

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**



**HOLOBIONTE CACAUEIRO: DIVERSIDADE GENÉTICA DA
PORÇÃO MICROBIANA ASSOCIADA A FRUTOS DE DIFERENTES
CLONES DE *THEOBROMA CACAO* L.**

CLEIZIANE BISPO DA SILVA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2013

CLEIZIANE BISPO DA SILVA

HOLOBIONTE CACAUEIRO: DIVERSIDADE GENÉTICA DA PORÇÃO
MICROBIANA ASSOCIADA A FRUTOS DE DIFERENTES CLONES DE
THEOBROMA CACAO L.

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2013

S586

Silva, Cleiziane Bispo da.

Holobionte cacauero: diversidade genética da porção microbiana associada a frutos de diferentes clones de *Theobroma cacao* L. / Cleiziane Bispo da Silva. – Ilhéus, BA: UESC, 2013.

xiv, 76f. : il. ; anexos.

Orientador: Leandro Lopes Loguercio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Cacau – Melhoramento genético. 2. Microorganismos – Genética. 3. Microbiologia – Cultura e meios de cultura. I. Título.

CDD 633.74

Aos meus pais Cícero Ramos da Silva e Ana Maria Bispo da Silva pelo amor, apoio e incentivo fundamentais para o alcance desta conquista.

DEDICO

*“Mind is the Master-power that molds and makes,
And Man is mind, and evermore he takes
The tool of Thought, and, shaping what he wills
Brings forth a thousand joys, a thousand ills
He thinks in secret, and it comes to pass:
Environment is but his looking-glass.”*

(James Allen 1864-1912)

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro a este projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À UESC através do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

À Mars Cacau – Centro de Ciência do cacau.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Leandro Lopes Loguercio, pelos valiosos ensinamentos e por acreditar em meu potencial.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a. Monita Fiori de Abreu Tarazi, pela intensiva colaboração, pronta solicitude e participação na construção deste projeto, e por me tranquilizar em momentos de incertezas e dificuldades.

Ao Grupo “Hologeandro”, pela intensa discussão e desenrolar científico, especialmente Sheila Soares e Roberta Ornellas pelas dicas e ensinamentos sobre as técnicas empregadas no projeto.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, especialmente prof^o Roberto Tarazi e prof^o Luciano Bernardes.

A professora Dra. Siu Mui Tsai, pela colaboração e a todos que me acolheram no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP.

Ao Msc. Lucas Mendes, pela valiosa ajuda na condução dos experimentos.

Às professoras Ana Paula e Andreia Miúra pelas contribuições nas reuniões em grupo.

Aos técnicos de laboratório Márcio e Horlei.

Aos Iniciação Científica: Renata, Vicente, Rebecca e Igor.

Aos estagiários Rita e Damião pela força.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, do Laboratório de Marcadores Moleculares e do Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Biotecnologia e Genética da UESC.

Aos colegas de curso, especialmente Luciano Gama, Lívia Santana e Ronaldo Carvalho, pela amizade e pelos momentos de convívio, dificuldades e alegrias.

Aos colegas de moradia em ordem cronológica: Joseane Passos (Nanda), Iarla, Roseneide (CENA), Maria Vitória (Maria Bonita), Hemilli, Bia, Leila e Lu Cidade (pela acolhida e pelo apoio em laboratório).

A minha família, pai, mãe, irmã, irmão, cunhada, sobrinhas e a todos que torceram pela realização deste projeto.

Ao meu companheiro e também colega de profissão Anderson Viana, por sempre acreditar, me incentivar, vibrar a cada pequena conquista e batalhar comigo na construção da carreira acadêmica e formação profissional. Pelas palavras de afeto e pelo amor dedicado durante esses anos.

A todos os amigos que participaram direta ou indiretamente na construção e realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

A Deus, pela oportunidade maravilhosa de viver toda a experiência singular e fantástica ao longo deste curso. Foi lindo, intenso e com reflexos positivos na vida pessoal.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
EXTRATO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. CACAUEIRO, GENÓTIPOS E CLONES.....	3
2.2. MICRO-ORGANISMOS EXOFÍTICOS E ENDOFÍTICOS DE PLANTAS.....	5
2.3. TEORIA HOLOGENÔMICA DA EVOLUÇÃO	7
2.3.1. Conceituação	7
2.3.2. Generalizações	8
2.4. ANÁLISE DE MICRO-ORGANISMOS.....	11
2.4.1. Métodos dependentes de cultivo.....	11
2.4.2. Métodos independentes de cultivo	12
2.4.2.1. Principais Métodos	12
2.4.2.2. Biblioteca de genes ribossomais	14
2.5. ECOLOGIA MICROBIANA.....	15
2.5.1. Diversidade	16
2.5.2. Riqueza	18
2.5.3. Abundância	18
2.5.4. Composição	19
2.5.5. Estrutura e funcionalidade das comunidades.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. ÁREA DE ESTUDO E COLETA DOS FRUTOS DO CACAUEIRO	22
3.2. OBTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EXOFÍTICOS PARA AVALIAÇÕES PRELIMINARES	23
3.3. OBTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS PARA ANÁLISE DE RIQUEZA	24
3.3.1. Obtenção dos micro-organismos cultiváveis exofíticos	25
3.3.2. Obtenção dos micro-organismos cultiváveis endofíticos.....	25
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS	27
3.5. OBTENÇÃO DE SEMENTES PARA A EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL	27
3.6. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL PARA ANÁLISE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	28
3.7. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR).....	29

3.8. BIBLIOTECA DO GENE 16S rDNA.....	30
3.8.1. Amplificação do gene 16S rDNA de <i>Bacteria</i>	30
3.8.2. Purificação dos produtos de PCR	31
3.8.3. Clonagem dos produtos de PCR e transformação de células de <i>E. coli</i>	31
3.8.4. Seleção dos clones e extração do DNA	33
3.8.5. PCR de Inseto e purificação	33
3.9. PCR DE SEQUENCIAMENTO E PRECIPITAÇÃO	34
3.10. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. AVALIAÇÕES PRELIMINARES – MEIOS DE CULTURA E FORMAS DE COLETA PARA EXOFÍTICOS.....	36
4.2. ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS	39
4.3. RIQUEZA DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS EM FRUTOS DE CACAU	42
4.3.1. Fatores com efeito na variável	42
4.3.2. Riqueza mutuamente exclusiva entre fungos e bactérias endofíticas .	45
4.3.3 Efeito de árvore com dados de riqueza combinada entre domínios.....	48
4.4. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS INDEPENDENTES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM SEMENTES DE CACAU	49
4.4.1. Abundância relativa das comunidades bacterianas entre genótipos ...	51
4.4.2. Riqueza e composição de comunidades bacterianas não-cultiváveis em sementes de diferentes genótipos de cacau	55
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS	65
7. ANEXO 1.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho.....	21
Figura 2.	Plantas de cacau na área de coleta.....	22
Figura 3.	Frutos dos quatro genótipos de cacauzeiros coletados na Fazenda Cinco Porcos, Mars Center for Cocoa Science, no Município de Barro Preto, Bahia.....	23
Figura 4.	Algumas características macromorfológicas utilizadas para diferenciar colônias.....	24
Figura 5.	Locais de obtenção dos micro-organismos para análise de cultiváveis.....	25
Figura 6.	Demonstração da obtenção de sementes de cacau para análise de micro-organismos.....	26
Figura 7.	Semente de cacau com polpa em meio de cultura.....	27
Figura 8.	Procedimento de despulpamento das sementes de cacauzeiro.....	28
Figura 9.	Principais etapas envolvidas no processo de Clonagem dos produtos de PCR e transformação de células competentes de <i>E. Coli</i>	32
Figura 10.	Colônias de fungos e bactérias exofíticos de frutos de cacauzeiro obtidos a partir dos quatro genótipos de cacauzeiros.....	36
Figura 11.	Réplicas de fungos exofíticos obtidos do Lavado do genótipo VB1151, e crescidos em meio de cultura EM e BDA.....	40
Figura 12.	Colônias de fungos exofíticos isoladas em meio BDA e EM obtidos de quatro genótipos de cacauzeiros.....	41
Figura 13.	Colônias de bactérias exofíticas isoladas em meios AN e TSA obtidos de quatro genótipos de cacauzeiros.....	41
Figura 14.	Exemplo de resultados de PCR com <i>primers</i> específicos para o gene 16S rDNA de bactérias, por perfil eletroforético em gel de agarose.....	50
Figura 15.	Número médio de cópias do gene 16S rDNA de <i>Bacteria</i> obtidas por qPCR para quatro repetições de sementes de cada genótipo de cacauzeiro.....	52
Figura 16.	Curva de rarefação para riqueza de quatro comunidades de espécies bacterianas, obtidas pelo cômputo de sequências do gene 16s rDNA e comparação com banco de dados (<i>GenBank</i>).....	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1a.** Riqueza de micro-organismos obtida por três diferentes técnicas de coleta através da inspeção visual das características macromorfológicas das colônias.....38
- Tabela 1b.** Correção dos valores de riqueza para a área de contato total do fruto com o meio de cultura e para o volume total do lavado plaqueado.....38
- Tabela 2.** Valores de χ^2 e de probabilidade para riqueza de micro-organismos exofíticos e endofíticos obtidos de frutos de quatro genótipos de cacauero.....42
- Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) para os efeitos de genótipos, local de ocorrência dos micro-organismos e domínio taxonômico sobre a riqueza de morfotipos observada em frutos de cacauero.....43
- Tabela 4.** Valores de χ^2 para o efeito de repetição (árvore) sobre a riqueza de morfotipos bacterianos e fúngicos exo/endofíticos por genótipo.....44
- Tabela 5.** Riqueza de morfotipos bacterianos e fúngicos endofíticos obtidos a partir de frutos de quatro genótipos de *Theobroma cacao* L. por árvore (repetição)..... 46
- Tabela 6.** Análise do contraste observado entre os números de morfotipos endofíticos bacterianos e fúngicos nas quatro repetições para cada genótipo.....47
- Tabela 7.** Valores de χ^2 para o efeito de repetição (árvore) sobre a riqueza de morfotipos de micro-organismos dos dois domínios, por genótipo.....48
- Tabela 8.** Espécies bacterianas com sequências 16s rDNA mais similares às encontrados em amostras de sementes de cacauero, segundo ocorrências por combinações de genótipos.....61

EXTRATO

SILVA, Cleiziane Bispo da, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, agosto de 2013. **Holobionte cacauero: diversidade genética da porção microbiana associada a frutos de diferentes clones de *Theobroma cacao* L.** Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientadora: Monita Fiori de Abreu-Tarazi.

Bactérias e fungos podem atuar em consórcio com as plantas em um *continuum* de interações. As associações aos micro-organismos influenciam na manutenção do estado de saúde das plantas, pois estes exercem papel fundamental no desenvolvimento vegetal. Baseado nas generalizações da Teoria Hologenômica da Evolução, proposta por Zilber-Rosenberg e Rosenberg em 2008, as comunidades de micro-organismos associados e as células da planta atuam em conjunto como uma unidade que sofre as ações das forças evolutivas (o holobionte). Considerando desta forma, o objetivo principal da presente pesquisa foi investigar a estrutura e diversidade da porção microbiana (bactérias e fungos) endo/exofítica de frutos de quatro genótipos clonais do holobionte cacauero (*Theobroma cacao* L.) - VB1151, PH16, CCN51 e PS1319. Os frutos foram coletados na Fazenda Cinco Porcos, Barro Preto, Bahia. Diferentes meios de cultura para crescimento de fungos e de bactérias, bem como três técnicas foram testados quanto à capacidade de capturar diferentes morfotipos exofíticos dos quatro genótipos de cacau. Os meios de cultura não diferiram ($p > 0,05$) quanto ao número de micro-organismos observados. Porém, em uma análise qualitativa, foi observado que um número maior de morfotipos distintos pode ser obtido utilizando-se diferentes meios. Considerando a natureza do método de coleta, observou-se que a técnica de espalhamento de suspensão de micro-organismos (lavado do cacau) foi a mais eficiente na captura dos micro-organismos. Estas avaliações preliminares nortearam o segundo experimento. Uma coleção de 382 isolados fúngicos e 302 isolados bacterianos oriundos de frutos dos quatro genótipos de cacauero foi criada, armazenada e catalogada. Por meio de análise de variância (ANOVA), fatores com possível efeito na riqueza de micro-organismos foram testados. Os resultados mostraram que a riqueza de isolados exofíticos foi significativamente maior que a de endofíticos. De modo geral, para micro-organismos cultiváveis não se observou efeito do genótipo de cacauero na

variável riqueza de morfotipos, mas houve significância estatística para as análises de χ^2 envolvendo genótipos e repetições para fungos e bactérias exo/endofíticos. Um efeito de árvore em todos os genótipos foi confirmado por análises de χ^2 adicionais. Estes resultados sugerem que cada cacauero tem características individuais, independente do genótipo, que interferem de forma mais determinante na riqueza microbiana dos frutos. Uma tendência de mútua exclusão entre fungos e bactérias endofíticas foi observada entre as repetições em todos os genótipos de cacauero, sugerindo um fenômeno de competição endofítica entre os membros dos dois domínios. Sequências de 16S rDNA de *Bacteria* foram amplificadas a partir de DNA genômico total de sementes dos diferentes genótipos, obtidas em ambiente estéril. Para a variável abundância, avaliada através da qPCR, também foi verificado um efeito de árvore, mas não de genótipo, sobre a comunidade bacteriana endofítica, corroborando o efeito de árvore observado anteriormente sobre a riqueza na comunidade cultivável. Estes resultados se ajustam à Teoria Hologenômica da Evolução no sentido de que as variações individuais entre as plantas, observadas na porção microbiana, estão contribuindo para o estabelecimento de 'hologenótipos' específicos para cada indivíduo. A identificação de um efeito de genótipo foi alcançada através da construção de biblioteca de 16S rDNA de *Bacteria* e sequenciamento. O DNA genômico total das amostras, foi amplificado para a região 16S rDNA, clonado em *pGEM®-T Easy* e sequenciado, demonstrando a presença de diferentes UTO's (Unidades Taxonômicas Operacionais), a maioria dos quais genótipos-específicos. Os resultados de composição/abundância relativa de espécies microbianas identificadas pelo sequenciamento sugerem fortemente a existência de uma correlação entre esta(s) variável(is) e o genótipo da planta. Estes resultados em conjunto evidenciaram que para micro-organismos não cultiváveis, os parâmetros riqueza e abundância não são suficientes para discriminar genótipos, porém um efeito do indivíduo pode ser observado. Porém, o uso de técnicas moleculares, que permitem acessar uma maior representatividade da diversidade microbiana de um dado ambiente, possibilitou a identificação de um efeito significativo do fator 'genótipo' na definição da diversidade microbiana endofítica em sementes adicionando o parâmetro de composição às análises.

ABSTRACT

SILVA, Cleiziane Bispo da, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, agosto de 2013. **Holobionte cacauero: diversidade genética da porção microbiana associada a frutos de diferentes clones de *Theobroma cacao* L.** Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientadora: Monita Fiori de Abreu-Tarazi.

Bacteria and fungi can act in consortium with plants in a *continuum* of interactions. Associations with microorganisms can influence in maintaining the health of the plants, since they play a fundamental role in plant development. Based on generalizations of Hologenome Theory of Evolution, proposed by Zilber - Rosenberg and Rosenberg in 2008, communities of microorganisms associated and the plant cells acts together as a unit that suffers the actions of evolutionary forces (the holobiont). Considering this way, the main objective of this research was to investigate the structure and diversity of microbial portion (bacteria and fungi) endo / exophytic of the fruits of four genotypes of the cocoa holobiont (*Theobroma cacao* L.) - VB1151, PH16, CCN51 and PS1319. Fruits were collected at the farm Cinco porcos, Barro Preto, Bahia. Different culture media for growth of fungi and bacteria, as well as three techniques were tested for their ability to capture different exophytic morphotypes of four genotypes of cocoa. The culture media tested did not differ significantly ($p > 0.05$) in the number of exophytic microorganisms observed. However, with a qualitative analysis, it was observed that a greater number of distinct morphotypes can be obtained using different culture media. Considering the nature of the collection method, it was observed that the scattering technique suspension of micro-organisms (cacao washed) was the most effective in capturing microorganisms. These preliminary assessments guided the second experiment. A collection of 382 fungal and 302 bacterial isolates from fruit of four genotypes of cocoa was created, stored and cataloged. Analysis of variance (ANOVA) was performed, with factors that can affect the differences in microbial richness. The results showed that the richness of exophytic isolated was significantly higher than that of endophytes. In general, for cultivable microorganisms, effect of genotype of cocoa was not observed for morphotypes richness variable, but was observed statistical significance for

analysis of χ^2 involving genotypes and replications for fungi and bacteria exo / endophytic. An effect of tree in all genotypes was confirmed by additional analysis χ^2 . These results suggest that each cocoa tree have individual characteristics, independent of genotype, which interfere more decisively in microbial richness of fruits. A trend of mutual exclusion between endophytic fungi and bacteria was observed between repetitions in all cocoa genotypes suggesting a phenomenon of endophytic competition between members of the two domains. 16S rDNA sequences of *Bacteria* were amplified from total genomic DNA of seeds of different genotypes obtained in a sterile environment. For abundance variable, assessed by qPCR, was also observed an effect of tree, but not of genotype, on the endophytic bacterial community, corroborating the effect of tree previously observed on richness of the cultivable community. These results fit the Hologenômica Theory of Evolution in the sense that individual variations among plants, observed in microbial portion, are contributing to the establishment of specific 'hologenotypes' to each individual. The identification of a genotype effect was achieved through the construction of library 16S rDNA of the *Bacteria* and sequencing. The total genomic DNA samples was amplified for 16S rDNA, cloned into pGEM ®-T Easy and sequenced, demonstrating the presence of different UTO's (Taxonomic Operating Units), most of which are genotype-specific. The results of composition / relative abundance of microbial species identified by 16S rDNA sequencing strongly suggests the existence of a correlation between this variable (s) and the genotype of the plant. These results together indicated that for non-cultivable microorganisms, the richness and abundance parameters are not sufficient to differentiate genotypes, but the individual effect can be observed. However, the use of molecular techniques, which allow access to greater representation of microbial diversity in a given environment, allowed the identification of a significant effect of the factor 'genotype' in the definition of endophytic microbial diversity in seeds when the composition parameter was added to analyzes.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias e fungos apresentam grande variabilidade genética e ecológica, entretanto, as pesquisas não têm explorado suficientemente esta diversidade, especialmente quanto à interação microrganismo - planta. Apesar do desenvolvimento das modernas técnicas moleculares, que permitem o acesso a uma grande diversidade de micro-organismos, sem a necessidade de cultivo em meios artificiais, existem muitas perguntas a serem respondidas a respeito destas interações.

