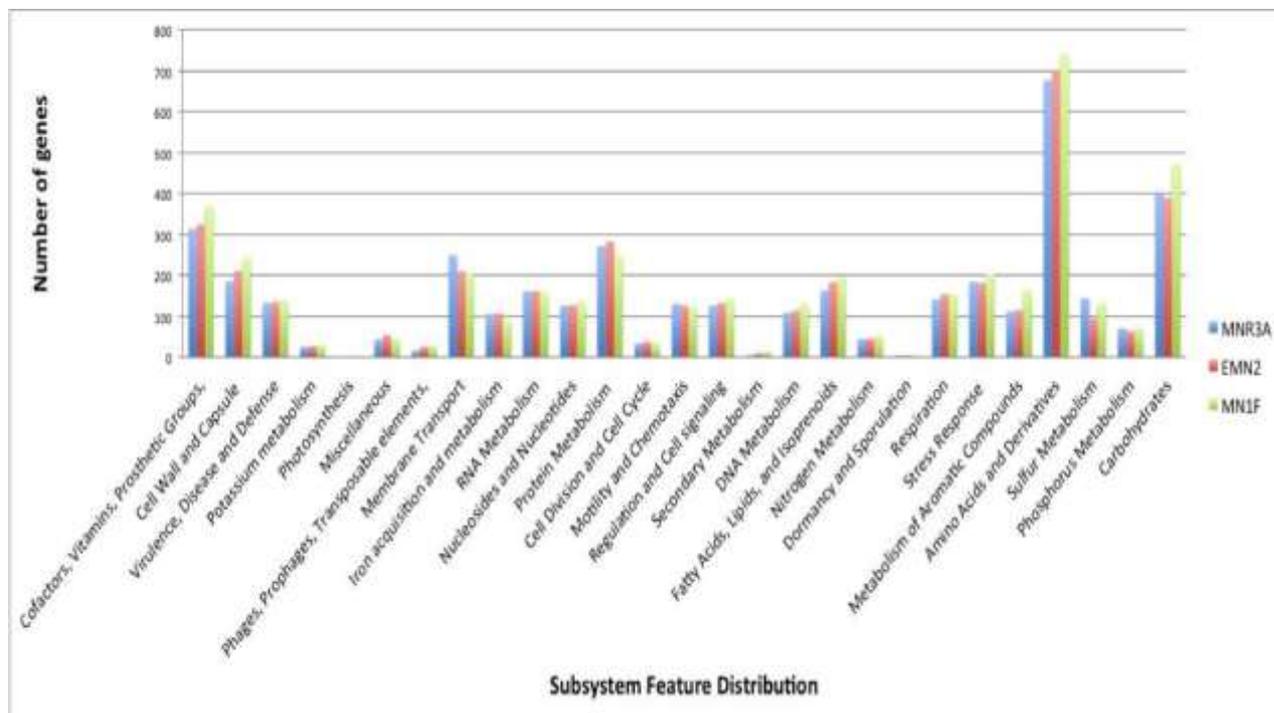
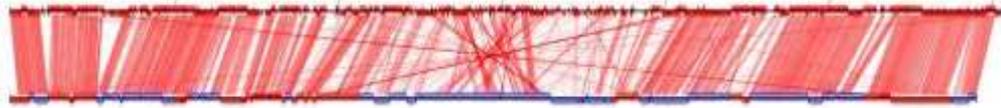


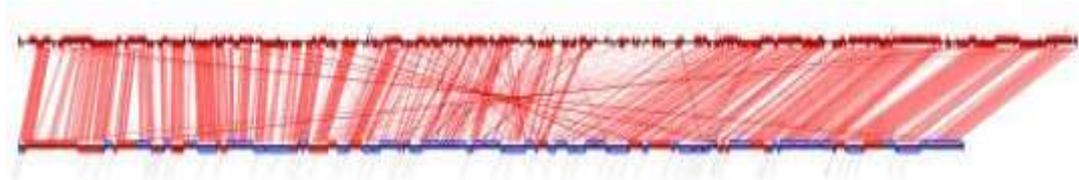
Figura 5. Análise ontológica dos genes das bactérias MNR3A, EMN2 e MN1F realizada pelo programa RAST

A partir disso, não se verificou grandes diferenças quanto ao número de genes anotados para cada bactéria. Alguns resultados são esperados como a ausência de genes relacionados à fotossíntese e esporulação, mecanismos inexistentes em *Pseudomonas*. Quanto à sintonia, cada genoma foi comparado com *Pseudomonas putida* GB-1 (Figura 6), uma *Pseudomonas* “modelo”.

a) *Pseudomonas GB-1* vs *Pseudomonas sp. MN1F*



b) *Pseudomonas GB-1* vs *Pseudomonas sp. EMN2*



c) *Pseudomonas GB-1* vs *Pseudomonas sp. MNR3A*

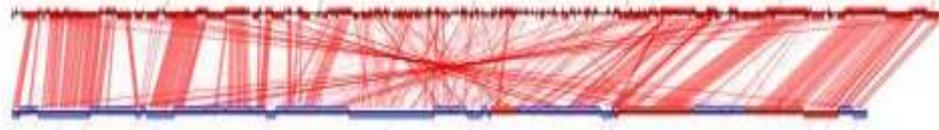


Figura 6. Sintenia comparativa mostrando a relação entre os genomas de a) MN1F b) EMN2 e c) MNR3A (linha acima) e o de *Pseudomonas GB-1* (linha abaixo).

A análise mostrou que há maior correspondência com MN1F e EMN2, no entanto nos três isolados vê-se grande número de inversões o que sugere genomas bastante dinâmicos e móveis, característicos do gênero que tem pan-genoma aberto.

Elementos móveis

Sequências de inserção foram detectadas pelo ISFinder em MN1F e EMN2 (Tabela 2) com uma estrigência forte (E value menor que e^{-100}) seguindo recomendação de Wu *et al.*, (2010). Inesperadamente estas sequências não foram encontrado em MNR3A. A maioria é proveniente de *Pseudomonas* spp.

Tabela 2. Lista das sequencias de inserção encontrados nos genomas de MN1F e EMN2 (em MNR3A não foram encontradas nenhuma) com a família as quais pertencem, a possível origem, o tamanho em pares de base e o número de cópias.

	Família	Nome	Origem	Tamanho (pb)	Cópias
MN1F	IS66	ISPpu14	<i>P. putida</i> KT2440	2383	6
		ISPpu15	<i>P. putida</i> KT2440	2041	4
		ISPsy5	<i>P. syringae</i> str. DC3000	2059	33
	IS3	ISPen2	<i>P. entomophila</i> str. L48	1232	1
		ISPpu22	<i>P. putida</i> GB-1	1232	1
	IS30	ISpa37	<i>P. aeruginosa</i> strain S04 90	1454	1
	IS684	IS684	<i>P. syringae</i> strain B728a	2040	1
	IS256	ISPa27	<i>P. putida</i> W619	1361	1
EMN2	IS5	ISPpu21	<i>P. putida</i> S12	1190	1
		ISPst5	<i>P. stutzeri</i> strain Q	1191	1
		ISAch1	<i>Achromobacter</i> sp. BP3	1192	1
		ISPa16	<i>P. aeruginosa</i> plasmid rms149	1192	1
		ISThi1	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGr7	1191	1
		ISPpu18	<i>P. putida</i> transposon Tn1332	1192	1
		ISPre2	<i>P. resinovorans</i> NBRC	1190	1
		ISPsp1	<i>P. mandelli</i> JR-1	1188	1
		IS1384	<i>P. putida</i> plasmid pPGH-1	1178	1
		ISPst7	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17587	1192	1

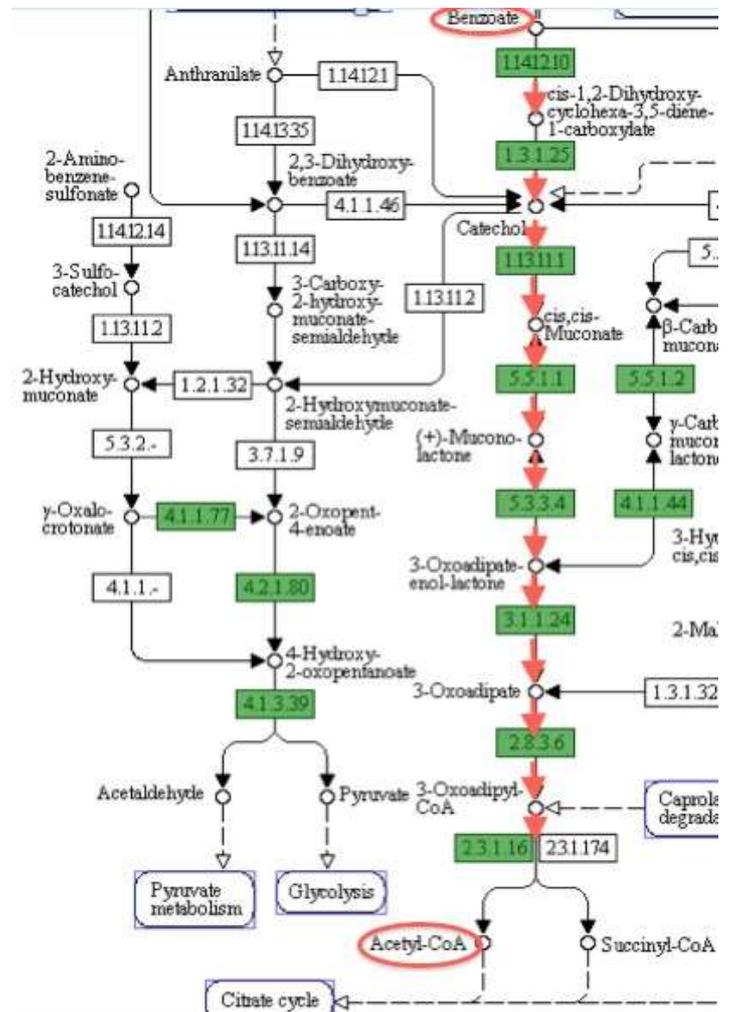
Como pode ser visto, MN1F tem 8 sequencias de inserção sendo que ISPsy5 originada de *P. syringae* str. DC3000 contribui com 33 cópias espalhadas por todo o genoma, não se concentrando em uma região específica. Já EMN2 contém 10 sequencias de inserção sem cópias adicionais. Os profagos, por sua vez, foram encontrados em todos os genomas. MN1F possui 5 fagos, sendo 3 completos e intactos, 1 incompleto e 1 questionável. EMN2 possui 3 fagos, sendo 1 completo, 1 intacto e 1 questionável. Por fim MNR3A, tem somente 2, 1 intacto e o outro questionável.