A Teoria Hologenômica da Evolução trouxe recentemente um novo enfoque para as associações entre microrganismos e plantas. Esta teoria postula que as informações genéticas da planta e de seus microrganismos combinadas poderão determinar o estado de saúde da planta, e até mesmo sua sobrevivência. As generalizações desta teoria foram o ponto de partida para as ideias deste trabalho.

Baseado na Teoria Hologenômica da Evolução, a qual enfatiza o papel dos micro-organismos na evolução e adaptação das plantas, questionamos se diferentes genótipos de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) poderiam abrigar diferentes comunidades de micro-organismos. Considerou-se, portanto, o cacauzeiro como um holobionte, ou seja, a planta e os micro-organismos associados aos seus tecidos como uma unidade que sofre as ações das forças evolutivas. A busca pela compreensão de como esta variável (genótipos do cacauzeiro) poderia afetar a estrutura da porção microbiana do holobionte foi a principal motivação desta pesquisa.

As pesquisas com cacau cresceram muito logo após a introdução da doença da vassoura-de-bruxa, causada pelo patógeno *Moniliophthora perniciosa*, especialmente na região Sul Baiana, onde a cultura do cacau possui forte relevância de âmbito ecológico, econômica e social. Apesar de vários aspectos biológicos desta cultura serem bem descritos, entendemos que ainda é importante conhecer como as comunidades de micro-organismos se estruturam em cacauzeiros livres de doenças.

Uma das soluções encontradas para resolver o problema de infecção pelo patógeno nas fazendas foi a utilização de genótipos clonais considerados tolerantes ao fungo. Entretanto, os métodos de melhoramento genético do cacau praticamente nunca levaram em consideração os micro-organismos benéficos associados à planta. Não se sabe como as diferentes seleções artificiais podem afetar a porção microbiana do holobionte cacau. Devido à falta de conhecimento sobre esta interação, uma porção considerável de micro-organismos pode estar sendo ignorada quanto à sua diversidade genética e funcional, com potencial para uma aplicação biotecnológica.

A análise de diversidade e estrutura das comunidades microbianas associadas ao cacau deve considerar as diferenças entre os genótipos, pois existe a possibilidade destas comunidades se associarem de diferentes formas a cada genótipo. Além disso, é importante conhecer como as comunidades microbianas são capazes de estabelecer, se associar e se estruturar de maneira diversa em diferentes tecidos da planta.

O objetivo principal desta pesquisa foi investigar a comunidade de fungos e bactérias associadas a frutos de quatro genótipos clonais do cacau (CCN51, PH16, PS1319 e VB1151). Os micro-organismos foram obtidos da semente do cacau sem a polpa, da semente do cacau com a polpa e da superfície externa do fruto para a investigação das comunidades microbianas endofíticas e exofíticas. Questionamos ainda que tipo de resposta seria obtida, utilizando diferentes métodos de acesso a estes micro-organismos (métodos dependentes e independentes de cultivo), bem como diferentes parâmetros para avaliar a diversidade, e se estas análises apontariam para as mesmas variações na estrutura das comunidades estudadas.

Estudar a estrutura e diversidade de comunidades microbianas em diferentes genótipos clonais do cacau é o passo inicial para compreender o quanto mudanças na estrutura de comunidades de micro-organismos são capazes de alterar o funcionamento e a sustentabilidade deste holobionte. A soma destas informações pode ser importante para o estabelecimento de formas mais adequadas de manejo e exploração da microbiota associada em benefício ao desenvolvimento da planta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CACAUEIRO, GENÓTIPOS E CLONES

Theobroma cacao L. é uma planta arbórea, neotropical, pertencente à família Malvaceae e nativa da América do Sul (SHI et al., 2010). Esta espécie compreende árvores pequenas, perenes, monóicas e umbrófilas, preferencialmente alógamas, com indefinido crescimento e produção de frutos, que pode variar de 20 a mais de 60 anos, com frutos crescendo tanto no tronco quanto nos ramos (SILVA et. al., 2001).

O fruto surge da polinização das flores agrupadas em almofadas florais e é uma baga indeiscente que apresenta um pericarpo carnoso e pode conter de 30 a 40 sementes, que estão envoltas por uma polpa mucilaginosa. O fruto possui relevância econômica para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (SILVA NETO et al, 2001).

Além de sua importância econômica, o cacaueteiro tem grande importância para a biodiversidade na Mata Atlântica por ser cultivado na forma de cabruca. A cabruca é o sistema de cultivo no qual o cacaueteiro é mantido sob o sombreamento das árvores nativas da Mata Atlântica. Grande parte dos cultivos de cacaueteiro na Bahia é manejada desta forma. O sistema de cabruca mantém parte da estrutura da floresta, representando um benefício para a conservação dos recursos naturais. A cobertura florestal parcialmente mantida protege o solo dos processos erosivos, favorece o ciclo hidrológico e permite a manutenção de espécies da flora e fauna (ARAÚJO et al. 1998).

O cultivo do cacaueteiro contribuiu significativamente para a economia do Estado da Bahia, por fornecer matéria prima para a produção de chocolate e outros produtos (MOTAMAYOR et. al., 2008). Embora tenha sido o principal produto agrícola gerador de capital, alcançando mais de 50% das exportações, a partir do ano de 1987 este setor passou por uma crise de grande impacto econômico e social. Os crescentes efeitos da doença da vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, desencadearam baixa produtividade e altos custos para a produção. Apesar de o Brasil já ter sido

principal produtor de cacau, atualmente importa este produto para manter suas indústrias em funcionamento e se tornou o quinto país no *ranking* de produção de cacau do mundo (SHI et al., 2010).

Muitos esforços têm sido empreendidos no sentido de revitalizar esta cultura, incluindo o uso de modernas tecnologias, diferentes formas de manejo do cacauzeiro, e seleção de variedades clonais tolerantes a doenças. Com isso, o cultivo vem assumindo novamente importância de destaque no cenário econômico (SILVA NETO et al, 2001).

O fato de ter havido muitos cruzamentos com os clones, favoreceu a variabilidade genética de cacauzeiros (MOTAMAYOR et. al., 2008). A diversidade genética das seleções realizadas nas fazendas para genótipos resistentes, e as práticas adotadas para controle de pragas, resultou na redução de perdas de produção e da evolução da doença (PIRES et al., 2012).

Entre os genótipos obtidos com as seleções, estão o CCN51, PH16 (Porto Híbrido 16), PS1319 (Porto Seguro 1319) e VB1151. Os clones desses genótipos destacam-se pela tolerância a *Moniliophthora perniciosa*, alta produtividade e boa adaptabilidade às condições edafoclimáticas locais. Apesar de haverem características em comum, não existem critérios definidos para separar as variedades existentes em grupos específicos (PIRES et al., 2012).

De acordo com Turnbull e Hadley (2013), um dos genitores de CCN51 pode ter sido uma progênie do cruzamento do clone ICS 95 com o IMC67. Mas o outro pai sugerido, designado Canellos, é um clone misterioso de parentesco desconhecido. O VB1151 é resultado do cruzamento do PA150 (Parinari 150 - mãe), que teve origem no Peru, com SIC19 (pai), clone encontrado em Uruçuca, Bahia. Por fim, o PH16 é o resultado do cruzamento do PA150 com o ICS1 (pai). Informações obtidas através de contato pessoal com técnicos da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) sugere que PS1319 pode ser descendente de Scavina (SCA) já que é a única fonte de resistência conhecida, inclusive utilizada no melhoramento genético de cacauzeiro.

2.2. MICRO-ORGANISMOS EXOFÍTICOS E ENDOFÍTICOS DE PLANTAS

Ainda que não seja completamente compreendida e explorada, uma ampla diversidade de bactérias e fungos é capaz de interagir com diferentes espécies de plantas. Esses micro-organismos compõem comunidades que desempenham importantes papéis em processos biológicos essenciais para o desenvolvimento da planta e a manutenção do seu estado de saúde (ANDREOTE *et al.*, 2009).

Fungos e bactérias podem se relacionar com as plantas de modo neutro, benéfico e, ou prejudicial. Bactérias associadas às plantas podem beneficiá-las, promovendo crescimento, suprindo-as de nutrientes e protegendo-as contra patógenos (MAKI, 2006). Nesta perspectiva, a presença de fungos também pode favorecer a produção de hormônios de crescimento e antibióticos, e proteção contra herbivoria. Em situações de estresse na planta, o micro-organismo pode atuar de forma nociva, prejudicando o desenvolvimento da mesma (HALLMANN *et al.*, 1997; MAKI, 2006, ANDREOTE *et al.*, 2009).

Bactérias e fungos exofíticos e endofíticos são caracterizados por colonizarem a superfície e o interior dos tecidos das plantas, respectivamente. Apesar desta separação didática, as comunidades microbianas que estão presentes em diferentes partes das plantas podem ser similares, pois, na natureza, o gradiente de distribuição desses micro-organismos prevalece sobre a separação (HALLMANN *et al.*, 1997; ANDREOTE *et al.*, 2009).

O mesmo micro-organismo pode habitar diferentes órgãos da planta ainda que tenha diferente abundância em cada parte do vegetal. Isto pode acontecer devido à diferente disponibilidade de nutrientes em cada tecido, condições atmosféricas locais, e competição com outros componentes da comunidade. Os micro-organismos da superfície podem constituir o primeiro inoculo no fruto devido a abrasões geradas, por exemplo, no momento da colheita, favorecendo a introdução destes nas partes mais internas do fruto (DOS SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Entre os micro-organismos que compõem comunidades de bactérias e fungos que habitam a superfície dos vegetais, existem os que são capazes de antagonismo com espécies fitopatogênicas, e que promovem controle biológico natural. Variações no microclima, como umidade, temperatura, exposição ao sol,

vento, chuvas e poluentes resultam na constante sucessão de micro-organismos exofíticos. A compreensão da ecologia e diversidade desses micro-organismos é importante para o controle biológico de pragas, para o reconhecimento de espécies exóticas nas plantas, e para o conhecimento do potencial biotecnológico destas espécies. Além disso, é importante estudar a estrutura dessas comunidades em diferentes variedades de espécies, pois existe a possibilidade dessas comunidades se associarem de diferentes formas em cada variedade de plantas (JOHNSTON-MONJE; RAIZADA, 2011b).

O conceito de endofítico é amplamente discutido. O termo foi cunhado por Heinrich Anton de Bary em 1866 e deriva das palavras gregas *endon* (dentro) e *phyte* (planta). Endofíticos geralmente se refere a bactérias e fungos não patogênicos encontrados nos tecidos internos de plantas. Alguns autores consideram endofíticos os micro-organismos isolados de um tecido de planta superficialmente desinfestado (NAVES et al., 2004; DOS SANTOS; VARAVALLO, 2011). Na presente pesquisa, considerou-se como micro-organismos endofíticos bactérias e fungos obtidos do interior do fruto de cacaueteiro.

Os micro-organismos endofíticos representam fonte potencial de produtos bioativos, antibióticos, fungicidas, herbicidas, hormônios e enzimas (DOS SANTOS; VARAVALLO, 2011). Estudos de bioprospecção de endofíticos têm sido realizados para uma variedade de plantas e já é relatado que estes são fontes de novos compostos químicos e biológicos de interesse (SCHULZ; BOYLE, 2005). Também já foram utilizados como vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras (ZAYATZ et al., 2011) Os micro-organismos endofíticos podem auxiliar na compreensão das relações filogenéticas entre plantas, sua ecologia e etnogeografia (JOHNSTON-MONJE; RAIZADA, 2011a). Isto é possível devido à transmissão vertical de fungos e bactérias de uma geração a outra através da semente.

Arnold et al. (2003) evidenciam que fungos endofíticos de *T. cocoa* são transmitidos horizontalmente e podem atuar na defesa da planta contra patógenos. Esses autores demonstraram como a inoculação de um conjunto de fungos endofíticos, isolados de folhas, pode reduzir necrose foliar e mortalidade causados por *Phytophthora* sp. em plântulas de cacaueteiro. Resultado semelhante foi obtido por Hanada et al. (2009) que isolou uma nova espécie endofítica de

Trichoderma a partir de cacauzeiro com efeito de biocontrole sobre o mesmo patógeno. Destaca-se que a composição química da folha pode mediar as interações entre endófitos na planta, influenciando a composição de fungos nas plantas, bem como sua afinidade com o hospedeiro; Ressalta-se ainda a importância de estudar esses micro-organismos em angiospermas lenhosas, especialmente de florestas tropicais, pois ainda são pouco conhecidos (ARNOLD et al., 2003).

Em cacauzeiros resistentes e suscetíveis a *Moniliophthora perniciosa*, endófitos fúngicos foram identificados por características morfológicas e seqüenciamento de rDNA como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os autores identificaram ainda alguns endófitos potencialmente antagonistas, destacando-se *Gliocladium catenulatum*, que reduziu em 70% a incidência da vassoura da bruxa *in vivo* em plântulas de cacauzeiro (RUBINI et al., 2005).

2.3. TEORIA HOLOGENÔMICA DA EVOLUÇÃO

2.3.1. Conceituação

A teoria hologenômica da evolução (Rosenberg et. al, 2007; Zilber-Rosenberg; Rosenberg, 2008) enfatiza o papel dos micro-organismos na evolução e adaptação de animais e plantas. A principal característica desta teoria é que ela considera a planta ou o animal e todos os seus micro-organismos associados como uma unidade de seleção na evolução. Esta unidade, denominada holobionte, contém o hologenoma, que por sua vez é definido como o somatório da informação genética do hospedeiro e seus micro-organismos associados.

A teoria hologenômica da evolução é uma generalização da hipótese do coral probiótico (Zilber-Rosenberg; Rosenberg, 2008), a qual postula que corais podem se adaptar ao seu ambiente, incluindo resistência a patógenos, mudando as suas bactérias simbiotes. Esta hipótese surgiu da observação do

branqueamento que ocorre no coral *Oculina patagonica* no leste do mar mediterrâneo em cada verão, quando a temperatura da água do mar ultrapassa 25°C. Nesta condição, ideal para a infecção do patógeno *Vibrio shiloi* responsável pelo branqueamento, ocorre a produção dos seus fatores de virulência. Através de procedimentos rigorosos que satisfazem todos os postulados de Koch foi confirmado que *Vibrio shiloi* era o agente causal da doença (Kushmaro et al., 1996, 1997, 1998). Após o ano de 2002, os corais desenvolveram resistência ao patógeno.

As evidências que suportam essa hipótese são: Os corais contêm diversas bactérias associadas aos seus tecidos; a população de bactérias associadas sofre uma rápida mudança quando as condições ambientais são alteradas e; apesar da falta de um sistema imune adaptativo, os corais podem desenvolver resistência a patógenos.

A teoria hologenômica da evolução considera que uma variação relativamente rápida nos diversos micro-organismos simbiotes pode ter um importante papel na adaptação e evolução do holobionte, visto que a informação genética dos micro-organismos excede a do seu hospedeiro. Além disso, a evolução do holobionte pode ocorrer por mudanças do genoma do hospedeiro e, ou qualquer dos genomas de micro-organismos associados (Zilber-Rosenberg; Rosenberg, 2008).

2.3.2. Generalizações

A teoria hologenômica da evolução (ROSENBERG et. al, 2007; ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008) é baseada em quatro generalizações:

Todos os animais e plantas estabelecem relações simbióticas com micro-organismos: Conforme Margulis 1993, os eucariotos se originaram dos procariotos, portanto não é novidade que animais e plantas tenham grande abundância e variedade de micro-organismos exofíticos e endofíticos. Os métodos independentes de cultivo (ver item 4.2) têm possibilitado acessar os micro-organismos não cultiváveis em meios artificiais.

Apesar dos estudos com micro-organismos associados a animais e plantas estarem apenas em seus estágios iniciais, Rosenberg e Zilber–Rosenberg (2008)

consideram alguns pontos consensuais: a diversidade de micro-organismos associados é alta; a comunidade associada é diferente daquela do entorno; em alguns casos, populações similares de micro-organismos são encontradas na mesma espécie separada geograficamente, e em contraposição, diferentes populações de micro-organismos são encontradas em diferentes espécies que ocupam a mesma área; diferentes comunidades microbianas frequentemente dominam diferentes tecidos no mesmo organismo; em vários casos onde uma grande diversidade de espécies existe, certos grupos de bactérias dominam.

As associações aos micro-organismos podem tomar diferentes formas. Algumas podem ser transitórias e ter pouco efeito na adaptação do holobionte, enquanto em outro extremo há associações de longo prazo que podem levar à total dependência, embora exista um gradiente de associações entre um extremo e outro (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008).

A transmissão de simbioses ocorre entre gerações de holobiontes: Existe um *continuum* de modos de transmissão direta ou indireta de micro-organismos simbioses para a prole do hospedeiro. Entre os quais, a herança citoplasmática de mitocôndrias e cloroplastos, considerados simbioses extremos (MARGULIS, 1993); transmissão direta para a prole através das células reprodutivas; contato físico direto dos progenitores com a prole, frequentemente referido como transferência horizontal; o desenvolvimento de plantas através de células somáticas (reprodução vegetativa), as quais contêm simbioses; e através das sementes que caem no solo. A transmissão vertical de micro-organismos não ocorre com a mesma fidelidade que ocorre no genoma do hospedeiro, no entanto, ocorre numa frequência alta o suficiente para afetar a evolução (ROSENBERG et al., 2009)

A cooperação entre o hospedeiro e sua comunidade microbiana contribui para o desempenho do holobionte: A teoria hologenômica da evolução incorpora certos aspectos Lamarckistas dentro de uma estrutura Darwiniana (ROSENBERG et al., 2009). Lamarck acreditava que mudanças induzidas ambientalmente eram passadas para gerações futuras. As principais características desta teoria, referida atualmente como Lamarckismo, são: o *uso e desuso*, em que os indivíduos perdem características que não usam e desenvolvem características

úteis; e a *herança de caracteres adquiridos*, em que indivíduos transmitem as características adquiridas à prole.

A variação no hologenoma pode ocorrer através de recombinação sexual, rearranjo cromossômico e mutação; em micro-organismos pode ocorrer conjugação, transdução e transformação. Além disso, dois mecanismos de variação genética específicos da teoria hologenômica são propostos: amplificação de micro-organismos existentes e aquisição de novas cepas do ambiente, que podem ocorrer rapidamente sob a demanda ambiental. Estes mecanismos são Lamarckistas na medida em que ocorre o uso e desuso 'de micro-organismos', e a variação no hologenoma transmitida à prole do holobionte satisfaz o princípio de 'herança de características adquiridas'. Assim, a diversidade genética dos micro-organismos e sua versatilidade podem ampliar a variação de ambientes no qual o holobionte pode ser bem sucedido. Independente do grau de dependência entre os parceiros da associação sabe-se que micro-organismos endofíticos e exofíticos desempenham numerosos papéis no metabolismo, regulação e resistência a doenças (ROSENBERG et al., 2009).

Em condições de stress, a porção microbiana do holobionte pode mudar rapidamente: A amplificação microbiana é o modo de variação no holobionte mais rápido e fácil de compreender, pois envolve variação na abundância relativa dos micro-organismos como resultado das mudanças de temperatura, disponibilidade de nutrientes, exposição a antibióticos e outros fatores ambientais. Considerado como uma entidade dinâmica, o holobionte possui micro-organismos se multiplicando enquanto outros diminuem sua população, em função das condições locais. O aumento do número de um micro-organismo particular equivale a uma amplificação gênica, e pode ser uma estratégia para adaptação ambiental. De outra maneira, novos micro-organismos podem ser adquiridos do ambiente, introduzindo genes inteiramente novos no holobionte, podendo inclusive afetar o seu fenótipo, por ampliar a sua capacidade metabólica. Por fim, a transferência horizontal de genes é um mecanismo adicional para a geração da variação na porção microbiana do holobionte, sendo mediada por transposons, bacteriófagos, plasmídeos e ilhas genômicas (Zilber-Rosenberg; Rosenberg, 2008).

2.4. ANÁLISE DE MICRO-ORGANISMOS

2.4.1. Métodos dependentes de cultivo

Podemos avaliar as comunidades microbianas de uma amostra ambiental através de métodos dependentes e independentes de cultivo. Através dos métodos dependentes de cultivo, avaliamos as comunidades de micro-organismos capazes de crescer em meios de cultura artificiais. Neste caso, a dificuldade de simular o ambiente em que os micro-organismos se encontram na natureza resulta na seleção dos chamados micro-organismos cultiváveis (KIRK et. al., 2004). Devido à seletividade dos meios de cultura, e às diferentes exigências nutricionais dos diversos micro-organismos, inevitavelmente muitos micro-organismos ficarão de fora desta análise (WETLER-TONINI et al, 2011). Entretanto, os métodos dependentes de cultivo são muito importantes para análise de diversidade de micro-organismos, de funcionalidade, e para bioprospecção de funções úteis.

Os métodos dependentes de cultivo são baseados nas características morfológicas e funcionais de fungos e bactérias. Inclui o cultivo, contagem, isolamento e identificação dos micro-organismos em meios de cultura. Existem muitas formulações de meio de cultura disponíveis comercialmente e que atendem à demanda nutricional específica para determinados micro-organismos (STEVENSON et. al., 2004). Entre os meios disponíveis estão os meios complexos, nos quais o crescimento de micro-organismos de amostras ambientais geralmente é abundante, e os meios básicos, nos quais crescem micro-organismos sem exigências nutricionais especiais (ABELOVSKA et al., 2007).

A análise das características macroscópicas e microscópicas é importante na diferenciação e identificação das colônias. Além disso, uma série de provas bioquímicas pode ser feita para análise de funcionalidade e identificação taxonômica (KIRK et. al., 2004). O micro-organismo pode ser identificado através de características do seu metabolismo, como a capacidade de degradar determinados substratos e produzir gases. São utilizados reagentes e meio de cultura específicos para detectar metabólitos resultantes da atividade microbiana, como por exemplo, a produção de enzimas (KIRK et. al., 2004).

Através desses métodos, um conjunto complexo de características dos micro-organismos pode ser observado. Dimensões, formas, arranjos, coloração, estruturas e mobilidade, formas de crescimento das colônias em diferentes meios, odor, exigências nutricionais, fontes de carbono e nitrogênio, antagonismo, sensibilidade a antibióticos, são algumas das observações importantes que podem ser feitas através dos métodos dependentes de cultivo. No caso de bactérias, testes simples como o de coloração de Gram podem distinguir dois grupos importantes: as bactérias Gram positivas e Gram negativas. A diferença de coloração se deve a diferenças na estrutura da parede bacteriana destes dois grupos (WETLER-TONINI et al, 2011).

2.4.2. Métodos independentes de cultivo

2.4.2.1. Principais Métodos

Cerca de 99% dos micro-organismos ambientais não são cultiváveis; desse modo, as técnicas moleculares auxiliam no estudo de ecologia microbiana (AMANN et al., 1995). Este percentual também se aplica aos micro-organismos associados às plantas. Assim, os métodos independentes de cultivo permitem avaliar como diferentes perturbações ambientais, sejam elas antrópicas ou naturais, podem afetar a comunidade microbiana exo/endofítica. A maioria dos métodos independentes de cultivo baseia-se em técnicas que normalmente analisam a variabilidade da região que codifica o 16S ribossomal de bactérias (LOUWS et al., 1999) e de fragmentos da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para fungos.

O sequenciamento desses genes permite a identificação dos micro-organismos no nível de gênero e até mesmo em espécie (CHENEBY, 2000). A estrutura e a diversidade de comunidades microbianas podem ser avaliadas pela variabilidade das sequências do gene 16S para bactérias e da região de ITS para fungos, após amplificação em reações em cadeia da polimerase (PCR), aliadas a técnicas de *fingerprinting* como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer*

Analysis), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSCP (*Single-strand Conformation Polymorphism*) (RANJARD et al., 2000a).

Entre essas técnicas moleculares, o DGGE destaca-se por ser uma técnica para análise comparativa, onde amostras com padrões de bandejamento diferentes caracterizam estruturas de comunidades distintas. Esse método mostra-se eficiente na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função de alterações ambientais (CLEGG, 2006). Porém, para se obter bons resultados nessa técnica, deve-se atentar ao tamanho do fragmento analisado, que não deve ultrapassar 500 pares de bases (MUYZER, 1998). Além do DGGE, outra técnica muito eficaz para a investigação da estrutura e caracterização das comunidades microbianas é o ARISA, o qual é de grande significância por explorar a variabilidade do comprimento do espaço intergênico entre as subunidades do gene rRNA no operon *rrn*. O ARISA foi um método automatizado desenvolvido a partir do RISA para o aperfeiçoamento da resolução e análises de dados, obtendo-se assim resultados mais precisos e permitindo uma melhor comparação entre os perfis das comunidades (FISCHER; TRIPPLETT, 1999; RANJARD et al., 2000b). A técnica do ARISA permite uma rápida investigação da estrutura de comunidades microbianas mesmo quando há um grande número de amostras disponíveis. Devido à alta resolução e sensibilidade da técnica, o número de UTOs (Unidades Taxonomicas Operacionais) é significativo, o que permite uma robusta comparação entre perfis de comunidades (FISHER E TRIPPLETT, 1999).

O método do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP) (URSEL et al., 2008) permite caracterizar e comparar comunidades de micro-organismos provenientes de diferentes amostras ambientais, utilizando as sequências de genes 16S para análise em bactérias e 18S para fungos (MACDONALD et al., 2011). Desde a primeira revisão, em 1999, por Terence Marsh, sobre a metodologia de T-RFLP, vários artigos foram publicados incluindo esta ferramenta em alguma parte do seu documento (TÍQUIA, 2005; MACDONALD et. al., 2011; MENDES et. al., 2012). O polimorfismo verificado por essa técnica ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente diferentes tem sequências distintas de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de sequências específicas, reconhecidas e clivadas

pelas enzimas de restrição, variam entre indivíduos diferentes, gerando polimorfismo.

2.4.2.2. Biblioteca de genes ribossomais

Bibliotecas genômicas consistem em coleções de sequências de DNA considerando o material genético de qualquer organismo, ou de sequências obtidas através de amostra ambiental. Para a construção de bibliotecas genômicas é necessária a amplificação, clonagem e sequenciamento de genes presentes nos organismos da comunidade (PAIXÃO et al., 2010).

A clonagem de um gene consiste em inseri-lo em um vetor capaz de se multiplicar dentro de um sistema vivo, como um plasmídeo bacteriano. Considerando que uma colônia de bactérias corresponde à multiplicação de uma única célula, esta colônia constitui, portanto, um clone com DNA específico isolado de um organismo. Quando se faz uma extração de plasmídeo obtêm-se então várias cópias desse gene para outras manipulações. O processo de clonagem a permite obtenção de informações sobre a composição, variabilidade, e relações filogenéticas dos organismos presentes no ambiente (LEIGH et al., 2010).

A análise filogenética a partir do sequenciamento de genes que codificam a formação das subunidades ribossomais, principalmente do 16S rDNA, é uma estratégia utilizada para ampliar o conhecimento dos componentes dessas comunidades. A informação contida neste gene é utilizada com sucesso há quase três décadas para a caracterização de comunidades ambientais (AMANN; LUDWIG, 2000). O gene 16S rDNA possui cerca de 1500 pares de bases e tem informações suficientes para realizar estudos de diversidade e inferências filogenéticas, por isso tornou-se a região alvo para estas análises. Além disso, estão presentes em todos os organismos, pois são essenciais para a síntese de proteínas, e apresentam tanto regiões conservadas como variáveis e altamente variáveis (AMANN; LUDWIG, 2000).

Em síntese, a de construção de bibliotecas genômicas consiste na extração do DNA da amostra ambiental, amplificação da sequência de interesse através da PCR, clonagem dos fragmentos amplificados em vetores, como plasmídeo, e a inserção do plasmídeo em células competentes de *Escherichia coli*. Após o

crescimento das colônias, e seleção das colônias transformantes, o vetor é extraído das células e o fragmento clonado é sequenciado. O sequenciamento e comparação com bases de dados permitem a análise da diversidade da comunidade (PAIXÃO et al., 2010).

Bancos de dados com acesso gratuito estão disponíveis para pesquisadores do mundo todo, entre os quais, o GenBank, Ribossomal Data Base Project (RDP), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) e GreenGenes, que possuem inúmeras sequências de DNA de organismos diversos depositadas (PAIXÃO et al., 2010).

Através da construção de bibliotecas de 16S rDNA foi possível o acesso a diversidade de bactérias presentes em amostras de cacau em processo de fermentação natural, que não foram identificados através de outros métodos dependentes e independentes de cultivo (GARCIA-ARMISEN et al., 2010). Por este método, estes autores identificaram espécies de *Glucocenatobacter*, e dos gêneros *Erwinia*, *Pantoea* e *Tatumella*.

Através de uma biblioteca de 16S rDNA, Lima et al. (2012) investigaram o impacto do processamento de cacau em pó em diferentes fases em uma linha de produção sobre a diversidade da comunidade microbiana. Houve uma variação nas comunidades de micro-organismos encontrados ao longo da cadeia de produção. Os micro-organismos encontrados pertenciam aos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, especificamente, as classes *Bacilli* e *Gammaproteobacteria*. O estudo revelou ainda que espécies de *Bacillus*, em especial *B. subtilis subsp. subtilis* são os sobreviventes finais da cadeia de produção de cacau em pó, devido à resistência destes micro-organismos à altas temperaturas.

2.5. ECOLOGIA MICROBIANA

A ciência que estuda os micro-organismos e suas interações com o meio biótico e abiótico é a ecologia microbiana. O entendimento sobre o papel ecológico dos micro-organismos tem se ampliado durante as últimas duas décadas. Sabe-se que eles apresentam estratégias metabólicas diversificadas, tornando-se, desse modo, importantes no ecossistema. A existência e a diversidade de seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e à

atividade microbiana (LOVELOCK, 1988; STOLZ et al., 1989; TRÜPER, 1992). Os micro-organismos são grandes fontes de diversidade genética, porém são pouco explorados (PROSSER et al., 2007). Fungos e bactérias realizam diversas funções ecológicas, como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e degradação de substâncias tóxicas. Além disso, formam diferentes associações com plantas, atuam no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação ecológica do ecossistema (KENNEDY et al. 2002).

Estima-se que apenas uma pequena parte dos micro-organismos existentes na natureza foi descrita (AZEVEDO, 1998). Com o surgimento e o aperfeiçoamento das técnicas moleculares tornou-se viável o estudo da diversidade microbiana de amostras ambientais, sem a necessidade de cultivo em laboratório. Sabe-se que a baixa culturabilidade é o principal problema encontrado para acessar estas comunidades, devido à dificuldade de simular as condições em que os micro-organismos endofíticos se encontram na natureza (SAITO et al., 2007). Os meios de cultura recuperam apenas 1% desses micro-organismos. A utilização das metodologias moleculares desencadeou, dessa maneira, uma mudança significativa na perspectiva no estudo da ecologia e diversidade microbiana. Uma pesquisa demonstrou que o número de divisões dentro do domínio *Bacteria* seria 53, dos quais aproximadamente 50% não possuem representantes cultiváveis (RAPPE; GIOVANNONI, 2003).

2.5.1. Diversidade

A expressão diversidade de espécies abrange duas grandezas distintas: riqueza e abundância relativa de espécies. A diversidade microbiana é definida em nível genético e ecológico (LYNCH et al., 2004). Os micro-organismos moldam ambientes, restauram ecossistemas, e propiciam a criação de novas biotecnologias. Portanto, o estudo da diversidade vai além da simples contagem numérica de espécies. Engloba desde as etapas de acompanhamento, mensuração, caracterização de habitats, até as etapas de isolamento, identificação dos indivíduos e, eventualmente, sua aplicação. É através do conhecimento da diversidade microbiana que produtos com potencial

biotecnológico podem ser desenvolvidos para diversas áreas da indústria (KENNEDY, 1999).

A diversidade de microrganismos é crítica para o funcionamento do ecossistema, porque há a necessidade da manutenção de processos ecológicos como a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos dentro do ecossistema. A diversidade genética, química e molecular dos micro-organismos é a base desses processos (MONARD et. al. 2011).