Degradação de compostos orgânicos e aromáticos

Genomas prévios de *P. putida* já apontavam uma série de rotas para a transformação de compostos aromáticos. De fato, estas bactérias são conhecidas degradadoras de compostos xenobióticos, principalmente solventes orgânicos e compostos aromáticos (Nelson *et al.*, 2002; Collado *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2015). Os três isolados estudados não fogem à regra e compartilham entre si a capacidade de degradar alguns dos compostos supracitados, ainda que neste caso eles não sejam capazes de utilizá-los como fonte de carbono como o faz *P. putida* F1, por exemplo (Morimoto *et al.*, 2013). A única interessante exceção se dá pelo benzoato, um composto aromático bastante comum em folhas e principalmente frutos de diversas espécies de plantas (Jakubas e Manson 1991). Pela anotação, MN1F possui não só a capacidade de degradá-lo como também de incorporá-lo no Ciclo de Krebs através da sua transformação em acetil-CoA (Figura 7).

Já EMN2 e MNR3A não possuem esta via, sendo capazes somente de transformar benzoato em catecol. O fato de MN1F aparentemente ser capaz da transformação descrita acima pode apontar para uma estratégia da bactéria foliar de usar um recurso, no caso benzoato, encontrado nas folhas do café (Stashenko *et al.*, 2013) como fonte energética, já que o ambiente na qual se encontra não é muito rico em fontes primárias como glicose e afins (Lindow e Brandl 2003).

Figura 7. Diagrama KEGG com a via de transformação do benzoato em acetil-CoA (em verde com as setas laranjas). A via começa com o benzoato sendo transformado em catecol, depois em cis-muconato, muconolactona, 3-oxoadipato-enol-lactona, 3-oxoadipato, 3-oxoadipil-CoA e finalmente acetil-CoA que entrará no ciclo de Krebs.



Resposta a estresse oxidativo, osmótico e de temperatura

Espécies de *Pseudomonas* são frequentemente encontradas em ambientes sujeitos a estresses dos mais variados tipos, como temperaturas altas, alta concentração de sais e agentes oxidantes (Lindow e Brandl 2003). Tendo em vista isto, a anotação foi feita voltada para a resistência a estas diferentes formas de estresse abiótico.

Estresse oxidativo

As três bactérias possuem um grande arsenal de enzimas antioxidantes (Tabela 3). No total, MN1F possui 88 genes envolvidos com essa capacidade, MNR3A tem 81 e EMN2 possui 75. Dentre eles pode-se destacar bacterioferritina, catalase, superóxido dismutase e citocromo c peroxidase, enzimas importantes contra espécies reativas de oxigênio (Hassett *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2005), além de proteínas dos sistemas de regulação de estresse oxidativo Fur e Zur que conectam o metabolismo de ferro e zinco à demanda por defesa também contra as espécies reativas de oxigênio (Troxell e Hassan 2013). O fato de MN1F possuir mais cópias de alguns genes (particularmente Crp e PerR2, dois reguladores) sugere que este sofra maior estresse oxidativo, outra característica marcante da filosfera (Lindow e Brandl 2003).

Tabela 3. Lista com genes atuantes na resposta ao estresse oxidativo nos três isolados. As três últimas colunas dizem respeito ao número de cópias de cada gene nos respectivos genomas

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
NSTR	Nitrite-sensitive transcriptional repressor NsrR	1	1	1
Fr	Ferroxidase	1	1	1
PRP	DNA binding protein starved cells-like peroxide resistance protein	2	2	2
Rex	Redox-sensitive transcriptional regulator	4	4	4
OxyR	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	1	1	1
Fnr	Fumarate and nitrate reduction regulatory protein	3	2	2
Crp	transcriptional regulator, Crp/Fnr family	2	2	2
HPII	Catalase HPII	1	1	1
HPI24	Peroxidase/catalase HPI	1	1	1
ZUR	Zinc uptake regulation protein ZUR	1	1	1
FUR	Ferric uptake regulation protein FUR	1	1	1
PerR2	Peroxide stress regulator PerR, FUR family	3	1	1
HPIIb	Catalase	1	1	1
HPI35	Peroxidase	1	1	1
SODA	Manganese superoxide dismutase	1	1	1
SODB	Superoxide dismutase [Fe]	1	1	1
SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn] precursor	1	1	1
SODM n	Superoxide dismutase [Mn]	1	1	1
GT	Glutathione S-transferase	1	1	1
GshB	Glutathione synthetase	1	1	1
Rth	Rubrerhythrin	1	1	1
CCP	Cytochrome c551 peroxidase	1	1	1

Estresse osmótico

Todas as três bactérias possuem 38 genes de resposta ao estresse osmótico (Tabela 4). Destacavam-se genes da via de captação e síntese de colina e de betaína, duas substâncias essenciais na osmoproteção em *Pseudomonas* (Velasco-Garcia *et al.*, 2006), Aquaporina Z, um canal de água transmembrana importante no equilíbrio

osmótico (Hungria *et al.*, 2009) e genes da via de síntese de glucano, um polissacarídeo que além de osmorregulador também contribui para a resistência à antibióticos (Loubens *et al.*, 1993). Esperava-se que MN1F tivesse mais recursos para lidar com estresse osmótico uma vez que a filosfera mimetiza as condições de um ambiente osmoestressante (Lindow e Brandl 2003), o que se mostrou não verdadeiro para a maioria dos genes.

Tabela 4. Lista com genes atuantes mais importantes no estresse osmótico nos três isolados. As três últimas colunas dizem respeito ao número de cópias de cada gene nos respectivos genomas

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
Aqua	Aquaporin Z	1	1	1
Glycerol	Glycerol uptake facilitator protein	1	1	1
OmpA	Outer membrane protein A precursor	1	1	1
OsmY	Osmotically inducible protein OsmY	1	1	1
BetA	Choline dehydrogenase	1	1	1
BetB	Betaine aldehyde dehydrogenase	2	2	2
BetC	Choline-sulfatase	1	1	1
CodA	Choline oxidase	1	1	1
GbsB	Alcohol dehydrogenase GbsB	2	2	2
SoxA	Sarcosine oxidase alpha subunit	1	1	1
SoxB	Sarcosine oxidase beta subunit	1	1	1
SoxD	Sarcosine oxidase delta subunit	1	1	1
SoxG	Sarcosine oxidase gamma subunit	1	1	1
MdoH	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H	1	1	1
MdoG	Glucans biosynthesis protein G precursor	1	1	1
MdoC	Glucans biosynthesis protein C	1	1	1
MdoB	Phosphoglycerol transferase I	1	1	1

Estresse térmico

As três bactérias possuem o mesmo número de genes codificando *cold-shock proteins*, proteínas expressas em resposta à queda de temperatura (Ermolenko e Makhatadze 2002), assim como *heat-shock proteins*, proteínas importantes na resposta a vários estresses como o aumento de temperatura (Schurr e Deretic 1997) (Tabela 5)

Tabela 5. Lista de genes induzidos por choque térmico. Destacam-se as Cold shock proteins com nove representantes.

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
CspA	Cold shock protein CspA	1	1	1
CspB	Cold shock protein CspB	1	1	1
CspC	Cold shock protein CspC	1	1	1
CspD	Cold shock protein CspD	1	1	1
CspE	Cold shock protein CspE	1	1	1
CspF	Cold shock protein CspF	1	1	1
CspG	Cold shock protein CspG	1	1	1
CspH	Cold shock protein CspH	1	1	1
Cspl	Cold shock protein Cspl	1	1	1
HrcA	Heat-inducible transcription repressor HrcA	1	1	1
DnaJ-fam	Chaperone protein DnaJ	1	1	1
GrpE	Heat shock protein GrpE	1	1	1
Sigma32	RNA polymerase sigma factor RpoH	1	1	1

Tolerância a metais pesados

A anotação funcional permitiu a predição de genes de tolerância a metais pesados nos três isolados assim como outras *Pseudomonas* já estudadas (Hussein *et al.*, 2004). Para melhor entendimento, separou-se os genes de tolerância em três categorias: homeostase de cobre (Tabela 6), resistência a arsênio (Tabela 7), e resistência a cobalto-zinco-cádmio (Tabela 8).