Diversidade é uma das características mais fundamentais no estudo de comunidades e pode ser medida com o auxílio de índices matemáticos, que levam em consideração informações taxonômicas na definição das unidades de medida (MELO, 2008). Alguns índices, como o de diversidade de Shannon-Weaver, Simpson e Hill; de riqueza, de Margalef e Menhinik; e de equabilidade de Pielou, fornecem informações importantes sobre o padrão de distribuição de espécies microbianas dentro do ecossistema (MAGURRAN, 2004).

A diversidade funcional de micro-organismos sugere uma variedade de espécies com diferentes atividades bioquímicas. Porém as espécies que desempenham funções semelhantes são igualmente importantes por que a sua atuação em um ecossistema resulta em redundância (KENNEDY, 1999). Este conceito envolve a manutenção do ambiente quando uma espécie substitui outra com mesma função. Espécies com pouca ou nenhuma redundância justificam um esforço prioritário para a conservação (WALKER, 1992). Neste sentido o conhecimento das espécies de micro-organismos, bem como sua funcionalidade no ecossistema é fundamental para qualquer decisão relacionada à preservação de espécies.

A diversidade de uma região que contém habitats diferentes pode ser dividida em três tipos: alfa (α), beta (β) e gama (γ). A diversidade α (local), equivale à diversidade dentro de um habitat ou de uma comunidade, a diversidade γ (regional), equivale à diversidade de uma grande área e a diversidade β é a diversidade entre habitats, ou, o quanto a composição de espécies é diferente de um lugar para outro (WHITTAKER, 1972).

2.5.2. Riqueza

A riqueza de espécies é o modo mais comum e direto de se medir a diversidade. Esse método consiste na contagem do número de espécies em uma determinada comunidade (WILSEY et al., 2005). Embora seja de fácil interpretação, em muitos casos é difícil contar todas as espécies numa área, o que se torna complexo em comunidades preservadas com grande quantidade de micro-organismos. Além disso, as comunidades são abertas à entrada e saída de migrantes (MELO, 2008).

Para estimar a riqueza quando se avalia sequências de 16S rRNA de mesmas regiões (ou de mesmo tamanho), ou seja baseada em UTOs (Unidades Taxonômicas Operacional), deve-se ter cautela na interpretação dos resultados, já que os níveis de similaridade entre as sequências de 16S rRNA para a definição de UTOs não são consensuais (STACH et. al, 2003).

2.5.3. Abundância

A abundância é definida pelo número de indivíduos de cada espécie, a abundância relativa consiste no número de indivíduos de uma espécie dividido pelo total de indivíduos da comunidade. Os tipos e a abundância dos organismos em uma comunidade dependem não somente dos fatores abióticos, mas também de fatores bióticos e das interações entre as várias populações. Existem várias formas de se mensurar a abundância, uma delas é através do diagrama de abundância que usam todas as informações disponíveis da comunidade e a equabilidade que expressa a uniformidade da distribuição das abundâncias entre as espécies da mesma comunidade, quanto maior for a equabilidade, mais homogênea será a distribuição das abundâncias (MAGURRAN, 2004).

Através de índices baseados na distribuição de abundância é possível estimar a partir de uma amostra a abundância para toda a comunidade. Um dos índices utilizados em ecologia é o alfa de Fisher. Esse índice tem relação com o número de espécies representadas por apenas um indivíduo na comunidade (MAGURRAN, 2004). O alfa de Fisher é considerado um índice de diversidade que permite a comparação de comunidades com diferentes tamanhos amostrais e pode ser utilizado para comparar diferentes comunidades, se ajustado logsérie

(MARTINS; SANTOS, 1999). O alfa é um valor paramétrico, diferentemente do índice de Shannon e do índice de riqueza (não paramétrico).

2.5.4. Composição

Comparar e classificar comunidades de acordo com a composição são preocupações antigas em ecologia e uma ampla variedade de técnicas e medidas, os chamados coeficientes de similaridade, já foi desenvolvida para isso. A riqueza e abundância de micro-organismos fornecem apenas uma estimativa quantitativa da diversidade microbiana, não considerando sua composição, ou a estrutura das comunidades. A composição refere-se a que elementos formam determinada unidade biológica; a estrutura, como eles se organizam fisicamente, e a função versa sobre que processos ecológicos ou evolutivos mantêm ou são produzidos pela unidade biológica considerada (NOSS,1990). Abundância, riqueza e composição de micro-organismos são parâmetros que, em conjunto, podem ser utilizados como indicadores para avaliação comparativa entre ambientes e suas qualidades como ecossistemas.

2.5.5. Estrutura e funcionalidade das comunidades

A comunidade é estruturada conforme a distribuição geográfica, disponibilidade dos recursos, abundância dos indivíduos que nela habitam e a força das interações que nela ocorrem (RICKLEFS, 2003). A estrutura de comunidade é caracterizada pelos seguintes parâmetros: riqueza, equabilidade, dominância e composição de espécies. Esses parâmetros juntos permitem caracterizar a diversidade de uma comunidade de micro-organismos.

O conhecimento sobre a funcionalidade dos micro-organismos ainda é escasso e, por isso, não permite a avaliação da contribuição efetiva dos componentes dos grupos funcionais na estabilidade e atividade dos processos ecológicos (WATANABE, 2001). Porém, sabe-se que a relação evolutiva entre planta e micro-organismos é bastante complexa, visto que as plantas fornecem um habitat propício, rico em nutrientes e proteção para os micro-organismos, e por outro lado, os compostos bioativos produzidos pelos micro-organismos podem ser usados como agentes de defesa pelos hospedeiros (O'BRIEN; WRIGHT,

2011). Os micro-organismos, assim como os demais seres vivos, desempenham papel reconhecido nos ecossistemas, sendo peças fundamentais no metabolismo do nitrogênio, fosfato, oxigênio e carbono, além de proporcionarem benefícios científicos e econômicos (SMITH, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, no Laboratório de Marcadores Moleculares do Centro de Biotecnologia e Genética (UESC) e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Uma representação explicativa das etapas do trabalho pode ser visualizada na **Figura 1**.

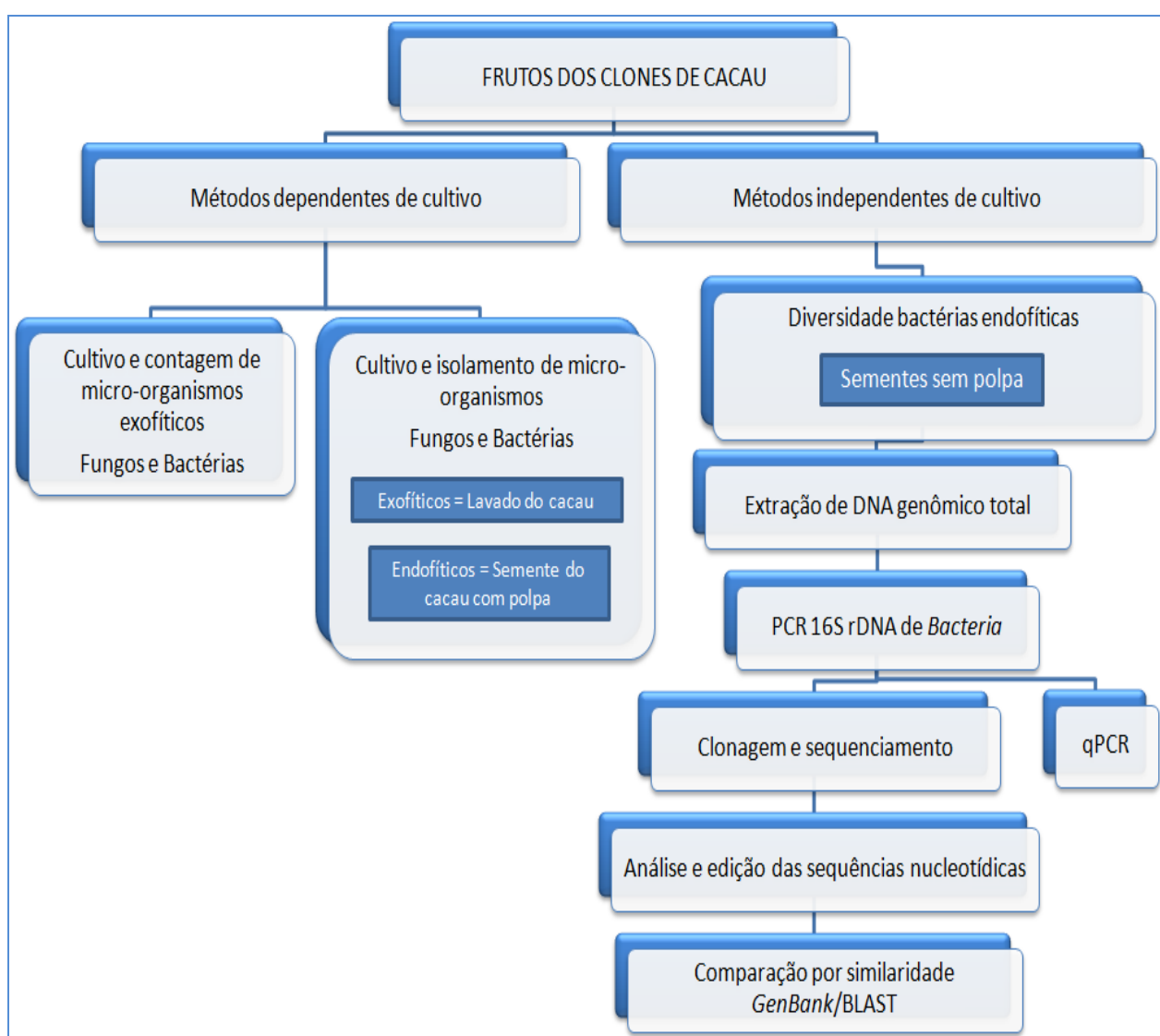


Figura 1: Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho.

3.1. ÁREA DE ESTUDO E COLETA DOS FRUTOS DO CACAUEIRO

Coletas de 6 frutos de cacauzeiros de cada genótipo foram realizadas em 19.09.11 para os testes preliminares de meio de cultura e técnicas de obtenção de micro-organismos (Item 3.1). Novas coletas para os experimentos seguintes foram realizadas em 01.12.2011 e em 15.12.2011. Foram coletados quatro frutos maduros de cada árvore dos quatro genótipos do cacauzeiro, totalizando 64 frutos. As amostras de frutos foram coletadas dentro da mesma área, situada na Fazenda Cinco Porcos, dentro da propriedade da Mars Center for Cocoa Science, no Município de Barro Preto, Bahia, onde as plantas de cacauzeiro da idade de 2 anos foram mantidas sob manejo a pleno sol (**Figura 2**). Os frutos coletados (**Figura 3**) estavam distribuídos nas extremidades opostas das árvores, buscando padronizar as posições de coleta dos frutos entre as árvores e entre genótipos. Os frutos foram coletados em sacos plásticos estéreis, evitando-se o contato manual. Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas ao Laboratório de Microbiologia da Agroindústria - UESC, onde foram realizados os métodos dependentes de cultivo.



Figura 2: Plantas de cacau na área de coleta. Fazenda Cinco Porcos, Barro Preto, Bahia.



Figura 3: Frutos dos quatro genótipos de cacauzeiros coletados na Fazenda Cinco Porcos, Mars Center for Cocoa Science, no Município de Barro Preto, Bahia.

3.2. OBTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EXOFÍTICOS PARA AVALIAÇÕES PRELIMINARES

As avaliações preliminares consistiram em testar quatro meios de cultura e três diferentes técnicas para capturar diferentes morfotipos de micro-organismos exofíticos. Foram utilizados os meios AN (Ágar Nutriente) e TSA (Ágar Triptona Soja) para o crescimento bactérias; e EM (Extrato de Malte) e BDA (Batata Dextrose Ágar) para o crescimento de fungos. Aos meios destinados ao crescimento de bactérias foi adicionado maconzeb 50 μ g/mL e aos meios destinados ao crescimento de fungos foi adicionado cloranfenicol 50 μ g/mL e rosa bengala (0,05 g.L⁻¹). Todo o procedimento para obtenção dos micro-organismos foi realizado em câmara de fluxo, sem contato manual com a amostra. Seis frutos de cada genótipo foram utilizados para as análises prévias, e foram as repetições deste experimento. Para cada repetição (fruto) foram aplicadas as três técnicas, que consistiram em:

1. Rolar o fruto do cacau em cada meio de cultura vertido em placas de Petri;
2. Obter uma suspensão de micro-organismos através do borrifamento de 100 mL de solução salina 0,9% estéril em cada fruto e plaquear 200 μ L desta suspensão (Lavado do cacau) em cada meio de cultura. A suspensão foi coletada através de funis de aço inox e recipientes estéreis.
3. Rolar o fruto do cacau em meio de cultura novamente, após a obtenção do lavado.

A análise prévia consistiu em 288 observações, sendo: 3 técnicas, 6 repetições, 4 genótipos e 4 meios de cultura.

As placas foram incubadas em BOD 30°C no escuro por 72h para o crescimento das colônias. Após este período foi realizada a análise macromorfológica das colônias e contagem destas. Neste experimento não houve procedimento de isolamento das colônias. Características macroscópicas como formas de crescimento, dimensões, arranjos, bordas, elevação, tamanho, coloração foram utilizadas para diferenciar as colônias de fungos e bactérias (**Figura 4**).

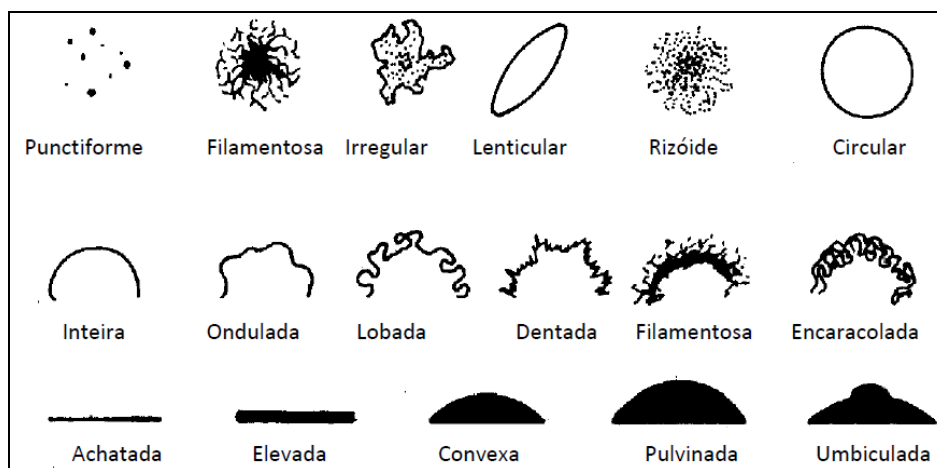


Figura 4: Algumas características macromorfológicas utilizadas para diferenciar colônias. Fonte: Abelho, 2009.

3.3. OBTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS PARA ANÁLISE DE RIQUEZA

A análise de riqueza de micro-organismos associados aos frutos de cacauzeiros foi realizada com delineamento para investigação de fungos e bactérias, exofíticos e endofíticos. Estes micro-organismos foram obtidos da parte externa do fruto (exofíticos) e da polpa com a semente (considerados aqui como endofíticos conforme definição de Azevedo et al., 1998) (**Figura 5**). Todas as análises foram feitas a partir de quatro clones do cacauzeiro com quatro repetições por genótipo (árvore).

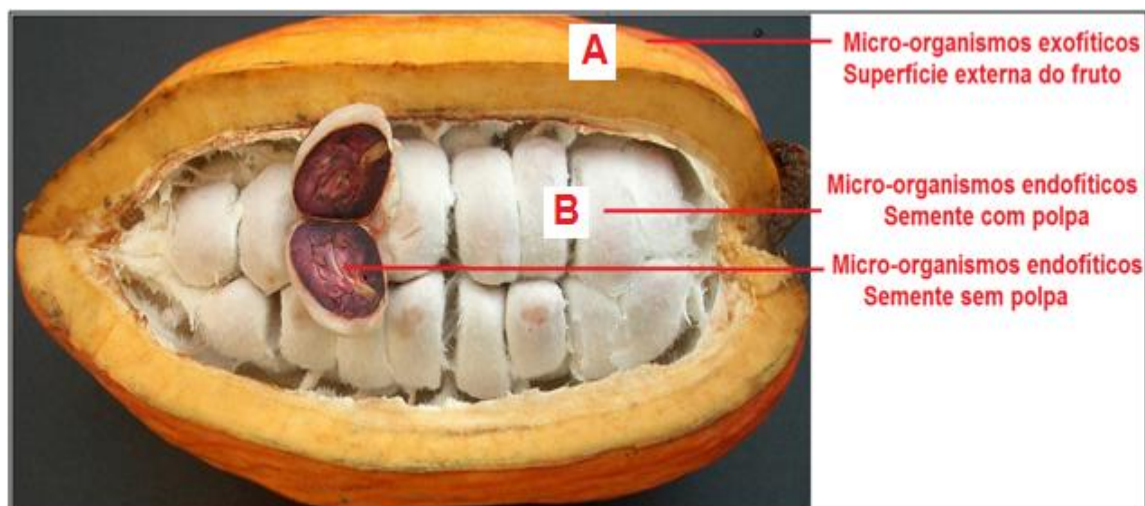


Figura 5: Locais de obtenção dos micro-organismos para análise de cultiváveis: A- exofíticos e B –endofíticos no fruto do cacauero. Adaptado a partir de: <http://globomidia.com.br/produtos/cacau>.

3.3.1. Obtenção dos micro-organismos cultiváveis exofíticos

Para a obtenção de fungos e bactérias exofíticos, cada fruto foi borrifado com 100 mL de solução salina estéril 0,9% (conforme a técnica 2 descrita no item 3.1). A coleta do lavado dos quatro frutos da mesma árvore foi feita em um único recipiente, totalizando 400 mL de lavado dos frutos por árvore. Após homogeneizar o lavado, uma alíquota de 200 μ L do lavado de cada planta foi plaqueada e espalhada com auxílio de alça de Drigalsky, em placas de Petri de 90x15 mm, contendo os mesmos meios de cultura utilizados no experimento anterior. Lavados de mesma amostra foram plaqueados em duplicata do meio de cultura. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo, sem contato manual com a amostra. As placas foram mantidas em BOD 30°C no escuro por 72 h. As colônias de fungos e bactérias obtidas foram isoladas, subcultivadas no mesmo meio de cultura em que se originaram e purificadas. A purificação da colônia de fungo foi feita através de discos de meios com aproximadamente 3 mm de diâmetro contendo o micélio. A purificação das colônias de bactérias foi realizada pelo método de estrias.

3.3.2. Obtenção dos micro-organismos cultiváveis endofíticos

Para a obtenção de fungos e bactérias endofíticos, cada fruto foi lavado com esponja, água e detergente, enxaguado e borrifado com Etanol 70%. Logo

depois, cada fruto foi acondicionado e isolado em saco estéril. Após acondicionar os frutos nos sacos, cada fruto foi rachado ao meio com o auxílio um machado, sem abri-lo, de forma que suas partes permanecessem complementares. Dentro da câmara de fluxo, o fruto foi aberto (**Figura 6**) e as sementes foram separadas com auxílio de pinças estéreis, com o cuidado para que as sementes não tivessem contato com a parte externa dos frutos. De cada fruto, 1 semente foi colocada em tubo de centrífuga de 50 mL estéreis contendo 25 mL meio de cultura vertido inclinado (**Figura 7**). Para o crescimento dos endofíticos, foram utilizados os mesmos meios de cultura utilizados para o crescimento dos micro-organismos exofíticos, porém, sem a adição de agentes anti-microbianos. Foi feita uma repetição para cada meio de cultura. Portanto, de cada árvore, oito sementes com polpa, sendo duas por fruto, foram utilizadas para o crescimento de micro-organismos endofíticos. Os tubos contendo as sementes em meios de cultura foram mantidos em BOD 30°C no escuro, e à medida que os micro-organismos cresceram, foram isolados, subcultivados nos mesmos meios de cultura em que se originaram e as colônias foram purificadas.

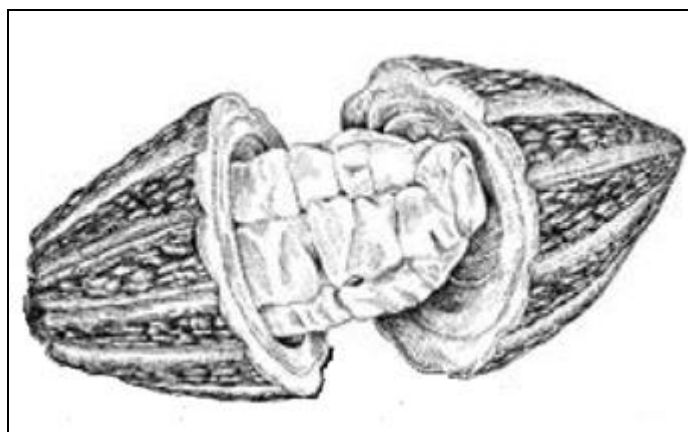


Figura 6: Demonstração da obtenção de sementes de cacau para análise de micro-organismos. Adaptado de Setenta; Lobão, 2012.

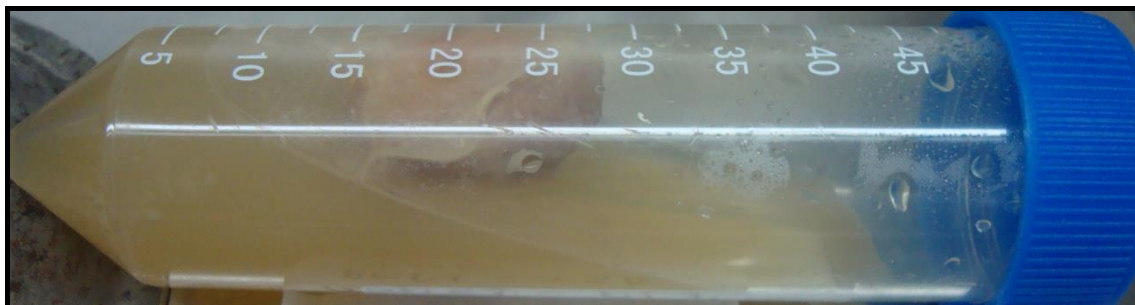


Figura 7: Semente de cacau com polpa em meio de cultura.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS

Os resultados do teste dos meios de cultura foram avaliados através da análise de variância (ANOVA). O efeito do genótipo e, ou repetição (árvore) na variável riqueza de micro-organismos foi avaliado através das análises de qui-quadrado (χ^2) em tabelas de contingência de 4 (genótipos de cacauzeiros) X 4 (repetições ou árvores). Foram utilizadas quatro tabelas, uma para cada análise: fungos exo/endofíticos, bactérias exo/endofíticas. Os genótipos, domínios taxonômicos, e locais de obtenção dos micro-organismos (exo/endofíticos) foram testados integradamente como fatores de variação na riqueza de micro-organismos por meio da análise de variância e teste de Tukey.

Para testar a hipótese de nulidade (H_0) de que, se a riqueza entre fungos e bactérias fosse equivalente nas repetições por genótipo, não haveria desvios dos valores observados em relação aos esperados (média aritmética dos valores de riqueza de bactéria e fungos) foi realizado o teste de qui-quadrado (χ^2). Este teste também foi realizado para avaliar mútua exclusão entre esses domínios (competição), com os dados de riqueza de bactérias e fungos endofíticos somados envolvendo as repetições de cada genótipo.

3.5. OBTENÇÃO DE SEMENTES PARA A EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL

Quatro sementes de cada genótipo do cacauzeiro obtidas em ambiente estéril foram despulpadas para posterior extração de DNA genômico total. O procedimento de despulpamento foi realizado sem contato manual com auxílio de bisturi e pinça estéril, em câmara de fluxo (**Figura 8**). Por ser obtida em ambiente

estéril não houve necessidade de realizar procedimento de desinfestação superficial da semente. Portanto, o material vegetal utilizado para a extração de DNA total incluiu micro-organismos internos e externos ao tegumento da semente.

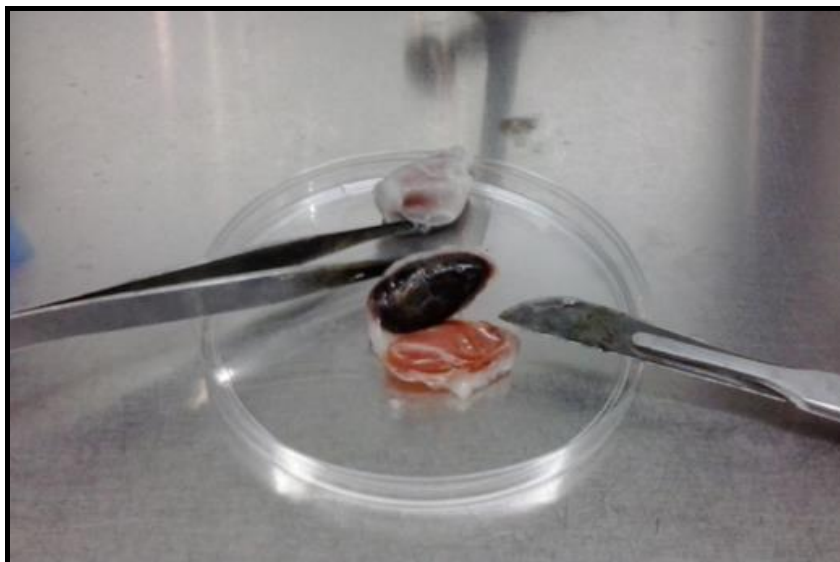


Figura 8: Procedimento de despulpamento das sementes de cacauero.

3.6. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL PARA ANÁLISE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

As amostras de sementes de cacau despulpadas foram maceradas em nitrogênio líquido, e às alíquotas de 25 mg adicionou-se 700 μL do tampão de extração (NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, Na₂EDTA 20 mM, PVP - polivinilpirrolidona 2%, CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio 2%, SDS - dodecil sulfato de sódio 2% e β -mercaptoetanol 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$) em microtubos de 1,5 ml. As amostras foram submetidas à agitação em vortex por 5 s e deixadas em banho-maria por 50 min a 65°C, com inversão a cada 10 min. Após as amostras atingirem a temperatura ambiente, foi adicionado 300 μL de AcK 3M e 5 μL de proteinase K 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, agitadas em vortex por 5 s e centrifugadas 12000 rpm por 10 min. À fase aquosa superior (sobrenadante) foi adicionado 500 μL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1; v/v/v), agitou-se em vortex por 5 s, e centrifugou-se a 12000 rpm por 5 min. Ao sobrenadante foi adicionado 500 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v/v), agitou-se em vortex por 5 s, e centrifugou-se a 12000 rpm 5 min. Para precipitar o DNA, 125 μL de AcNH₄ 10M

e 375 µL isopropanol foram adicionados ao sobrenadante. As amostras foram agitadas suavemente e deixadas a -20°C por 30 min. Após esse período, foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. O pellet foi lavado com 200 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 7500 rpm por 2 min. O pellet foi lavado novamente com 200 µL de etanol absoluto e centrifugou-se a 7500 rpm por 2 min. Descartou-se o sobrenadante, e as amostras secaram em temperatura ambiente por cerca de 30 min. O pellet foi ressuscitado em 40 µL de TE-RNase (10 µg/mL) e deixado em banho-maria a 37° C por 40 min. A qualidade do DNA foi determinada através de corrida em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio, em tampão TBE com marcador do progresso eletroforético *Loading Buffer*, e o Marcador Molecular *Low Mass Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente fotodocumentado. O DNA foi purificado com o Kit Mobio®.

3.7. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR)

A quantificação de genes de 16S rDNA de *Bacteria* foi feita com o intuito de inferir sobre a abundância deste grupo de organismos nas sementes de cacauzeiros. Para isto, reações de amplificação foram conduzidas em triplicatas para cada amostra de DNA obtida das sementes em solução contendo 5 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG, (Invitrogen), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador 968f 5'GAACGCGAAGAACCTTAC3' e 1387r 5'GGGCGGWGTGTACAAGGC3' (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995) na concentração de 50 mM, 1 µL da amostra de DNA total para reação de 10 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 5 min a 96°C de desnaturação inicial, 35 ciclos 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min, e 10 min de extensão final a 72°C no equipamento StepOne Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). Uma curva padrão foi construída a partir de diluições em série 1:10 com um DNA padrão contendo o fragmento de interesse. A curva foi estabelecida relacionando-se as concentrações conhecidas de DNA com os respectivos valores do limiar da fluorescência (Ct-"threshold cycle"), sendo esta posteriormente usada para interpolar a quantificação das amostras. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct médio obtido a partir da média

aritmética das triplicatas, para quantificar o número de cópias do gene alvo por mL de tecido vegetal. Os valores médios das triplicatas foram normalizados por ng de DNA genômico total. O conjunto de valores médios das triplicatas de cada genótipo foi analisado por ANOVA com valor de $p < 0.05$ considerado significativo.

3.8. BIBLIOTECA DO GENE 16S rDNA

3.8.1. Amplificação do gene 16S rDNA de *Bacteria*

Para as reações de amplificação do gene 16S rDNA de *Bacteria*, foram utilizados os primers 27f 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3' e 1492r 5'ACC TTG TTA GGA CTT3' (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). A amplificação feita em solução contendo: 5,0 μ L de tampão para PCR 10X; 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 μ L de dNTP 10 mM; 0,3 μ L de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen[®]); 2 μ L de cada *primer* a 5 pmol; 1 μ L da amostra de DNA de semente; e água ultrapura (Milli-Q) estrétil para o volume final de 50 μ L. As reações foram realizadas em duplicata em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 96°C por quatro min, 30 ciclos 94°C por 1 min, 55°C por 30s e 72°C por 2 min; e 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5 μ L do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, utilizando como padrão molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente fotodocumentado. Os produtos de amplificação das duplicatas foram homogeneizados no momento da purificação com o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (ver item 5.2).

Para evitar a interferência de DNA proveniente de cloroplastos vegetais, uma segunda reação de PCR do gene 16S rRNA foi realizada com os *primers* 799f 5'AACMGGATTAGATACCCKG3' (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492r utilizando os produtos da primeira PCR como molde. A amplificação foi feita em solução contendo: 5,0 μ L de tampão para PCR 10X; 2,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 μ L de dNTP 10 mM; 0,3 μ L de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen[®]); 2 μ L de cada *primer* a 5 pmol; 0,5 μ L de BSA 0,1%; 2 μ L do produto de amplificação da primeira PCR; e água ultrapura (Milli-Q) estrétil para o volume final de 50 μ L. As reações foram realizadas em duplicata em termociclador modelo GeneAmp

PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 20 s, 54°C por 40 s e 72°C por 40 s; e 72°C por 7 min. Todo o produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, utilizando como padrão molecular *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente quatro horas para permitir a separação das bandas correspondentes à primeira e segunda amplificação. A banda correspondente à segunda amplificação foi excisada do gel para a purificação dos produtos de PCR.

3.8.2. Purificação dos produtos de PCR

A banda contendo fragmento de interesse foi excisada do gel e purificada, utilizando-se o Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* seguindo as instruções do fabricante. Adicionou-se ao produto de PCR 500 µL de *Capture buffer type 3*, homogeneizou-se a amostra e a mistura foi transferida para uma coluna GFX (com filtro), sendo centrifugada a 16.000 X g por 30 s. O filtrado que passou pela coluna e foi descartado. Na coluna GFX adicionou-se 500 µL de *Wash buffer type 1* e centrifugou-se a 16.000 X g por 30 s, descartando o filtrado. A coluna foi transferida para um novo microtubo e, para eluição do DNA, foi adicionado 30 µL do *Elution buffer type 4* no centro da membrana. Incubou-se a mistura por 1 min a temperatura ambiente e centrifugou-se a 16.000 X g por 1 min. Para recolher o DNA purificado. Uma alíquota de 5 µL do DNA purificado foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, utilizando como padrão molecular 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente fotodocumentado. O produto purificado foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

3.8.3. Clonagem dos produtos de PCR e transformação de células de *E. coli*

A **figura 9** mostra as etapas principais envolvidas no processo de clonagem:

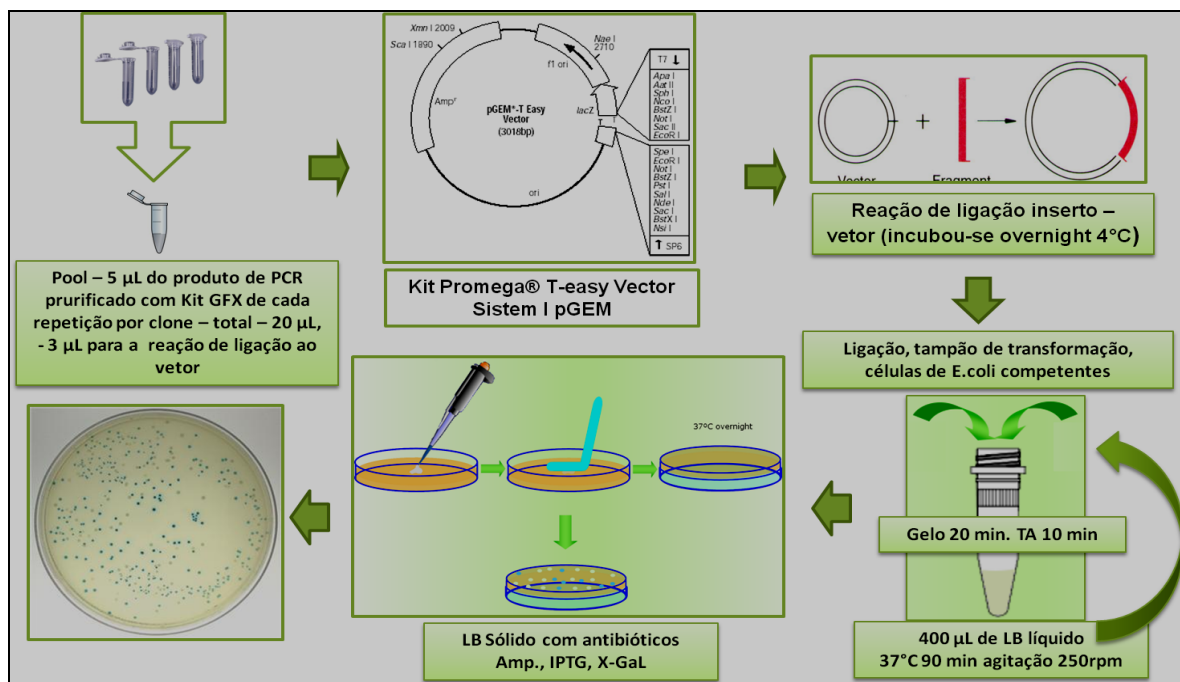


Figura 9: Principais etapas envolvidas no processo de Clonagem dos produtos de PCR e transformação de células competentes de *E. Coli*. De Novais, 2009 (adaptado).