Tabela 6. Genes responsáveis pela homeostase de cobre e que são fundamentais para uma maior tolerância ao metal

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
CRTR	Cu(I)-responsive transcriptional regulator	1	1	1
CIA	Copper-translocating P-type ATPase	1	1	1
CopZ	Copper chaperone	1	1	1
MO	Multicopper oxidase	1	1	1
BCO	Blue copper oxidase CueO precursor	1	1	1
CT	Copper tolerance protein	1	1	1
Cc1	Cytochrome c family protein	1	1	1
Cc2	Cytochrome c4	1	1	1
p553	Putative diheme cytochrome c-553	1	1	1
CBPP	Copper-binding periplasmic protein	1	1	1
PCLP	putative cytochrome C-like protein	1	1	1
ErfK	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	1	1	1
Ccml	Cytochrome c heme lyase subunit CcmL	1	1	1
cycH	Cytochrome c-type biogenesis protein Cych Cytochrome c-type biogenesis protein	1	1	1
CcmG	CcmG/DsbE, thiol:disulfide oxidoreductase	1	1	1
Ccsp	Cytochrome c-type synthesis protein	1	1	1
CRD	Copper resistance protein D	6	1	1
CopC	Copper resistance protein CopC	1	1	1
CopD	Copper resistance protein CopD	1	1	1
CopG	CopG protein	1	1	1
CcmH	Cytochrome c heme lyase subunit CcmH	1	1	1
CcmF	Cytochrome c heme lyase subunit CcmF	1	1	1
Cbp	Cytochrome c-type biogenesis protein, putative	1	1	1
CRB	Copper resistance protein B	1	1	1
CSA	Copper/silver efflux P-type ATPase	1	1	1
copS	Sensor protein copS	1	1	1
copR	Transcriptional activator protein CopR	1	1	1

copCp	Copper resistance protein C precursor	1	1	1
Cc	Cytochrome c family protein	1	1	1
	Suppression of copper sensitivity: putative	1	1	1
ScsA	copper binding protein ScsA			
	Membrane protein, suppressor for copper-	1	1	1
ScsB	sensitivity ScsB			
	Secreted protein, suppressor for copper-	1	1	1
ScsC	sensitivity ScsC			
CutA	Periplasmic divalent cation tolerance CutA	1	1	1
CutC	Cytoplasmic copper homeostasis protein CutC	1	1	1
CutF	Copper homeostasis protein CutF precursor	1	1	1
CutE	Copper homeostasis protein CutE	1	1	1
CorC	Magnesium and cobalt efflux protein CorC	1	1	1

Tabela 7. Genes responsáveis pela tolerância ao arsênio.

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
arsR	Arsenical resistance operon repressor	2	1	1
arsD	Arsenical resistance operon trans-acting repressor	2	1	1
arsA	Arsenical pump-driving ATPase	2	1	1
arsB	Arsenic efflux pump protein	2	1	1
arsC	Arsenate reductase	2	1	1
ACR3	Arsenical-resistance protein	2	1	1
arsH	Arsenic resistance protein ArsH	2	1	1
Perm	Anion permease ArsB/NhaD-like	2	1	1
ArrA	Respiratory arsenate reductase, Mo binding subunit	2	1	1
ArrB	Respiratory arsenate reductase, FeS subunit	2	1	1
ArrS	Respiratory arsenate reductase cytoplasmic chaperone	2	1	1
ArsR	Arsenite-dependent transcriptional repressor	2	1	1

Tabela 8. Genes responsáveis pela tolerância a outros metais pesados como cobalto, zinco e cádmio.

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
CZCR	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	2	1	1
czcD	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	2	1	1
zitB	Zinc transporter	1	1	1
	Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily			
DMT		1	1	1
HGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase	1	1	1
Dps	Non-specific DNA-binding protein Dps	1	1	1
RtK	adherence and invasion membrane-associated protein	1	1	1
YPO	Hypothetical protein YPO2504	1	1	1
pnuCl	Ribosyl nicotinamide transporte	1	1	1
QS	Quinolinate synthetase	1	1	1
CzcA	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	2	1	1
CzcC	Heavy metal RND efflux outer membrane protein	2	1	1
SEP	Putative silver efflux pump	1	1	1
cusB	Putative copper efflux system protein	1	1	1
FP	Co/Zn/Cd efflux system membrane fusion protein	1	1	1
	Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, membrane fusion protein			
CzcB		2	1	1
nccB	Nickel-cobalt-cadmium resistance protein	1	1	1
cusA	Cation efflux system protein	1	1	1
CzrB	Zn(II) and Co(II) transmembrane diffusion facilitator	1	1	1
HME	Hypothetical protein involved in heavy metal export	1	1	1
CzrR	DNA-binding heavy metal response regulator	1	1	1
HMHK	Heavy metal sensor histidine kinase	1	1	1
	Copper-sensing two-component system response regulator			
CusR		1	1	1
CusS	Copper sensory histidine kinase	1	1	1

cusC	Cation efflux system protein	1	1	1
TRCd	Cd(II)/Pb(II)-responsive transcriptional regulator	1	1	1
TRMer	Transcriptional regulator, MerR family	1	1	1
HmrR	Heavy metal resistance transcriptional regulator HmrR	1	1	1
PAs	Zinc-resistance associated protein	1	1	1
PCT	Probable cadmium-transporting ATPase	1	1	1
CRA	Cadmium-transporting ATPase	1	1	1

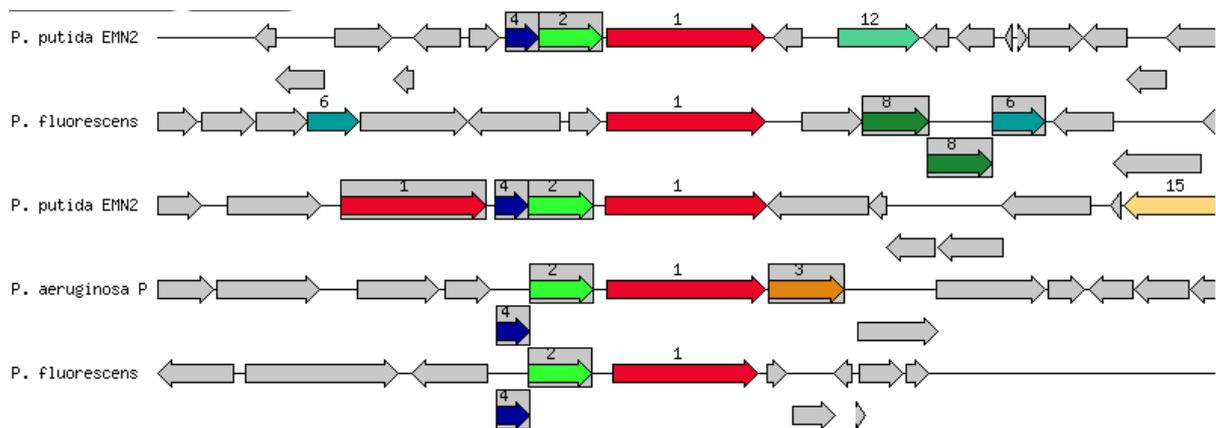
Os três isolados possuem a mesma lista de genes para as duas primeiras categorias (dentre eles chaperonas, proteínas de homeostase e citocromos) o que mostra capacidade para lidar com ambientes ricos em cobre e arsênio, como frequentemente vemos nos solos (Merry *et al.*, 1983, Bech *et al.*, 1997, BalasoIU *et al.*, 2001), no caso de MNR3A e EMN2. Já em MN1F o que chama a atenção é o número de cópias de genes chave para a tolerância. Por exemplo, o gene CRD que foi apontado como importante para a tolerância ao cobre em *P. syringae* (Nakajima *et al.*, 2002), tem 6 cópias em MN1F, enquanto que em MNR3A e EMN2 tem somente uma. Os genes Ars de resistência a arsênio têm cópias adicionais na bactéria foliar bem como os genes Czc de multirresistência a metais pesados. Tal fato sugere que a linhagem MN1F seria mais preparada para lidar com metais pesados do que as duas outras bactérias.

Aquisição de ferro

A capacidade de lidar com a deficiência de ferro é uma das principais características de *Pseudomonas*, sendo considerada uma vantagem competitiva em relação a outras bactérias (Vasil e Ochsner 1999). Essas bactérias produzem compostos de baixo peso molecular, denominado sideróforos, que são capazes de sequestrar o ferro ambiental. Espécies de *Pseudomonas* respondem a deficiência de ferro secretando sideróforos peptídicos que fluorescem em verde chamados pioverdinas. A anotação indicou a presença dos 31 genes responsáveis pela síntese do referido composto. No que diz respeito ao sistema de aquisição de ferro não dependente de pioverdina, a anotação mostrou que os isolados possuem mais ou menos o mesmo número de genes, entre 49 e 55, variando na cópia de alguns genes para a produção de hemina, uma porfirina que acomoda um íon de ferro em seu centro. O mais interessante a se notar é que EMN2 possui dois genes que codificam para dois receptores de sideróforos sem que os produza de fato: três cópias de iutA (em três locais distintos no genoma) que codificam um receptor para aerobactina (2418 pb; 806 aa; Figura 8a) e Psyr_2582 que codifica um receptor de acromobactina

dependente de TonB (2412 pb; 804 aa Figura 8b). O operon da acromobactina contém os genes AcsA, B, C, D, E e F responsáveis por sua biossíntese e que estão ausentes em EMN2.

a)



b)

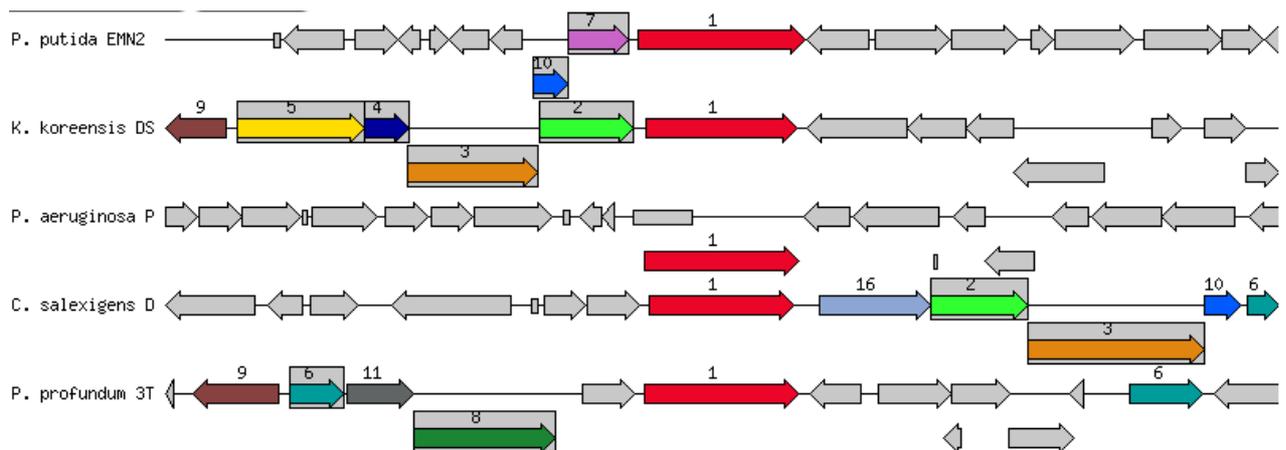


Figura 8. a) Gene do receptor da aerobactina (em vermelho) presente em várias *Pseudomonas* e com duas cópias em EMN2. b) Gene do receptor de acromobactina (em vermelho) mais raro no gênero (ausente em *P. aeruginosa*).

Situação semelhante vê-se com o operon da aerobactina que está ausente em EMN2 (genes da biossíntese iucA, B, C e D e genes dos transportadores Vat e Fhu). Interessante notar que o gene iutR que codifica o repressor de iutA também não está presente, sugerindo que o receptor da aerobactina é constantemente expresso.

O fato de termos dois receptores de sideróforos alternativos (além da pioverdina), a despeito da falta da síntese dos mesmos, sugere que EMN2 possa sequestrar aerobactina e acromobactina ligadas ao ferro de outras bactérias que as produzam, sendo assim um modo de competir pelo íon que é limitante no ambiente endofítico (Sessitsch *et al.*, 2012). Tal estratégia até o presente momento não foi descrita para bactérias associadas às plantas, mas é conhecida em patógenos animais como *Pseudomonas aeruginosa* (Liu *et al.*, 1978). Neste caso, a “captura” de

sideróforos produzidos por outrem agiria como fator de virulência melhorando o processo de invasão ao hospedeiro.

Antibióticos, bacteriocinas e defesa contra microrganismos competidores

Buscou-se genes relacionados à defesa das bactérias contra microrganismos a fim de obter-se informações quanto à capacidade de antagonizar patógenos do cafeeiro. MN1F tem um gene de beta-lactamase (BL) e três cópias do gene repressor *blaI* o que sugere resistência aos antibióticos betalactâmicos, como a penicilina, produzidos por fungos. Além disso, ela possui o cluster relacionado à produção de colicina V, uma bacteriocina peptídica que mata células sensíveis ao ajudar a romper a membrana plasmática (Cascales *et al.*, 2007) (Figura 9).

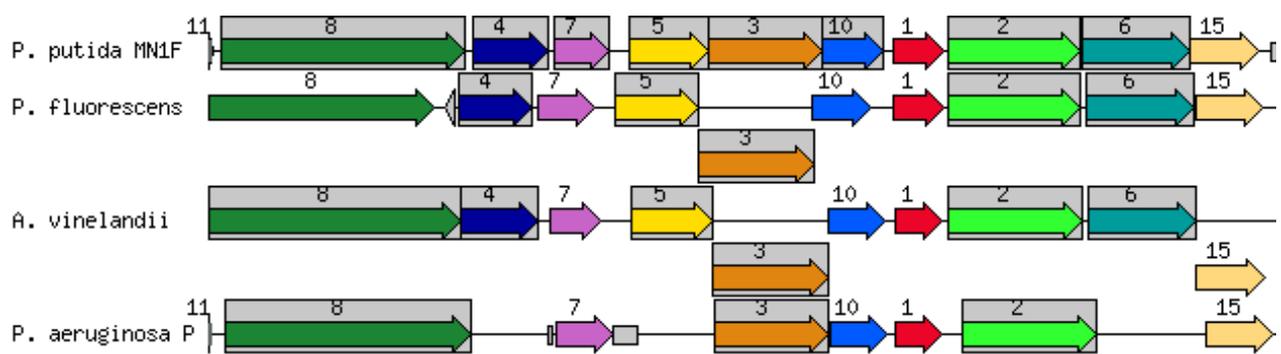


Figura 9. Cluster para produção de colicina V. 4 em azul escuro) tRNA pseudouridina sintase A. 5 em amarelo) Acetil-coenzima A carboxil transferase beta chain. 3 em laranja) Dihidrofolato sintase. 10 em azul claro) DedD protein. 1 em vermelho) Colicina V production protein

Já EMN2 e MNR3A possuem genes de resistência a multidrogas (Tabela 9), ou seja, responsáveis por evitar danos de diversos antibióticos, principalmente pela ação de bombas de efluxo (RND) onde o antibiótico é jogado para fora da célula antes que cause qualquer dano.

Tabela 9. Genes de resistência a multidrogas encontradas nos isolados

Gene	Produto	MN1F (Nº cópias)	EMN2 (Nº cópias)	MNR3A (Nº cópias)
CmeA	RND efflux system, membrane fusion protein	0	1	1
CmeB	RND efflux system, inner membrane transporter	0	1	1
TolC	Type I secretion outer membrane protein	0	1	1
MDR	Multi antimicrobial extrusion protein (Na(+)/drug			
Pump	antiporter)	0	1	1
OML	RND efflux system	0	1	1
AcrB	Acriflavin resistance protein	0	1	1
MexD	Multidrug efflux RND transporter MexD	0	1	1
MexC	Multidrug efflux RND membrane fusion protein	0	1	1
NfxB	Transcriptional regulator NfxB	0	1	1

Além disso, encontrou-se em profusão genes que possivelmente indicam produção de peptídeos não-ribossomais (nrp), metabólitos secundários que podem ser pigmentos, antibióticos, bacteriostáticos, etc (Schwarzer *et al.*, 2003). Segundo o AntiSMASH, MN1F produziria 2 bacteriocinas e 2 nrps, EMN2 produziria 6 bacteriocinas e 7 nrps e MNR3A produziria 4 bacteriocinas e 6 nrps. Vê-se, portanto que as bactérias rizosférica e endofítica podem produzir maior quantidade de bacteriocinas e nrps o que sugere que nestes ambientes a competição com outras bactérias é muito mais intensa que na folha.

Interação planta/bactéria

Como as bactérias aqui estudadas foram isoladas de ambientes diretamente (raiz) ou indiretamente (rizosfera e filosfera) influenciados pela planta, fez-se necessária uma análise mais aprofundada de aspectos que se relacionam com a interação planta/bactéria. São eles: mobilidade e fixação nos respectivos ambientes; sistemas de secreção; produção do hormônio vegetal auxina; capacidade de degradar hormônios vegetais sinalizadores como etileno e salicilato; capacidade de degradar fitocompostos. Cada um será detalhado a seguir.

Mobilidade e fixação

Sistemas de mobilidade e fixação foram encontrados nos três genomas. Verificou-se que MN1F e EMN2 possuem genes que atuam na produção de curli (genes CsgB, G, F e F), componente proteínico da matriz extra-celular de diversas bactérias (Chapman *et al.*, 2002). Genes responsáveis pelo flagelo foram encontrados nos três genomas, sendo que MNR3A tem 57 genes, EMNR2 tem 51 e MN1F tem 50, variando

quanto ao número de cópias de determinados genes. Surpreendentemente, MN1F não produz *pilus*, apêndice requerido para a conjugação bacteriana, já que não possui nenhum gene responsável pela sua síntese. Por outro lado MNR3A tem 15 genes e EMN2 tem 11, variando também quanto ao número de cópias de determinados genes.

Sistemas de secreção

Com relação aos sistemas de secreção, foram identificados os sistemas de secreção I e VI (T1SS e T6SS), o primeiro envolvido no transporte de íons, drogas e proteínas para o ambiente extracelular e o segundo responsável pela produção e secreção de moléculas efetoras que agirão no hospedeiro (Ho *et al.*, 2014). Há a prevalência de genes codificando proteínas do T6SS na bactéria de filosfera (MN1F, 30), mas principalmente de rizosfera (MNR3A, 54) em comparação com a de endosfera da raiz (EMN2, 22), como vê-se na tabela 10.