Do produto amplificado e purificado da PCR do gene 16S rDNA de *Bacteria* de cada amostra de sementes foi retirada uma alíquota de 5 μ L para fazer um *pool* das quatro repetições de cada genótipo de cacaueteiro. Com isto, obteve-se um total de 20 μ L de produto da PCR para cada genótipo. Destes, 3 μ L foram utilizados para clonagem em vetor *pGEM® - T Easy*, conforme instruções do fabricante. A reação de ligação do produto de PCR ao vetor foi realizada da seguinte maneira: 1 μ L de T4 DNA Ligase (3U/ μ L); 5 μ L de tampão T4 DNA Ligase 2X; 3 μ L do produto de PCR e 1 μ L do vetor *pGEM® - T*. A reação foi incubada a 4°C.

O vetor contendo o inserto foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α ., sem a necessidade de choque térmico. O processo de transformação foi realizado da seguinte maneira: 5 μ L do produto de ligação foi misturado a 20 μ L do tampão de transformação filtro-esterilizado (1mL de KCM 10X, 1,5 mL de PEG 10% para volume final de 10mL; KCM 10X= 1M KCl, 0,3M CaCl₂, 0,5M MgCl₂) e deixado no gelo enquanto uma alíquota de 100 μ L de células competentes foram descongeladas. As células foram adicionadas à ligação, misturadas gentilmente, mantida no gelo por 20 min e logo depois à temperatura ambiente por 10 min. À

mistura da ligação com as células foram adicionados 400 µL de meio líquido LB. A mistura foi incubada a 37°C com agitação de 250 rpm por 90 min.

As células competentes transformadas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de ampicilina, X-Gal e IPTG (todos em concentração final de 0,2 mg/mL). A cultura com as células foi incubada em estufa a 37°C por 16h e, após este período, as placas foram armazenadas a 4°C para facilitar a visualização das colônias azuis e brancas.

3.8.4. Seleção dos clones e extração do DNA

Apenas as colônias brancas, as quais devem conter o vetor/inserto foram selecionadas das placas. As colônias foram coletadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas para microplacas 96-*well*, contendo 50 µL de TE (Tris 1M pH 8; EDTA 0,5M pH 8). Para a extração do DNA das células em suspensão, a placa foi submetida a 95°C por 10 min em termociclador. As placas contendo o DNA extraído foram mantidas a -20°C até posterior utilização.

3.8.5. PCR de Inserto e purificação

Para as reações de amplificação da região do vetor contendo o gene 16S rDNA de *Bacteria*, foram utilizados os *primers* M13f (5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A 3') e M13r (5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAG G 3') (HUEY; HALL, 1989). A amplificação foi feita em solução contendo: 3,0 µL de tampão para PCR 10X; 1,8 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,6 µL de dNTP 10 mM; 0,15 µL de Platinum[®] Taq Polimerase 5 U/µl (Invitrogen[®]); 1,2 µL de cada *primer* a 5 pmol; 1,0 µL da amostra de DNA extraída das colônias; e água ultrapura (Milli-Q) estéril para volume final de 30 µL. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 30s, 52°C por 30s e 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5 µL do produto de amplificação foi analisada em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, utilizando como padrão molecular 2 µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen Technology). O gel foi submetido a um campo elétrico de 80 V por aproximadamente 30 min e posteriormente fotodocumentado. As amostras amplificadas foram secadas em concentrador de DNA e armazenadas a -20°C até o momento da purificação.

Para purificar os produtos de PCR, as amostras foram ressuspensas em 20 μL de água ultrapura (Milli-Q) estéril, agitadas e deixadas em temperatura ambiente por 60 min. Aos 20 μL de produtos de PCR foram adicionados 3 partes de Isopropanol 100% e 1 parte de água ultrapura (Milli-Q) estéril. A mistura foi agitada em vortex e incubada a -20°C por 60 min. Após o tempo de incubação, centrifugou-se a mistura a 3700 rpm por 90 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida sobre papel absorvente, a 500 rpm por 10s. Foi adicionado 150 μL de etanol 70% e centrifugou-se a 3700 rpm por 90 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida sobre papel absorvente, a 500 rpm por 10s. As amostras foram secas em termociclador a 40°C por 10 min e ressuspensas em 20 μL de água ultrapura (Milli-Q) estéril, e armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

3.9. PCR DE SEQUENCIAMENTO E PRECIPITAÇÃO

Após a amplificação da região do inserto e purificação dos produtos de PCR, foi realizada a reação de sequenciamento em microplaca 96-*well*, utilizando o *Kit Big Dye Terminator V 3.1* e o *primer* M13f. A amplificação foi feita em solução contendo: 1 μL de *Big Dye*; 2 μL de tampão de sequenciamento 5X; 1 μL do *primer* a 5 pmol; 1 μL do produto de amplificação da região do inserto; e água ultrapura (Milli-Q) estéril para o volume final de 10 μL . As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 96°C por 1 min; 25 ciclos de 96°C por 10s, 52°C por 30s e 60°C por 1 min.

Após a reação, as amostras foram precipitadas para o sequenciamento conforme instruções do fabricante. Adicionou-se 1 μL de EDTA 125 mM, 1 μL de acetato de sódio 3M e 25 μL de etanol 100%. Com a placa selada a amostra foi misturada por inversão quatro vezes. Incubou-se à temperatura ambiente por 15 min e centrifugou-se a 2250 X g por 30 min. O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida a 185 X g, sobre papel absorvente. Adicionou-se 35 μL de etanol 70%. Centrifugou-se a 1650 X g por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi removido e a placa foi centrifugada invertida a 185 X g por 1 min. As amostras foram secadas em termociclador a 40°C por 10 min.

As amostras foram ressuspendidas em 10 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e o sequenciamento dos clones foi realizado no sequenciador capilar automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.10. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A verificação das sequências foi realizada com base nos eletroferogramas gerados pelo software *Sequencing Analysis*. A qualidade das sequências foi analisada através da inspeção visual dos eletroferogramas e posteriormente analisadas e editadas pelos programas Phred/Cross-Match/Phrap/Consed em sistema operacional Linux, para a remoção de sequências que apresentaram baixa qualidade. O nível de exigência mínimo foi de 500 bases com qualidade Phrap acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas), com intervalo de confiança de 0.05.

As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI - ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Considerou-se para as análises o primeiro resultado retornado pela busca.

Para as análises de riqueza foram utilizadas as maiores sequências obtidas relacionadas ao mesmo número de acesso fornecido pelo banco de dados. Micro-organismo com sequências correspondentes a diferentes acessos foram considerados uma UTO (Unidade Taxônomica Operacional) diferente. A estimativa de riqueza de UTO's foi feita pelo método de rarefação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÕES PRELIMINARES – MEIOS DE CULTURA E FORMAS DE COLETA PARA EXOFÍTICOS

Os quatro meios de cultura utilizados (AN, TSA, BDA e EM) propiciaram crescimento de diversos morfotipos bacterianos e fúngicos dos frutos de quatro genótipos de cacau; a riqueza foi avaliada somente por inspeção visual geral das placas, sem isolamento. Além disso, as condições gerais rotineiras de crescimento utilizadas, como temperatura de 30 °C e tempo de 72 h de incubação permitiram a diferenciação macromorfológica e contagem das colônias (**Figura 10**). Os meios de cultura testados não diferiram significativamente ($p > 0,05$) quanto ao número de micro-organismos exofíticos variados observados. Apesar disto, na análise visual das colônias, percebeu-se grande variação qualitativa de morfotipos de micro-organismos entre os diferentes meios.

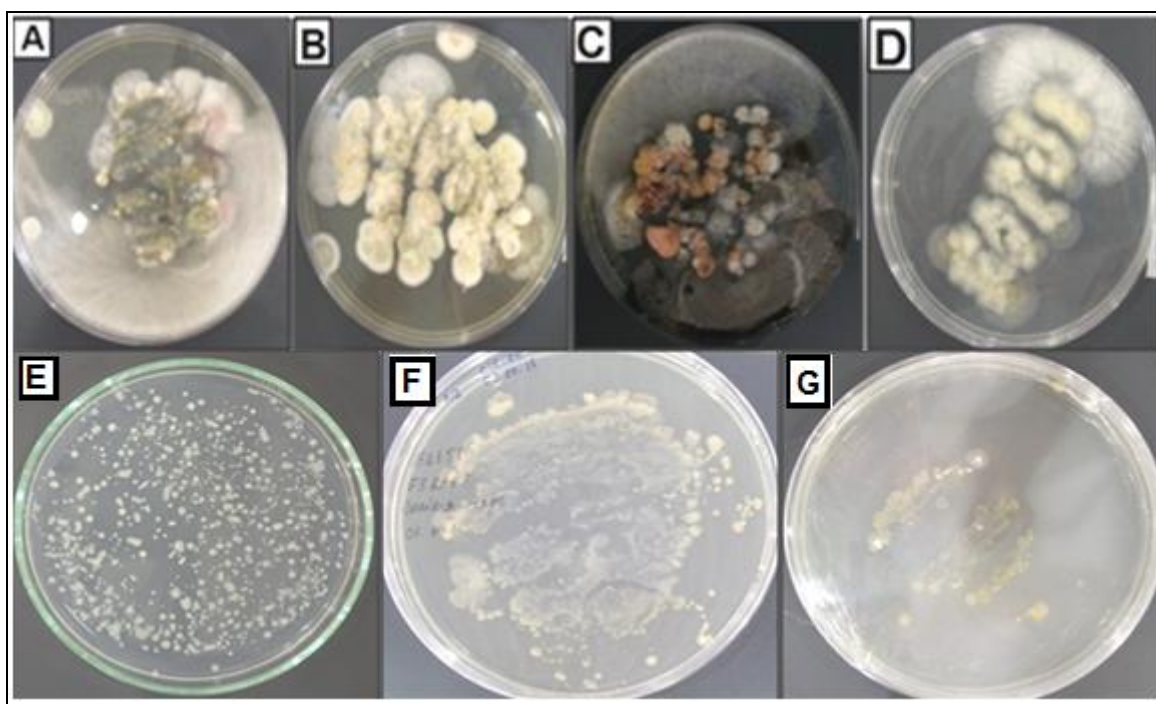


Figura 10: Colônias de fungos (A, B, C, D) e bactérias (E, F, G) exofíticas de frutos de cacau obtidos a partir dos quatro genótipos de cacau.

O uso da inspeção visual geral foi suficiente para capturar a diversidade de cultiváveis, tanto quantitativamente (quantos tipos diferentes = riqueza), quanto qualitativamente (quais tipos diferentes). O uso de diferentes meios sugere que uma maior variedade de micro-organismos cultiváveis pode ser obtida testando-se uma variedade maior de tipos de meios de cultura; isto, porém, só fará sentido se isolarmos os micro-organismos de cada meio, permitindo assim o cômputo dos tipos e suas abundâncias relativas. Da maneira como foi realizada neste experimento (inspeção visual e cômputo geral de tipos diferentes por placa), somente o parâmetro 'riqueza' (número de morfotipos diferentes) pode ser avaliado; e, neste caso, não houve diferença significativa entre os meios de cultura para este parâmetro.

Além dos meios de cultura, três técnicas diferentes de coleta foram testadas para verificar o quanto os procedimentos de obtenção dos micro-organismos poderiam afetar a riqueza observada pela inspeção visual geral. Os valores médios de número de morfotipos observáveis (riqueza) nas placas para as três técnicas utilizadas não mostraram diferenças relevantes e a magnitude dos desvios-padrão mostrou pouca variação experimental (**Tabela 1a**). Entretanto, uma análise mais detalhada destes resultados requer que consideremos a natureza do método de coleta. A dimensão e área superficial dos frutos utilizados para a obtenção dos micro-organismos exofíticos devem ser consideradas para os métodos de contato direto com o meio de cultura. Já para o método de lavagem e plaqueamento, importa o fator de diluição do lavado que foi plaqueado. Considerando que a área de contato do fruto com o meio de cultura correspondeu a $\sim 1/6$ da área total do fruto, e o fator de diluição utilizado na técnica do lavado foi de 1:500, o valor de número total de micro-organismos possível de ser recuperado com essas técnicas foi corrigido com base nesses fatores (**Tabela 1b**). Observou-se que, ao aplicarmos essas correções nos valores de riqueza observados (fator de diluição do lavado e proporção da área superficial do fruto que efetivamente entrou em contato com o meio de cultura), a capacidade de isolamento de micro-organismos foi expressivamente maior com a técnica do lavado. Portanto, esta técnica foi a escolhida para os próximos experimentos por apresentar maior potencial de recuperação de micro-organismos cultiváveis da superfície dos frutos. Esta técnica já foi utilizada com

sucesso para análise de micro-organismo obtidos de diferentes fontes (SANTOS, 2008; DUARTE et al., 2011; TAKAMUNE; VIEIRA, 2012)

Tabela 1a: Riqueza¹ de micro-organismos obtida por três diferentes técnicas de coleta através da inspeção visual das características macromorfológicas das colônias.

Técnicas ²	Bactéria	Fungo
R	5,64 (±1,78)	7,12 (±3,11)
L	5,56 (±2,25)	5,12 (±3,49)
L+R	8,12 (±2,49)	5,96 (±2,99)

¹ Valores da tabela são médias \pm desvio padrão (n = 6) do número de micro-organismos visualmente distintos computados por placa.

² R = Rolado do cacau; L = Lavado do cacau; L+R = Rolado do cacau após lavar.

Tabela 1b: Correção dos valores de riqueza para a área de contato total do fruto com o meio de cultura e para o volume total do lavado plaqueado.

Técnicas ¹	Bactérias	Fungos
R	5,64 (x 6) = 33,84	7,12 (x 6) = 42,72
L	5,56 (x 500) = 2780	5,12 (x 500) = 2560
L+R	8,12 (x 6) = 48,72	5,96 (x 6) = 35,76

¹ R = Rolado do cacau; L = Lavado do cacau; L+R = Rolado do cacau após lavar.

O fato de não se isolar micro-organismos com esse procedimento de inspeção visual geral da placa impossibilita o cômputo preciso da composição de exofíticos; isso ocorre porque não é possível saber se há repetição de isolado entre placas que compõem as réplicas dos tratamentos, e o quanto dessa repetição ocorre. Desse modo, só foi possível trabalhar-se com a variável riqueza, cujo valor é dado diretamente pela inspeção visual geral (contagem das colônias em placa).

As diferentes naturezas dos métodos de coleta sugerem não ser possível compará-los diretamente (via análise estatística), visto que há normalizações de dados a serem feitas (com base nas proporções de área de fruto e de volume plaqueados); quando isto foi realizado (mesmo que tendo sido feito sobre dados de riqueza, e não de abundância), ficou clara a vantagem quantitativa em favor do lavado, que permite se obter ~2 ordens de grandeza a mais de micro-organismos em relação à rolagem. Ou seja, uma maior quantidade de micro-organismos pode ser esperada para uma coleta baseada em lavagem da superfície dos frutos, motivo pelo qual se seguiu com esta técnica para os experimentos posteriores.

4.2. ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS

A partir dos resultados obtidos com as avaliações preliminares, realizou-se experimentos de isolamento de fungos e bactérias exo/endofíticos de frutos de cacau, usando as mesmas condições de crescimento dos micro-organismos, meios de cultivo, e técnica de coleta para a captura dos exofíticos (lavado). A análise visual permitiu a diferenciação macromorfológica e isolamento das colônias, compondo coleções de micro-organismos cultiváveis oriundas de quatro genótipos distintos de cacauero.

Para confirmar a variação de morfotipos de micro-organismos exofíticos obtida entre os diferentes meios de cultura, observada com as avaliações preliminares, lavados de mesma amostra foram plaqueados em duplicata, em mesmo meio de cultura. A repetição do meio de cultura evidenciou que as colônias de micro-organismos obtidas de mesmo genótipo formaram conjuntos macromorfológicos nitidamente semelhantes. Em contraposição, diferentes agrupamentos de micro-organismos, obtidos de mesmo genótipo, se formaram quando crescidos em meio de cultura diferente. Esta observação foi válida tanto para morfotipos bacterianos, que cresceram nos meios AN e TSA, quanto para morfotipos fúngicos, que cresceram nos meios BDA e EM (**Figura 11**).