Tabela 10. Sistemas de secreção e seus respectivos genes presentes em a) MN1F b) EMN2 c) MNR3A. Cada gene aparenta possuir apenas uma cópia em cada genoma

a)

	Tamanho (pb)
T1SS	
T1SS secreted agglutinin RTX	11496
Membrane fusion protein LapC	1185
ATPase, LssB family LapB	2169
Outer membrane component LapE	1434
Membrane bound c-di-GMP receptor LapD	1944
T6SS	
VgrG protein	1836
IcmF-related protein	3579
Uncharacterized protein ImpA	1428
Type VI secretion protein VasI	168
Uncharacterized protein ImpB	504
Uncharacterized protein ImpC	1491
Uncharacterized protein similar to VCA0109	408
Protein ImpG/VasA	1767
Uncharacterized protein ImpH/VasB	1017
Uncharacterized protein ImpI/VasC	549
Type VI secretion lipoprotein/VasD	795
Uncharacterized protein ImpJ/VasE	1338

VgrG protein	1857
Uncharacterized protein ImpB	540
Uncharacterized protein ImpC	1503
Uncharacterized protein ImpF	483
Protein ImpG/VasA	1821
Uncharacterized protein ImpH/VasB	1071

b)

	Tamanho (pb)
T1SS	
Outer membrane component LapE	1308
ATPase, LssB family LapB	2145
Membrane fusion protein LapC	1356
Membrane bound c-di-GMP receptor LapD	1947
T1SS associated transglutaminase-like cysteine proteinase LapP	624
T1SS secreted agglutinin RTX	2868
T6SS	
Uncharacterized protein ImpA	1557
Uncharacterized protein ImpB	501
Uncharacterized protein ImpC	1473
Uncharacterized protein similar to VCA0109	423
Protein ImpG/VasA	1788
Uncharacterized protein ImpH/VasB	1008
ClpB protein	2619
Sigma-54 dependent transcriptional regulator	1521
Uncharacterized protein Impl/VasC	1182
Type VI secretion lipoprotein/VasD	507
Uncharacterized protein ImpJ/VasE	1299
Uncharacterized protein ImpJ/VasE	1299
IcmF-related protein	3528
VgrG protein	1983
Sigma-54 dependent transcriptional regulator	1299

c)

	Tamanho (pb)
T1SS	
ATPase, LssB family LapB	2145
T1SS secreted agglutinin RTX	7143
T1SS secreted agglutinin RTX	3609
Membrane bound c-di-GMP receptor LapD	1947
T1SS associated transglutaminase-like cysteine proteinase LapP	669
Outer membrane component LapE	1338
Membrane fusion protein LapC	1377
T6SS	
VgrG-3 protein	1935
ClpB protein	2673
Uncharacterized protein ImpH/VasB	999
Protein ImpG/VasA	1863
Uncharacterized protein ImpF	516
Uncharacterized protein ImpD	489
Uncharacterized protein ImpC	1494
Uncharacterized protein ImpB	516
Uncharacterized protein ImpA	1038
Protein phosphatase ImpM	714
IcmF-related protein	2658
IcmF-related protein	894
Outer membrane protein ImpK/VasF, OmpA/MotB domain	1287
Uncharacterized protein ImpJ/VasE	1332
Uncharacterized protein ImpI/VasC	1398
VgrG protein	1962
ClpB protein	2646
Uncharacterized protein ImpH/VasB	1044
Sigma-54 dependent transcriptional regulator	1077
Uncharacterized protein ImpI/VasC	510
Type VI secretion lipoprotein/VasD	498
Uncharacterized protein ImpJ/VasE	1335
Outer membrane protein ImpK/VasF, OmpA/MotB domain	1308

Vê-se no T1SS a prevalente presença dos genes *Lap*, responsáveis por codificar proteínas de membrana importantes na adesão, tanto em bactérias patogênicas quanto promotoras de crescimento (Vodovar *et al.*, 2006). Os *clusters* do T6SS são bastante conservados em *Pseudomonas*, incluindo os genes Clp, Vgr e Fap. Muitos destes *clusters*, e que estão presentes nos três isolados, tem sido relacionados à regulação da interação planta-bactéria principalmente entre patógeno e hospedeiro (Pukatzki *et al.*, 2009). No entanto recentemente descobriu-se que o T6SS está também envolvido em interações benéficas/neutras como mutualismo e comensalismo com o eucarioto e interações competitivas entre outras bactérias (Jani e Cotter 2010). Nos casos dos três isolados aqui estudados, a falta de genes de virulência aponta para uma interação benéfica (Bingle *et al.*, 2008).

Ácido indolacético (IAA)

Dentre uma das principais características de *Pseudomonas* e de várias bactérias associadas às plantas está a produção de auxina, mas especificamente de ácido índole-acético (IAA), um hormônio capaz de promover o crescimento vegetal. Como demonstrado via análise bioquímica anteriormente, os genomas das bactérias analisadas confirmaram a presença das enzimas responsáveis pela síntese de IAA via dependente de triptofano (Figura 10).

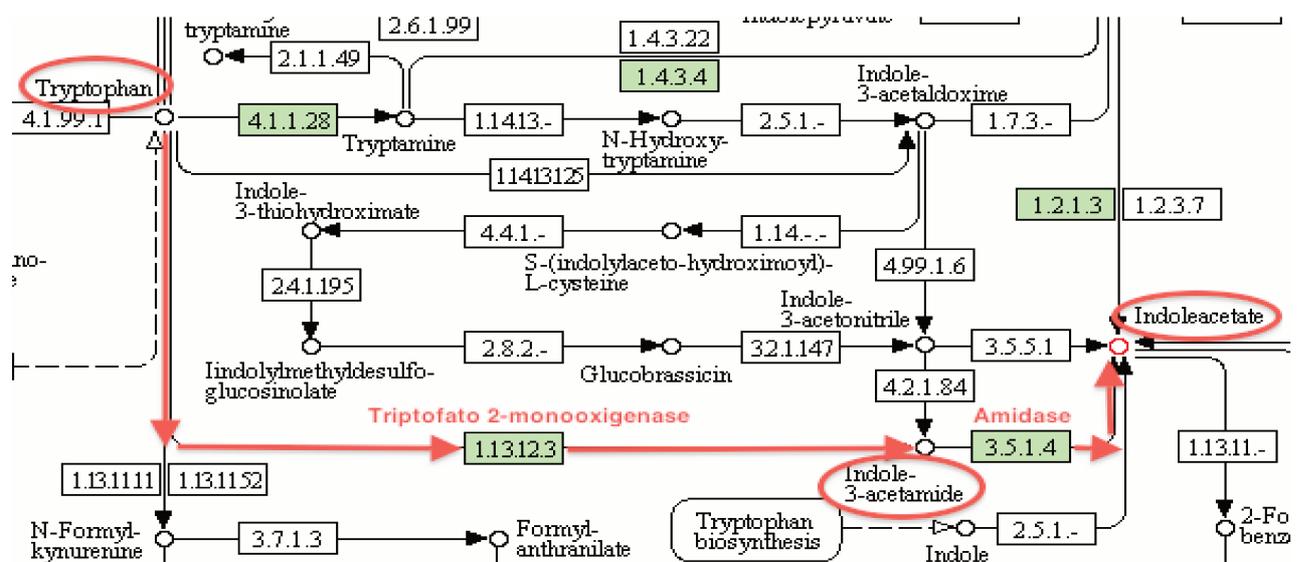


Figura 10. Fragmento do KEGG Map da síntese de IAA (Indoleacetate) dependente de triptofano comum a MN1F, EMN2 e MNR3A. As setas e os círculos em laranja indicam o caminho da reação e os produtos destas respectivamente.

Uma parte do triptofano presente na célula bacteriana é transformado em indol 3-acetamida pela enzima triptofano 2-monooxigenase para depois transformar-se em indolacetato (IAA) pela enzima amidase. Dependendo da situação o IAA produzido é então liberado pela bactéria nos tecidos da planta. Microrganismos patogênicos

(fungos inclusos) biotróficos tendem a usar este aporte de IAA para gerar hiperplasia nos hospedeiros, aumentando o tecido infectável (Maor e Shirasu 2005). No caso de bactérias promotoras de crescimento, há utilização desta estratégia também para gerar hiperplasia, porém num nível que não comprometa a planta, até auxiliando no seu crescimento, principalmente das raízes (Tan e Zou 2001). Em MN1F, por ser filosférica, sugere-se que a produção de IAA contribua para gerar pequenos pontos de extravasamento nas células das folhas, permitindo que o conteúdo intracelular fique a sua disposição, como foi demonstrado por estudos anteriores em outras plantas (Lindow e Brandl 2003). Seria assim mais uma estratégia de MN1F para sobreviver num ambiente pobre em recursos.

ACC deaminase

Também foram achados nos três genomas uma cópia do gene que codifica a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase) (Figura 11), responsável por catalisar a reação $1\text{-aminociclopropano-1-carboxilato} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{-oxobutanoato} + \text{NH}_3$ onde 1-aminociclopropano-1-carboxilato funciona como precursor na síntese de etileno, importante hormônio vegetal.

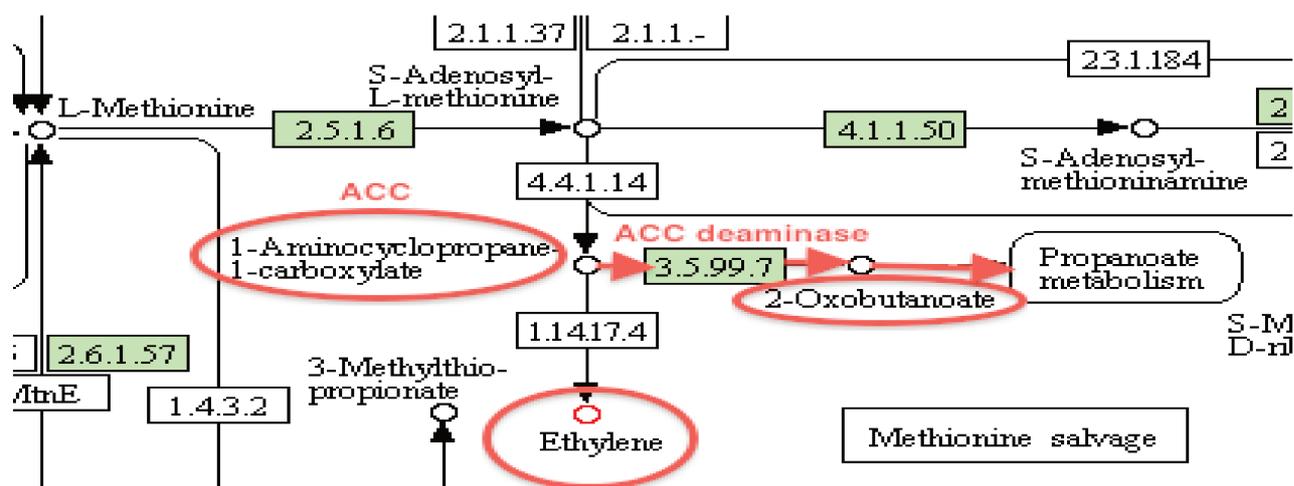


Figura 11. Fragmento do KEGG Map da ação negativa da enzima ACC deaminase na produção de etileno vegetal.

Nas plantas o etileno é produzido a partir do aminoácido L-metionina que é transformado em S-Adenosil - L-metionina e 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) este dará origem ao etileno. Tal hormônio é bastante liberado quando a planta está sob estresse, principalmente hídrico, e tem como principal efeito o encurtamento das raízes e a inibição do fechamento dos estômatos (Glick *et al.*, 1998). Deste modo, nesta situação o etileno torna-se prejudicial porque agrava o quadro de déficit hídrico ao estancar o crescimento radicular e permitir a perda de água nas folhas. O que certas bactérias fazem, e este é o caso das três estudadas, é “cortar” a via de síntese de

etileno ao transformar o ACC, via ACC deaminase, em 2-Oxobutanoato que será utilizado no metabolismo de propanoato. Assim, indiretamente os níveis de etileno vegetal caem e poupam os tecidos mais sensíveis dos danos que ele acarreta. Já se sabe há bastante tempo que bactérias que possuem a ACC deaminase quando inoculadas em plantas submetidas a estresse hídrico, tendem a retardar e minimizar os danos que por ventura acometessem os hospedeiros (Penrose e Glick 2003). Sugere-se que estes isolados possam ser também usados em futuros experimentos desta natureza no cafeeiro.

Degradação de ácido cinâmico

Um resultado bastante curioso é a presença na bactéria foliar MN1F de dez genes responsáveis pela via de degradação de ácido cinâmico (Tabela 11).

Tabela 11. Genes da via de quebra do ácido cinâmico em MN1F

Gene	Produto
HcaA1	3-phenylpropionate dioxygenase, alpha subunit
HcaA2	3-phenylpropionate dioxygenase, beta subunit
HcaB	2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-phenylpropionate dehydrogenase
HcaC	3-phenylpropionate dioxygenase ferredoxin subunit
HcaD	3-phenylpropionate dioxygenase ferredoxin--NAD(+) reductase component
MhpC	2-hydroxy-6-ketono-2,4-dienedioic acid hydrolase
MhpD	2-keto-4-pentenoate hydratase
MhpE	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
MhpF	Acetaldehyde dehydrogenase
MhpB	3-carboxyethylcatechol 2,3-dioxygenase

Ácido cinâmico é um composto orgânico encontrado em diversas plantas como karité, caneleira, bálamo e cafeeiro. A partir dele se derivam os ácidos clorogênicos, bastante encontrados nos frutos e nas folhas do cafeeiro, sendo responsáveis por muitas das qualidades nutraceuticas do café (Farah e Donangelo 2006). Não obstante, o ácido cinâmico bem como seus derivados tem demonstrado serem fortes inibidores do crescimento bacteriano (Dorantes *et al.*, 2008). Não era de se espantar que seriam encontrados grupos de bactérias capazes de degrada-lo, seja quebrando-o efetivamente ou mesmo não permitindo sua síntese, degradando um precursor (Van Beek e Priest 2000). No caso de MN1F (Figura 12), a anotação revelou que há em seu genoma os genes HcaA1, HcaA2, HcaC e HcaD responsáveis pela enzima 3-

fenilpropionato deoxigenase que age na primeira parte da via de degradação. Também se verificou a presença dos genes HcaB e MhpB responsáveis respectivamente pelas enzimas 2,3 - dihidroxi - 2,3 -dihidro - fenilpropionato dehidrogenase e 3 - carboxietilcatecol 2,3 - dioxigenase que agem na segunda e terceira partes da via. E por fim também se verificou a presença do cluster MhpCDEF responsáveis pela transformação final em acetil-CoA disponibilizada para o ciclo de Krebs. A presença dessa via completa em MN1F sugere uma adaptação desta para viver nas folhas do cafeeiro que são ricas em ácido cinâmico. Deste modo, a bactéria evita os efeitos deletérios do ácido nas suas células e incorpora-o como mais uma fonte de carbono. O fato de EMN2 e MNR3A não possuírem nenhum dos genes supracitados reforça a tese já que a raiz e a rizosfera são muito pobres em ácido cinâmico (Farah e Donangelo 2006).

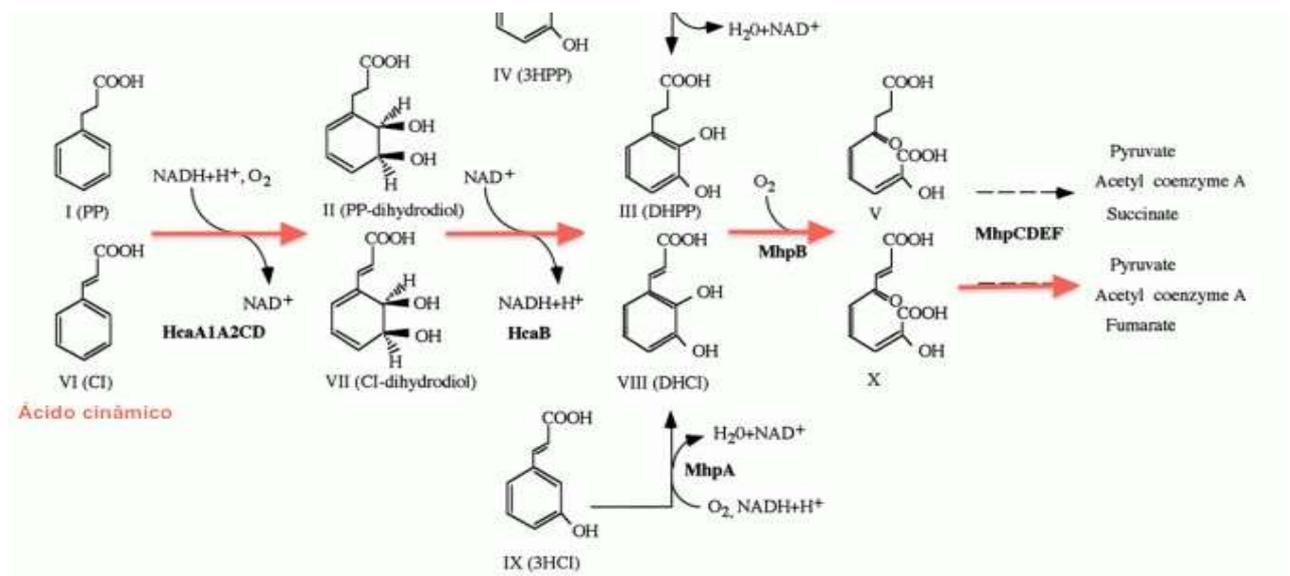


Figura 12. Via de degradação do ácido cinâmico encontrada em MN1F. As setas em laranja indicam o caminho percorrido pelo ácido cinâmico para ser degradado em acetil-CoA.

Degradação de salicilato

A anotação também revelou que MN1F e MNR3A possuem a enzima salicilato hidroxilase, também conhecida salicilato 1-monooxigenase responsável pela transformação de salicilato em catecol. O ácido salicílico é um importante hormônio vegetal que está ligado não só ao crescimento e desenvolvimento, mas principalmente na mediação das relações planta-patógeno, induzindo a produção de PRPs (**P**athogenesis-**R**elated **P**roteins) e contribuindo para a resistência sistêmica adquirida (SAR) (Molinari 2007). O fato de MN1F e MNR3A serem capazes de barrar esta sinalização cortando o mensageiro (salicilato) sugere uma adaptação para resistir ao ataque do sistema de defesa da planta, o que indica que o cafeeiro enxergaria estas

duas bactérias como possíveis patógenos e não comensais como EMN2. Na literatura já foi largamente descrito que a presença desta enzima em microrganismos associado às plantas (comensais, patógenos e mesmo simbioses) é importante para evitar o sistema de defesa da planta (Ambrose *et al.*, 2015). Olhando por outra perspectiva, espanta o fato de EMN2 não possuir a salicilato hidroxilase e nem outra enzima que aja contra a síntese de SA, sendo que esta bactéria teoricamente viveria em contato mais íntimo com a planta em comparação com MN1F e MNR3A. Como dito anteriormente, é possível que o hospedeiro não “enxergue” EMN2 como invasor, sugerindo que esta tenha outros mecanismos ainda não conhecidos para burlar a defesa do cafeeiro.

Conclusões da abordagem “B”

Os três isolados mostraram várias semelhanças entre si mas também características que os remetem aos locais dos quais foram isolados. Algumas características de MNR3A condizem com as características de uma bactéria rizosférica como um desenvolvido Sistema de Secreção VI e capacidade para burlar o sistema imune vegetal. O fato de produzir auxina e pioverdina além de quebrar ACC provavelmente o caracterizaria como promotor de crescimento. Já EMN2 teria um sistema de burlagem menos evidenciado o que sugere um relacionamento mais íntimo com o hospedeiro. Colonizaria a planta fixando-se fortemente na superfície da célula vegetal, provavelmente também promovendo seu crescimento pela produção de auxina, quebra de ACC e competição por ferro livre (tanto pela produção de pioverdina quanto pelo sequestro de acromobactina e aerobactina). Por fim, MN1F lidaria muito bem com metais pesados e estresse oxidativo além de ser capaz de usar fitocompostos abundantes nas folhas do cafeeiro como fontes secundárias de carbono. É preciso ressaltar que tais inferências precisam de confirmação primeiramente pelo sequenciamento completo dos genomas, utilizando a técnica PacBio por exemplo, e em seguida por ensaios funcionais.