Esses resultados confirmaram que, a partir do isolamento de micro-organismos (não somente da avaliação visual geral), uma maior riqueza de morfotipos distintos pode ser obtida usando-se meios diferentes. Uma vez que os isolados da coleção sejam definidos taxonomicamente com maior precisão

(morfologicamente e, ou molecularmente), estudos comparativos de 'composição de espécies' em comunidades microbianas poderão ser realizados, com intuito de verificar potenciais efeitos de genótipos nessa variável. Conforme Park et al. (2002), através do método de isolamento, utilizando vários meios de cultura, um número maior de isolados podem ser obtidos, mesmo que alguns deles não sejam morfologicamente distinguíveis. Desta forma, os autores concluem que a multiplicidade de meios de cultura pode oferecer um número de cepas de micro-organismos maior para busca por novas fontes biotecnológicas. Em seu estudo que avaliou a diversidade morfológica de micro-organismos marinho em três diferentes meios de cultura, quatorze por cento dos isolados exibiram a mesma morfologia de colônias a partir de dois meios diferentes, e 33% dos isolados foram encontrados entre os três meios diferentes.

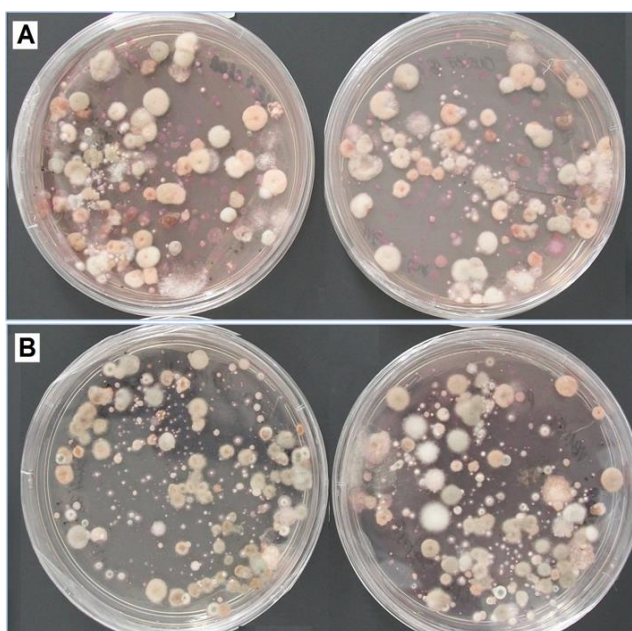


Figura 11: Réplicas de fungos exófitos obtidos do Lavado do genótipo VB1151, e crescidos em meio de cultura EM (A) e BDA (B).

A partir do isolamento de micro-organismos crescidos nos diferentes meios de cultura, uma coleção de fungos e bactérias foi criada, armazenada e catalogada, com um total, para os quatro genótipos em conjunto, de 382 isolados fúngicos e 302 isolados bacterianos, todos morfologicamente distintos entre si. As

Figuras 12 e 13 ilustram uma parte dessa diversidade morfológica de microorganismos cultiváveis acessada com esses procedimentos.



Figura 12: Colônias de fungos exófitos isoladas em meio BDA e EM obtidos de quatro genótipos de cacauzeiros.

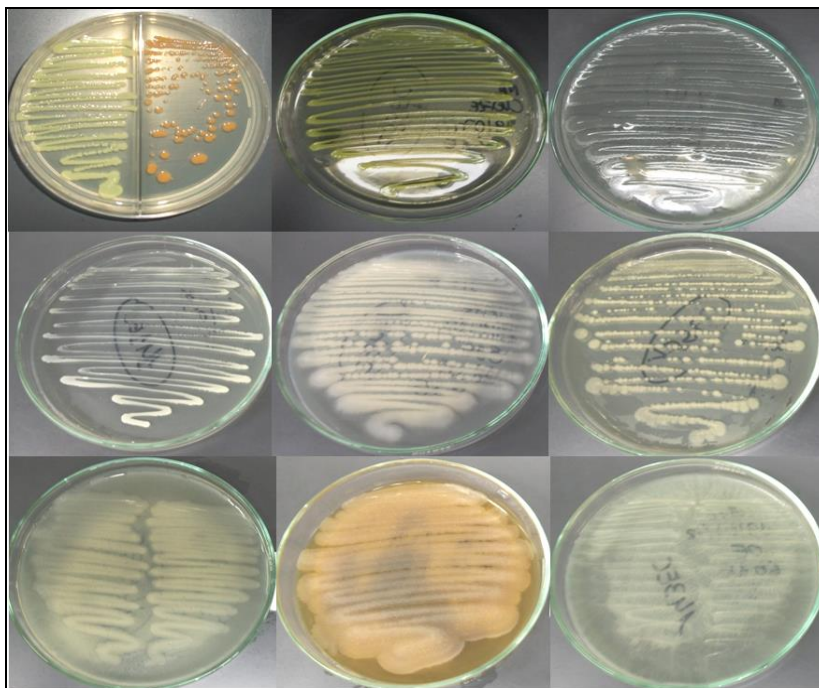


Figura 13: Colônias de bactérias exófitas isoladas em meios AN e TSA obtidos de quatro genótipos de cacauzeiros.

4.3. RIQUEZA DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS EM FRUTOS DE CACAU

4.3.1. Fatores com efeito na variável

Após as análises morfológicas e os procedimentos de isolamento, as colônias de fungos e bactérias pertencentes a cada genótipo e cada repetição foram contabilizadas, para se verificar se existem efeitos de genótipos das plantas e, ou repetição (árvore) no parâmetro 'riqueza' de micro-organismos cultiváveis, considerando bactérias e fungos exo/endofíticas. Testou-se esta hipótese a partir de análises de qui-quadrado (χ^2) em tabelas de contingência de 4 (genótipos de cacauzeiros) x 4 (repetições ou árvores), cada uma para uma combinação de domínio de origem de micro-organismo (fungo ou bactéria) com sua localização na planta (exo- ou endofíticos). Os dados e a disposição dos mesmos nas respectivas tabelas de contingências estão apresentados no **Anexo 1**. A análise revelou haver diferenças muito significativas na riqueza de morfotipos de micro-organismos fúngicos e bacterianos, tanto exofíticos quanto endofíticos, para os quatro genótipos de cacauzeiro (**Tabela 2**).

Tabela 2: Valores de χ^2 e de probabilidade¹ para riqueza de micro-organismos exofíticos e endofíticos obtidos de frutos de quatro genótipos de cacauzeiro.

Classificação do micro-organismo	Bactérias		Fungos	
	χ^2	Valor de p	χ^2	Valor de p
Exofíticos	26,028	0,002	78,089	<0,0001
Endofíticos	53,715	<0,0001	41,390	<0,0001

¹ Os valores da Tabela são oriundos da análise de qui-quadrado de quatro tabelas de contingência 4 x 4 (genótipos x repetições), em que se testou cada uma das combinações de local na planta com domínio taxonômico (ver anexo 1).

Esses resultados sugerem que a riqueza de exo/endofíticos fúngicos e bacterianos de frutos de cacau sofre algum efeito dos respectivos genótipos da planta (clones), ou das árvores individuais que podem ser consideradas como as unidades experimentais, visto que foi utilizado o material de quatro frutos em conjunto por árvore para compor cada repetição. É possível também que esteja

ocorrendo um efeito da interação entre os dois fatores, o qual, porém, não pode ser detectado por esta análise.

Os resultados da **Tabela 2** apontaram a necessidade de se decompor os fatores de variação para as riquezas de morfotipos cultiváveis estudada, uma vez que era necessário dissecar não somente o efeito de genótipos de cacaueteiro, mas também testar integradamente os domínios taxonômicos e o local no fruto como fatores de variação. Por meio de análise de variância (ANOVA), esses fatores com possível efeito nas diferenças de riqueza observadas, bem como suas potenciais interações, foram avaliados. Os resultados evidenciaram que o único fator de variação que interferiu significativamente na riqueza de micro-organismos cultiváveis foi o local de ocorrência no fruto (**Tabela 3**). O teste de médias para essa variável (Tukey, $p < 0,05$) mostrou que a riqueza de exofíticos (15,31) foi significativamente maior que a de endofíticos (6,88). Para os demais fatores – genótipos de cacaueteiros, domínios taxonômicos (*Fungi* e *Bacteria*), e as interações duplas e triplas entre eles – não foi possível detectar efeitos significativos destes fatores na riqueza de morfotipos de micro-organismos cultiváveis em frutos de cacaueteiro.

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) para os efeitos de genótipos, local de ocorrência dos micro-organismos e domínio taxonômico sobre a riqueza de morfotipos observada em frutos de cacaueteiro.

Fatores de variação	F	p
Genótipo ¹	0,61983	0,605589
Local no fruto²	8,80010	0,004684
Domínio ³	0,62578	0,432797
Genótipo x Local	1,19926	0,320122
Genótipo x Domínio	1,44278	0,242000
Local x Domínio	2,36601	0,130571
Genótipo x Local x Domínio	1,48720	0,229877

¹ Refere-se aos genótipos CCN-51, VB-1151, PH-16, PS-1319.

² Refere-se aos exofíticos (externo ao fruto) e endofíticos (semente + polpa aderida).

³ Refere-se a *Fungi* e *Bacteria*.

Com esses resultados, ficou fortemente indicado que, ao menos em termos de micro-organismos cultiváveis, a riqueza de exofíticos em frutos de cacauero é significativamente maior que a riqueza microbiana na porção endofítica relativa a sementes com polpa. É importante reconhecer que nossos estudos não podem afirmar categoricamente que a riqueza de exofíticos cultiváveis de frutos de cacauero é maior que a de endofíticos nesses mesmos frutos, porque não se testou a porção do mesocarpo entre a superfície e a polpa.

Os resultados (**Tabela 3**) também indicaram que a significância estatística de qui-quadrado observada para as tabelas de contingência 4 x 4 foram provavelmente causadas por um efeito de árvore (repetição) na riqueza de cultiváveis, sendo necessário verificar este efeito de forma mais específica.

Tomados em conjunto, os resultados mostraram que, para micro-organismos cultiváveis, não se observou efeito de genótipo de cacauero na variável riqueza de morfotipos (**Tabela 3**), mas houve significância estatística para as análises de qui-quadrado envolvendo genótipos e repetições, nas quatro combinações 'local-domínio' (**Tabela 2**). Desse modo, para se confirmar se as diferenças de riqueza de morfotipos de micro-organismos se deveram às repetições (árvore = unidade experimental), foi realizado o teste do qui-quadrado. Neste caso, comparou-se os números de distintos morfotipos de micro-organismos bacterianos e fúngicos exo/endofíticos obtidos em cada repetição por genótipo, com o valor teórico esperado para a hipótese nula de que não havia diferença de riqueza entre essas quatro árvores de cada genótipo (**Tabela 4**).

Tabela 4: Valores de χ^2 para o efeito de repetição (árvore) sobre a riqueza de morfotipos bacterianos e fúngicos exo/endofíticos por genótipo.

Genótipos	Bactérias		Fungos	
	exo	endo	exo	endo
PH16	3,38	8,4 *	10,11 *	6,92
CCN51	5,23	41,88 *	0,95	19,30 *
VB1151	9,47 *	51,74 *	116,06*	4,85
PS1319	14,76 *	7,14	8,08 *	39,05 *

* Valores de χ^2 significativos (p < 0,05; GL = 3)

Os valores de χ^2 confirmaram um significativo efeito de árvore em todos os genótipos. Este efeito, porém, não foi observado para todos os domínios e locais do fruto entre os genótipos (**Tabela 4**).

Os resultados para os testes de qui-quadrado para efeito de repetição na riqueza de morfotipos microbianos do fruto sugerem que cada cacaueteiro tem características individuais, independente do genótipo, que interferem de forma mais determinante na riqueza microbiana dos frutos. Essas características específicas podem ser devidas a uma influência direta do entorno de ambiente da planta, provavelmente interferindo na fisiologia de resposta que, por sua vez, altera a riqueza de micro-organismos.

Esse resultado pode ser compreendido à luz da teoria hologenômica da evolução (Rosenberg et. al, 2007; Zilber-Rosenberg; Rosenberg, 2008), especialmente a partir de uma de suas quatro generalizações, que diz que a variabilidade genética de um holobionte é devida à variação contida em suas células teciduais e nos micro-organismos associados; a diferença de riqueza microbiana observada entre indivíduos pode estar representando essa porção microbiana da variação genética interferindo na fisiologia individual no momento da coleta dos frutos. A este nível de variação e para esta variável específica (riqueza), aparentemente, não se observa uma maior influência do genótipo da planta (**Tabela 3**).

Os resultados da **Tabela 4** em que nem todos os genótipos apresentaram significância para os respectivos valores de χ^2 para as combinações 'domínio-local' sugerem que há um efeito de interação do fator 'árvore' com o fator 'genótipo'; uma análise de variância integrada, semelhante à realizada na **Tabela 3**, que incluía as 'repetições' como fator de variação, poderá revelar significância para o efeito da interação dupla 'genótipo x repetição'.

4.3.2. Riqueza mutuamente exclusiva entre fungos e bactérias endofíticas

Durante o cômputo dos dados brutos de riqueza de endofíticos fúngicos e bacterianos nos quatro genótipos sob estudo, foi fortuitamente observada uma tendência: parecia estar havendo uma relação proporcionalmente inversa entre o número de tipos de fungos e de bactérias em cada árvore (repetição). Observou-

se que quando o número de tipos de bactérias era maior, o número de fungos na mesma amostra era visivelmente menor, e vice-versa (**Tabela 5**). Essa aparente relação, porém, não parecia obedecer a nenhum padrão específico que pudesse ser associado a genótipo; isto foi bastante evidente quando se observou, por exemplo, dados de algumas repetições do genótipo CCN51: nas árvores 1 e 3 obteve-se 27 e 33 bactérias para nenhum e somente 1 representante fúngico, respectivamente, enquanto que na árvore 2 obteve-se somente 1 bactéria e 10 representantes fúngicos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Riqueza¹ de morfotipos bacterianos e fúngicos endofíticos obtidos a partir de frutos² de quatro genótipos de *Theobroma cacao* L. por árvore (repetição).

Genótipo	Árvore 1		Árvore 2		Árvore 3		Árvore 4	
	Bactéria	Fungo	Bactéria	Fungo	Bactéria	Fungo	Bactéria	Fungo
PH16	3	8	1	8	0	10	6	1
CCN51	27	0	1	10	33	1	7	2
VB1151	2	7	1	3	27	2	5	2
PS1319	0	0	4	20	7	19	3	0

¹ Dados da tabela correspondem ao número de tipos distintos de micro-organismos computados.

² Corresponde à porção interna do fruto, constituída por 2 sementes por fruto sendo 4 frutos por árvore aleatoriamente escolhidas + a polpa.

Assim, para testar a hipótese de que essa relação inversa foi de fato real, realizou-se o teste do qui-quadrado envolvendo as repetições de cada genótipo; a hipótese de nulidade (H_0) foi de que, se a riqueza entre fungos e bactérias fosse equivalente em cada repetição, não haveria desvios dos valores observados (**Tabela 5**) em relação aos esperados (média aritmética entre os valores de cada par); neste caso, os desvios puderam ser calculados usando somente os valores observados de riqueza de bactérias, já que os desvios para os correspondentes valores de riqueza de fungos seriam de mesmo módulo, porém de sinal invertido (o que não faz diferença no cálculo dos valores de χ^2). Os resultados levaram à rejeição da H_0 , pois os valores de qui-quadrado foram estatisticamente significativos para todas as análises, confirmando a suspeita de uma tendência à mútua exclusão entre fungos e bactérias (**Tabela 6**).

Tabela 6: Análise do contraste observado entre os números de morfotipos endofíticos bacterianos e fúngicos nas quatro repetições para cada genótipo.¹

Genótipos	χ^2	Valor de p
CCN51	33,62	< 0,001
PH16	10,64	< 0,01
PS1319	9,6	< 0,01
VB1151	13,3	< 0,01

¹ Graus de liberdade (GL) = 3

Interessantemente, esses resultados sugerem, ao menos em nível de riqueza, a existência de um fenômeno de competição geral entre membros desses domínios taxonômicos de hábito endofítico em sementes com polpa. Esse fenômeno parece ser independente do genótipo da planta, pois relações contrastantes (mais bactérias para menos fungos e vice-versa) ocorreram entre as repetições em todos os genótipos (**Tabela 5**). Este suposto efeito de mútua-exclusão de bactérias e fungos faz mais sentido de ocorrer para endofíticos, pois há esperada limitação física no espaço interno correspondente às sementes com polpa; a não limitação de espaço e, ou movimentação (principalmente transporte passivo pelo vento, chuva e animais) no ambiente externo ao fruto pode explicar a não-observação desse fenômeno de mútua-exclusão ocorrendo para os exofíticos.

Contudo, constituiu-se uma grande limitação dessas análises não ter sido possível estudar a variável 'abundância', visando compor um índice de diversidade melhor estruturado; a avaliação da abundância permitiria verificar a natureza desse fenômeno de competição inter-domínios observado, ou seja, se as diferenças de riqueza são compensadas ou não, e em que magnitude, por um maior ou menor número de indivíduos para as espécies de cada domínio.