Conclusões gerais

O presente trabalho buscou entender como as bactérias se relacionam com o cafeeiro em dois níveis:

- 1) Em nível de comunidade onde o cultivar de cafeeiro e a concentração de minerais nas suas folhas parecem modular quais bactérias as habitam, o que reforça a tese de que a flutuação na comunidade bacteriana tem certa regulação por parte da planta, ainda que a mesma possa ser indireta.
- 2) Em nível genômico onde ao analisar o genoma de três bactérias isoladas de três ambientes distintos da mesma planta, foram identificadas características capazes de relacioná-las com seus respectivos nichos, notadamente a bactéria filosférica.

Perspectivas

Os dados conseguidos na abordagem “A”, onde manganês e cálcio parecem modular a comunidade bacteriana nas folhas do cafeeiro, apontam para a necessidade de uma verificação mais detalhada. Pensou-se em um experimento onde as concentrações dos dois metais possam ser alteradas para verificar, do mesmo modo que foi feito neste trabalho, se a comunidade bacteriana se altera ou não. Também é possível verificar se em outras plantas do gênero *Coffea* ou plantas de locais de coleta diferentes exibem este mesmo comportamento. Em última estância, acreditamos que a correlação entre bactérias e minerais pode auxiliar na manipulação das comunidades bacterianas visando aumento de resistência a patógenos, através do manejo de nutrientes do cafeeiro

No caso da abordagem “B” a ação mais imediata seria completar os genomas a fim de ter maior segurança nos dados conseguidos. Paralelamente um teste de promoção de crescimento também pode ser feito, inoculando sementes do cafeeiro com os três isolados estudados, verificando quais são melhores promotores de crescimento. De modo semelhante à abordagem “A”, pode-se tentar isolar *Pseudomonas* de outras espécies de cafeeiro e em outros locais, seguindo a mesma metodologia aqui descrita, estudando seus genomas e correlacionando-os com os ambientes os quais foram isoladas, num estudo ainda pioneiro de pan-genômica no cafeeiro. Buscaria-se assim entender como *Pseudomonas* spp evoluíram e evoluem no seu relacionamento com a planta e como isso pode ser aproveitado para beneficiar o crescimento vegetal.

Bibliografia

ABIC - <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=49> - acessado em dezembro de 2015

Ambrose, K. V., Tian, Z., Wang, Y., Smith, J., Zylstra, G., Huang, B., Belanger, F. C. (2015). Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Scientific reports*, 5.

Anjum, N.A., Singh H.P., Khan, M.I., Masood, A., Per, T.S., Negi, A., Batish, D.R., Khan, N.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad I. (2015). Too much is bad--an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(5):3361-3382.

Anthony, F., Bertrand, B., Quiros, O., Wilches, A., Lashermes, P., Berthaud, J., Charrier, A. (2001). Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*, 118(1), 53-65.

Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., van Elsas, J. D., van Vuurde, J. W., Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4906-4914.

Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Meyer, F. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.

Balasoïu, C. F., Zagury, G. J., Deschenes, L. (2001). Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. *Science of the Total Environment*, 280(1), 239-255.

Bech, J., Poschenrieder, C., Llugany, M., Barceló, J., Tume, P., Tobias, F. J., Vásquez, E. R. (1997). Arsenic and heavy metal contamination of soil and vegetation around a copper mine in Northern Peru. *Science of the Total Environment*, 203(1), 83-91.

- Bell, C. R., Dickie, G. A., Harvey, W. L. G., Chan, J. W. Y. F. (1995). Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian journal of Microbiology*, 41(1), 46-53.
- Bingle, L. E., Bailey, C. M., Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current opinion in microbiology*, 11(1), 3-8.
- Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., Weber, T. (2013). antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic acids research*, gkt449.
- Bodenhause, N., Horton, M. W., Bergelson, J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 8(2), e56329.
- Borodovsky, M., McIninch, J. (1993). Parallel Gene. Recognition for both DNA Strands. *Computational Chemistry*, 17, 123–133.
- Bringel F, Couée I. (2015). Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Front Microbiol.* 22;6:486.
- Bulgarelli D, Schlaeppli K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol.* 64:807-838.
- Caldwell, A.C., Silva, L.C., da Silva, C.C., Ouverney, C.C. (2015) Prokaryotic Diversity in the Rhizosphere of Organic, Intensive, and Transitional Coffee Farms in Brazil. *PLoS One.* 10(6):e01063
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158-229.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Hultgren, S. J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295(5556), 851-855.

- Chelius, M. K., Triplett, E. W. (2001). The Diversity of *Archaea* and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 41(3), 252-263.
- Choi, E.N., Cho, M.C., Kim, Y., Kim, C.K., Lee, K. (2003). Expansion of growth substrate range in *Pseudomonas putida* F1 by mutations in both *cymR* and *todS*, which recruit a ring-fission hydrolase *CmtE* and induce the *tod* catabolic operon, respectively. *Microbiology* 149: 795–805.
- Clarke, P. H. (1982). The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 48(2), 105-130.
- Collado, S., Rosas, I., González, C., Diaz, M. (2015). Biodegradation of p-hydroxybenzoic acid by *Pseudomonas putida*. *Desalination and Water Treatment*, 1-11.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674-36766.
- Cooley, M.B., Miller, W.G., Mandrell, R.E. (2003). Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl Environ Microbiol.* Aug;69(8):4915-26.
- Cornelis P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. (2010). *Appl Microbiol Biotechnol.*1637-1645.
- DaMatta, F. M., Ramalho, J. D. C. (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 55-81.
- Delcher, A.L., Bratke, K.A., Powers, E.C., Salzberg, S.L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* 23, 673–679.
- Dobney, S., Chiasson, D., Lam, P., Smith, S.P., Snedden, W.A. (2009). The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *J Biol Chem.* 284(46):31647-31657.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 414-424

Dodd, A.N., Kudla, J., Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol.* 61:593-620.

Dorantes, L., Araujo, J., Carmona, A., Hernández-Sánchez, H. (2008). Effect of Capsicum Extracts and Cinnamic Acid on the Growth of Some Important Bacteria in Dairy Products. In *Food Engineering: Integrated Approaches* (pp. 337-344). Springer New York.

Ermolenko, D. N., Makhatadze, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(11), 1902-1913.

Farah, A., Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23-36.

Fazuoli, L.C., Carvalho, C.S., Carvalho, G.R. (2008). Cultivares de café arábica de porte alto. In Carvalho CHS (ed) *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Embrapa Café, Brasília. pp. 157-226.

Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Balkwill, D. L., Kennedy, D., Shu-mei, W. L., Kostandarithes, H. M., Brockman, F. J. (2004). Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford Site, Washington State. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4230-4241.

Gilliham, M., Dayod, M., Hocking, B.J., Xu, B., Conn, S.J., Kaiser, B.N, Leigh, R.A., Tyerman, S.D. (2011). Calcium delivery and storage in plant leaves: exploring the link with water flow. *J Exp Bot.* 62(7):2233-2250.

Glassner, H., Zchori-Fein, E., Compant, S., Sessitsch, A., Katzir, N., Portnoy, V., & Yaron, S. (2015). Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). *FEMS microbiology ecology*, 91(7), fiv074.

Glick, B. R., Penrose, D. M., Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-68.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.

Gross, D. C., Cody, Y. S., Proebsting, E. L., Rademaker, G. K., Spotts, R. A. (1983). Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards. *Applied and environmental microbiology*, 46(6), 1370-1379.

Haas, D., Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3, 307-319.

Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E., McFeters, G. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular microbiology*, 34(5), 1082-1093.

Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., & Ausubel, F. M. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants*.

Hooper, L. V., Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.

Hungria, M., Nicolás, M. F., Guimarães, C. T., Jardim, S. N., Gomes, E. A., Vasconcelos, A. T. (2004). Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res*, 3, 102-116.

Ho, B. T., Dong, T. G., Mekalanos, J. J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe*, 15(1), 9-21.

Hunter, P.J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J.M., Bending, G.D. (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca Species*) phyllosphere. *Appl Environ Microbiol.* 76(24):8117-8125.

Hussein, H., Ibrahim, S. F., Kandeel, K., & Moawad, H. (2004). Biosorption of heavy metals from wastewater using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(1), 30-37.

Jackson, C. R., Denney, W. C. (2011). Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacterial community associated with leaves of the southern magnolia (*Magnolia grandiflora*). *Microbial ecology*, 61(1), 113-122.

Jakubas, W. J., Mason, J. R. (1991). Role of avian trigeminal sensory system in detecting coniferyl benzoate, a plant allelochemical. *Journal of chemical ecology*, 17(11), 2213-2221.

Jani, A. J., Cotter, P. A. (2010). Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell host & microbe*, 8(1), 2-6.

Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.

Kadivar, H., Stapleton, A. E. (2003). Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microbial ecology*, 45(4), 353-361.

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301-307.

Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco, C., Vorholt, J. A. (2010). Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *The ISME journal*, 4(6), 719-728.

Lambais, M. R., Crowley, D. E., Cury, J. C., Büll, R. C., Rodrigues, R. R. (2006). Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. *Science*, 312(5782), 1917-1917.

- Lashermes, P., Combes, M. C., Robert, J., Trouslot, P., D'hont, A., Anthony, F., Charrier, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(2), 259-266.
- Li, Q., Chen, L.S., Jiang, H.X., Tang, N., Yang, L.T. (2010) Effects of manganese-excess on CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. *BMC Plant Biol* 10:42.
- Lidon, F. (2001). Tolerance of rice to excess manganese in the early stages of vegetative growth. Characterization of manganese accumulation. *J. Plant Physiol.* 158, 1341-1348.
- Lindow, S. E., Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1875-1883.
- Liu, P. V., Shokrani, F. A. T. E. M. E. H. (1978). Biological activities of pyochelins: iron-chelating agents of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 22(3), 878-890.
- Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M., Fromin, N. (2002). Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S–23S rDNA spacer. *Systematic and applied microbiology*, 25(2), 220-227.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R., Taghavi, S., Mezgeay, M., der Lelie, D. V. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 583-606.
- Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J. M., Bohin, J. P. (1993). Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Molecular microbiology*, 10(2), 329-340.
- Lowe, T.M., Eddy, S.R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* 25, 955–64.

Lovell, C. R., Piceno, Y. M., Quattro, J. M., Bagwell, C. E. (2000). Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3814-3822.

Lugtenberg, B. (2015). Life of Microbes in the Rhizosphere. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 7-15). Springer International Publishing.

Lukashin A., Borodovsky, M. (1998). GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Research* 26, 1107–1115.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D., Bryant, S.H. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Research* 35:D237-D240.

Marilley, L., Vogt, G., Blanc, M., Aragno, M. (1998). Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant and soil*, 198(2), 219-224.

Morimoto, H., Kuwano, M., Kasahara, Y. (2013) Gene expression profiling of *Pseudomonas putida* F1 after exposure to aromatic hydrocarbon in soil by using proteome analysis. *Archives of microbiology*, 195(12), 805-813.

Maor, R., Shirasu, K. (2005). The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 399-404.

Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion of Genetics and Development* 15(6), 589-594.

Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., Araujo, W. L., Raaijmakers, J. M. (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7259-7267.

- Merry, R. H., Tiller, K. G., Alston, A. M. (1983). Accumulation of copper, lead and arsenic in some Australian orchard soils. *Soil Research*, 21(4), 549-561.
- Miller, S. H., Mark, G. L., Franks, A., O'Gara, F. (2008). *Pseudomonas*–plant interactions. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*, 353-376.
- Molinari, S. (2007). New developments in understanding the role of salicylic acid in plant defence. *CAB Rev*, 67, 1-10.
- Mondego, J. M., Vidal, R. O., Carazzolle, M. F., Tokuda, E. K., Parizzi, L. P., Costa, G. G Pereira, G. A. (2011). An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC plant biology*, 11(1), 30.
- Mulet, M., Lalucat, J., García- Valdés, E. (2010). DNA sequence- based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- Nakajima, M., Masao, G. O. T. O., Tadaaki, H. I. B. I. (2002). Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae and *P. syringae* pv. tomato. *Journal of general plant pathology*, 68(1), 68-74.
- Nakazawa, T. (2002). Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environmental Microbiology* 4, 782–786.
- Naseby, D.C., Way, J.A., Bainton, N.J., Lynch, J.M. (2001). Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *Journal of Applied Microbiology* 90, 421-429.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Brinkac, L. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799-808.
- Ogata, H. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 27, 29-34.

Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., de Vrind-de Jong, E.W., de Vrind, J.P., Corstjens, P.L. (1997). Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4793–4799.

Oliveira, M.N., Santos, T.M, Vale, H.M., Delvaux, J.C., Cordero, A.P., Ferreira, A.B., Miguel, P.S., Tótola, M.R., Costa, M.D., Moraes, C.A., Borges, A.C. (2013). Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can J Microbiol.*;59(4):221-230.

Page V, Feller U. (2005). Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Ann Bot.* 96(3):425-434.

Parker, D.L., Lee, S.W., Geszvain, K., Davis, R.E., Gruffaz, C., Meyer, J.M., Torpey, J.W., Tebo, B.M. (2014). Pyoverdine synthesis by the Mn(II)-oxidizing bacterium *Pseudomonas putida* GB-1. *Front Microbiol.* 7;5:202.

Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S., Mavrodi, D.V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., WatkinsK, T.K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Thomashow, L.S., Loper, J.E. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* 23, 873-878.

Patten, C. L., Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8), 3795-3801.

Penrose, D. M., Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase- containing plant growth- promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1), 10-15.

- Pukatzki, S., McAuley, S. B., Miyata, S. T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 11-17.
- Qi, M., Wang, D., Bradley, C. A., Zhao, Y. (2011). Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine pseudomonads. *PLoS One* 6(1), e16451.
- Rengel Z. (2000). Manganese uptake and transport in plants. *Met Ions Biol Syst.* 37:57-87.
- Rodriguez, F., Pfender, W.F. (1997). Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and *in planta*. *Phytopathology*, 87, 614-621.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2004). Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of microbiology*, 181(5), 337-344.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.
- Schwarzer, D., Finking, R and Marahiel, M.A (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Products Reports*. 20 (3): 275–87.
- Schurr, M. J., Deretic, V. (1997). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co- ordinate regulation of heat- shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 24(2), 411-420.
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T Hurek, T. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 28-36.
- Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10(5), R51.

Siguier, P., Pérochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic acids research*, *34*(suppl 1), D32-D36.

Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cárdenas- Vargas, S., Saavedra- Barrera, R., & Durán, D. C. (2013). GC–MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of separation science*, *36*(17), 2901-2914.

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology* *75*, 748–757.

Tan, R. X., Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, *18*(4), 448-459.

Tan, G.Y.A., Chen, C.L., Ge, L., Li, L., Tan, S.N., Wang, J.Y. (2015). Bioconversion of styrene to polyhydroxyalkanoate (PHA) by the new bacterial strain *Pseudomonas* NBUS12. *Microbes and Environments*, *30*(1), 76

Telias, A., White, J. R., Pahl, D. M., Ottesen, A. R., Walsh, C. S. (2011). Bacterial community diversity and variation in spray water sources and the tomato fruit surface. *BMC microbiology*, *11*(1), 81.

Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *102*(39), 13950-13955.

Thompson, I. P., Bailey, M. J., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Lilley, A. K., Lynch, J. M., Whipps, J. M. (1993). Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil*, *150*(2), 177-191.

- Troxell, B., Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- Vaast, P., Angrand, J., Franck, N., Dauzat, J., Génard, M. (2005). Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. *Tree Physiol.* 25(6):753-760.
- Van Beek, S., Priest, F. G. (2000). Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5322-5328.
- Vasil, M. L., Ochsner, U. A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular microbiology*, 34(3), 399-413.
- Vaughan, M.J., Mitchell, T., McSpadden-Gardener, B.B. (2015). What's Inside That Seed We Brew? A New Approach To Mining the Coffee Microbiome. *Appl Environ Microbiol.* 81(19):6518-6527.
- Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F., Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal of Basic Microbiology* 45(5), 371-380.
- Velasco-García, R., Villalobos, M. A., Ramírez-Romero, M. A., Mujica-Jimenez, C., Iturriaga, G., & Munoz-Clares, R. A. (2006). Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Archives of microbiology*, 185(1), 14-22.
- Villalobos, M., Lanson, B., Manceau, A., Toner, B., and Sposito, G. (2006) Structural model for the biogenic Mn oxide produced by *Pseudomonas putida*. *American Mineralogist*, 91, 489–502.
- Vilanova, C., Iglesias, A., Porcar, M. (2015). The coffee-machine bacteriome: biodiversity and colonisation of the wasted coffee tray leach. *Sci Rep.* 23;5:17163
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Vacherie, B. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically

versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature biotechnology*, 24(6), 673-679.

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828-840.

Wang, G., Olczak, A. A., Walton, J. P., Maier, R. J. (2005). Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infection and immunity*, 73(1), 378-384.

Workneh, F., Van Bruggen, A. H. C. (1994). Microbial density, composition, and diversity in organically and conventionally managed rhizosphere soil in relation to suppression of corky root of tomatoes. *Applied Soil Ecology*, 1(3), 219-230.

Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., van der Lelie, D. (2011). Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews* 35(2), 299-323.

Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3889-3894.

Yu, Y., Breitbart, M., McNairnie, P., Rohwer, F. (2006). FastGroupII: a web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC bioinformatics*, 7(1), 57.

Zerbino, D. R., Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.

Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic acids research*, gkr485.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Avaliação genômica da associação de bactérias com o cafeeiro*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Leandro Pio
Nome do(a) aluno(a): Leandro Pio de Sousa

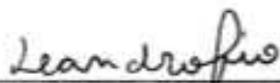
Assinatura: Jorge Mauricio Costa Mondago
Nome do(a) orientador(a): Jorge Mauricio Costa Mondago

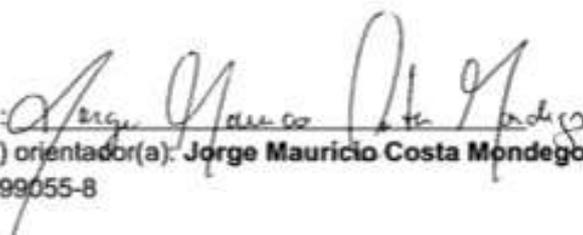
Data: 15/02/2016

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação genômica da associação de bactérias com o cafeeiro**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15/02/2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Leandro Pio de Sousa**
RG n.º 46048894-6

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Jorge Mauricio Costa Mondego**
RG n.º 10799055-8