Avaliar a incompatibilidade entre as espécies simbióticas, bem como os custos e benefícios de diferentes combinações de espécies mutualistas através de histórias co-evolutivas entre hospedeiro e simbiontes, também poderia esclarecer o papel do conflito na formação da dinâmica evolutiva de mutualismos.

Esta avaliação pode incluir a especificidade do hospedeiro, dinâmica coevolutivas, e a estabilidade do mutualismo (POULSEN et al., 2007).

4.3.3 Efeito de árvore com dados de riqueza combinada entre domínios

Com base nos resultados anteriores, pensou-se na possibilidade de que, como o teste de χ^2 para repetições por genótipo foi realizado com as riquezas de fungos e bactérias exo/endofíticas de forma separada (16 testes individuais – **Tabela 4**), o efeito de árvore observado poderia ter sido devido um efeito direto exatamente dessa relação inversa entre os números de tipos de bactérias e fungos observada na mesma repetição de cada genótipo (ao menos em relação aos endofíticos). Assim, levantou-se a hipótese de que após combinar os dados de riqueza, as repetições dentro dos genótipos poderiam homogeneizar-se ao ponto de não serem mais estatisticamente diferentes. Para testar esta hipótese, realizou-se outra análise de qui-quadrado semelhante à da **Tabela 4**, desta vez com os dados de riqueza de micro-organismos dos dois domínios somados para cada genótipo. Esta análise foi feita tanto para os micro-organismos exofíticos quanto para os micro-organismos endofíticos (**Tabela 7**). No geral, o efeito de árvore observado anteriormente se manteve para os genótipos, exceto para o PH16 em ambos os locais do fruto; o valor de χ^2 também não foi significativo para os exofíticos do CCN51.

Tabela 7: Valores de χ^2 para o efeito de repetição (árvore) sobre a riqueza de morfotipos de micro-organismos dos dois domínios, por genótipo.

Genótipo	exofíticos		endofíticos	
	χ^2	Valor de p	χ^2	Valor de p
PH16	4,23	> 0,25	0,95	> 0,80
CCN51	1,76	> 0,60	22,06	< 0,001
VB1151	116,97	< 0,001	31,57	< 0,001
PS1319	11,74	< 0,01	37,00	< 0,001

¹ Graus de liberdade (GL) = 3

Observando-se estes dados em conjunto com os resultados para a **Tabela 4**, confirmou-se que a não-significância encontrada para bactérias exofíticas e fungos endofíticos para o PH16 naquele teste foram suficientes para eliminar a significância estatística para este genótipo quando os dados de domínios foram combinados (**Tabela 7**). Da mesma forma, era esperado não se obter significância estatística para exofíticos dos dois domínios combinados para o CCN51, pois nem bactérias nem fungos exofíticos, considerados separadamente, mostraram significância estatística pelo χ^2 (**Tabela 4**). Por outro lado, a significância obtida para endofíticos combinados no PS1319 foi certamente devida ao grande efeito de repetições na riqueza de fungos endofíticos deste genótipo (**Tabela 4**).

Os resultados de qui-quadrado com dados combinados de bactérias e fungos para os locais do fruto permitem também observar um provável efeito da interação entre os fatores 'genótipo' e 'repetição', de forma semelhante ao observado para **Tabela 4**.

Tomados em conjunto, os resultados das análises estatísticas sobre os dados de micro-organismos cultiváveis são robustos em sugerir a existência de um efeito de árvore (indivíduo) na riqueza de bactérias e fungos exo/endofíticos de frutos de cacau, bem como um fenômeno de competição endofítica entre membros dos dois grandes domínios taxonômicos.

4.4. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS INDEPENDENTES DE CULTIVO *IN VITRO* EM SEMENTES DE CACAU

Os resultados anteriores com micro-organismos cultiváveis e avaliação de riqueza de morfotipos não permitiram avaliar com precisão se existe algum padrão de comunidades microbianas exo/endofíticas em frutos que esteja associado a genótipos de cacauzeiros. Considerando também que no sistema anteriormente relatado não foi possível avaliar 'abundância' de micro-organismos, optou-se pelo estudo molecular, independente de cultivo *in vitro*, da porção microbiana endofítica, somente para os representantes do domínio *Bacteria*. O conjunto de resultados apresentados a seguir foi obtido a partir da extração do DNA total de sementes, amplificação do gene 16S rDNA de *Bacteria*, seqüenciamento e identificação de espécies bacterianas por proximidade com

sequências armazenadas em banco de dados (*GenBank*). Apesar de que sequências de 16s rDNA obtidas neste trabalho podem estar relacionadas à isolados cultiváveis *in vitro*, para fins de simplificação, a expressão 'micro-organismos não-cultiváveis' foi usada indistintamente para os dados apresentados nesta seção.

Como primeiro passo nessa direção, testou-se a extração de DNA genômico total de sementes dos quatro genótipos de cacau sob estudo, obtidas em ambiente estéril, seguida por PCR específico para a região 16S rDNA do domínio taxonômico *Bacteria*. Os *primers* gene-específicos universais utilizados (que não amplificam DNA mitocondrial ou plastidial) permitiram a amplificação das regiões genômicas de tamanho esperado entre as diferentes amostras, com aproximadamente 1500 e 700 pb (**Figura 14**). Os resultados evidenciam o sucesso nos procedimentos iniciais, com presença de amplicons em todas as amostras extraídas e amplificadas, permitindo o seguimento dos estudos.

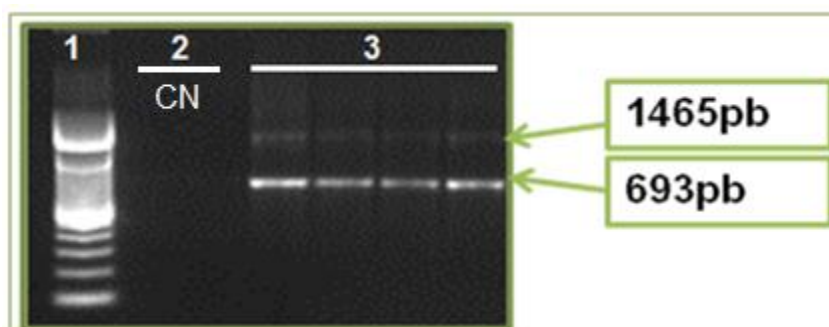


Figura 14: Exemplo de resultados de PCR com *primers* específicos para o gene 16S rDNA de bactérias, por perfil eletroforético em gel de agarose 1%. 1- marcador de tamanho molecular (*ladder* de 100 pb); 2- controle negativo; 3- amostras de amplificação de sementes de quatro genótipos de cacau. Os tamanho dos fragmentos observados corresponderam ao esperado a partir de uma Nested-PCR com *primers* que amplificam sequências internas do gene 16S .

Para um entendimento do potencial de amplificação dos *primers* universais de 16s rDNA, é necessário perceber a diferença de tamanho e complexidade entre os genomas bacterianos e o das células da planta. As células diplóides de cacau contêm 20 cromossomos de 2,0 a 1,19 μm (DANTAS; GUERRA, 2010), compondo um genoma de ~ 430 Mbp (ARGOUT et al, 2011). Este valor excede em ~ 2 ordens de magnitude a faixa de tamanho médio esperada para os

genomas de bactérias, que variam de ~1 a 9 Mbp. Se assumirmos que o número de células bacterianas seja igual (no máximo) ao número de células da semente, então a abundância de *template* de DNA microbiano extraído de uma amostra de DNA total de tecido sementes de planta deve ser no máximo 1%.

É importante salientar que uma sinalização positiva de amplificação dos genes de 16s rDNA da comunidade bacteriana sugere que haverá sucesso com PCR em tempo real, para uma medida quantitativa indireta do total de micro-organismos entre amostras ('abundância' total da comunidade bacteriana endofítica). Da mesma forma, torna-se viável a construção de uma biblioteca de 16s rDNA a partir desse DNA amplificado, para os experimentos posteriores de caracterização das variáveis 'riqueza' e 'composição', por identificação taxonômica em nível de espécie.

4.4.1. Abundância relativa das comunidades bacterianas entre genótipos

A partir do DNA total extraído, quantificou-se o gene 16S rDNA do domínio *Bacteria* presente na parte externa do tegumento e no interior da semente. Esta quantificação via qPCR foi realizada em triplicata para cada uma de quatro repetições de sementes (1 por fruto, 1 fruto por árvore), em cada genótipo de cacauero, com o objetivo de inferir sobre a abundância total das comunidades desses micro-organismos nessas amostras. Os rendimentos de DNA para cada extração de uma semente, e avaliados por espectrofotometria, foram diversos, com o total de DNA extraído por amostra variando de 7,6 a 16,3 ng/μL. Como uma variação na quantidade inicial de DNA afeta a disponibilidade de *template* para a reação, e isto interfere nos resultados de inferência sobre a comunidade total, foi necessário dar uma base comum de comparação entre amostras. Assim, os valores médios para as triplicatas de amplificação do gene 16S foram normalizados por ng de DNA genômico total, uma vez que os volumes de DNA extraído e ressuspendido que foram aplicados nas qPCR foram os mesmos. Os resultados mostraram uma grande variação na abundância de cópias desse gene entre as repetições de amostras (sementes), dentro de cada genótipo de cacauero (**Figura 15**). Observou-se uma provável significância estatística para essa variação entre repetições, dada a magnitude dos erros-padrão encontrada

para as triplicatas. Como número de cópias de 16s rDNA reflete a comunidade bacteriana total que pôde ser acessada pela técnica, observou-se que, também para a variável 'abundância', foi evidenciado um grande efeito de árvore (indivíduo), no momento das coletas, afetando o estabelecimento da comunidade microbiana endofítica total de semente (neste caso, inferida somente pela comunidade bacteriana).

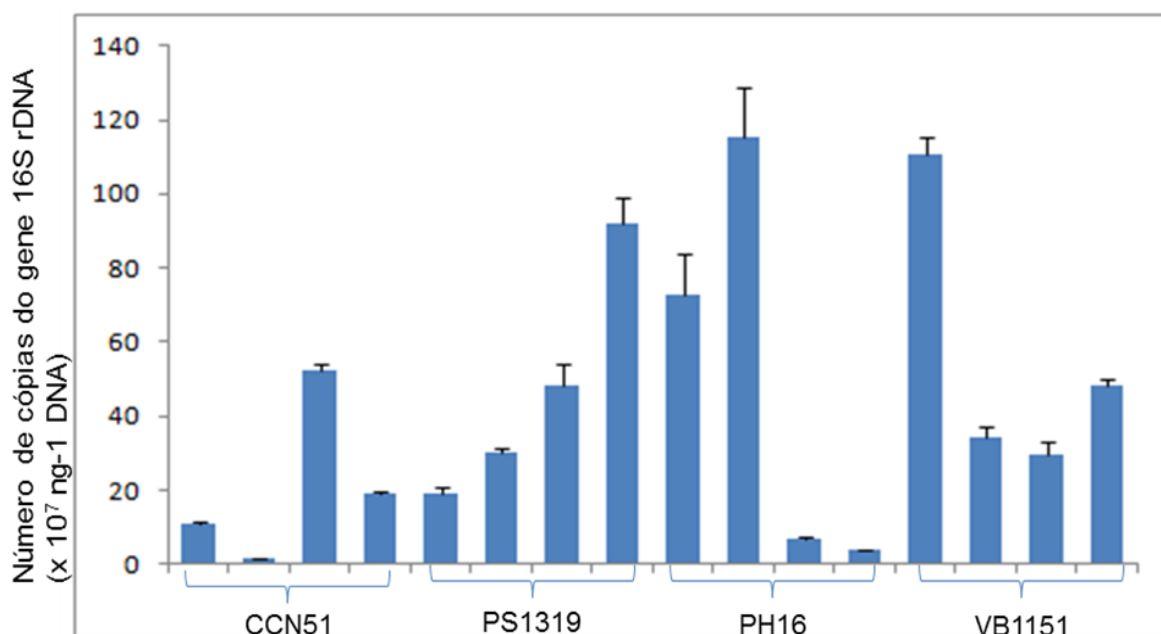


Figura 15: Número médio de cópias do gene 16S rDNA de *Bacteria* obtidas por qPCR para quatro repetições de sementes de cada genótipo de cacaueteiro. Os resultados apresentados foram normalizados por ng de DNA genômico total extraído para cada semente. Os valores do gráfico correspondem à média + erro padrão de três ampliações por amostra de DNA extraído.

Os resultados de abundância total de micro-organismos endofíticos em sementes corroboraram as evidências anteriormente discutidas (**Tabelas 4 e 5**) em favor de um grande efeito das características individuais na dinâmica endofítica dentro da planta, considerando agora a comunidade de não-cultiváveis.

De maneira semelhante à discutida anteriormente para riqueza de cultiváveis, esses resultados também se ajustam a uma das generalizações da teoria hologenômica, no sentido de que as variações individuais entre plantas observadas na porção microbiana residente em sementes estejam contribuindo para o estabelecimento de "hologenótipos" específicos para cada indivíduo. E isto aparentemente pode estar contribuindo na modulação das respostas fisiológicas

individuais às variações de microambiente de entorno da planta, devido à gama diversificada de funções bioquímicas e de interações dos micro-organismos com as células da planta.

Assim como riqueza de cultiváveis, este resultado de qPCR não permite visualizar eventuais diferenças devidas a efeito de genótipos. Até o momento, porém, os dados de riqueza de cultiváveis e de abundância de não-cultiváveis não permitem inferir à respeito de outra importante variável a considerar neste contexto que é a composição de espécies micro-orgânicas presentes nos indivíduos de genótipos distintos.

É possível especular, porém, que as divergências de abundância entre sementes (e entre árvores) possa também ter refletido alguma aleatoriedade de dinâmica microbiana nos tecidos, eventualmente ocorrida após a retirada dos frutos de seus respectivos pés de cacau, o que alteraria os resultados de amplificação (incremento da variância experimental). Contudo, os procedimentos experimentais visaram minimizar esse potencial efeito, assumindo que o ambiente dentro do fruto extraído e adequadamente preservado deve ser mantido estável; além disso, se há uma mudança aleatória na dinâmica de micro-organismos na comunidade, esse componente de variação afeta todos indistintamente. Certamente, um número maior de sementes por fruto (amplificadas tanto individualmente, como com o DNA dessas sementes por fruto sendo agrupados antes da amplificação) pode auxiliar a resolver essa questão.

É importante ressaltar que essa potencial variação aleatória causada pelo tempo entre coleta dos frutos e extração de DNA das sementes provavelmente teria um efeito muito menor na riqueza de micro-organismos presentes no momento da coleta. Isso seria dessa forma, visto que é mais plausível esperar aumento/diminuição relativa do número de indivíduos (abundância) das espécies presentes (pela maior ou menor multiplicação bacteriana) do que mudança na composição de espécies presentes, que afetaria a variável riqueza. E mesmo assim, observou-se grande variação entre indivíduos (árvores) quanto ao parâmetro riqueza de endofíticos cultiváveis (**Tabelas 4 e 5**), o que sugere que as variações de abundância individual observadas aqui (**Figura 15**) foram causadas pelas diferenças individuais existentes antes da coleta dos frutos.

Com o objetivo de avaliar um possível efeito de genótipo de cacaueteiro na variável abundância bacteriana endofítica, análises estatísticas foram realizadas considerando quatro repetições para cada genótipo. Cada repetição foi composta pela média dos dados obtidos das triplicatas de amplificação por semente; os dados então passaram pelo teste de ajuste à normalidade de distribuição (*Kolmogorov-Smirnov*) e por transformação logarítmica, devido à magnitude dos valores (escala de 10^7) de número de cópias de 16s rDNA. Estes dados transformados foram submetidos à ANOVA ($p < 0,05$) e os resultados da análise evidenciaram que as diferenças entre genótipos de cacaueteiro para o número de cópias do gene 16s rDNA de *Bacteria* presentes em sementes não foram estatisticamente significativas ($p = 0,394$). Os valores médios (transformados) para os quatro genótipos foram de mesma ordem de magnitude, variando entre 8,04 (CCN51) e 8,68 (VB1151).

A análise de variância considerando os dados de número de cópias de 16s rDNA agrupados por genótipo (médias de quatro repetições) não detectou diferenças significativas entre eles, sugerindo não haver efeito do genótipo da planta na definição da comunidade bacteriana endofítica associada a sementes; esses dados corroboram os resultados da ANOVA para riqueza de cultiváveis (**Tabela 3**) e sugerem, portanto, que também não é possível usar a variável 'abundância total de endofíticos bacterianos não-cultiváveis' para se avaliar a interferência de genótipo nessa comunidade.

Por outro lado, deve-se atentar para o fato de que, pelos resultados mostrados na **Figura 15**, parece estar havendo um claro efeito do fator 'repetição' (média de 3 triplicatas por semente), o que interfere de maneira relevante no resíduo do experimento e pode, portanto, afetar a confiabilidade dos resultados da análise de variância.

Dada essa grande variação individual observada entre as repetições, obteve-se um coeficiente de variação geral para o experimento (CV) muito elevado (= 85%); assim, torna-se necessário aumentar em muito o número de repetições para se obter uma maior segurança a respeito da existência ou não de um potencial efeito de genótipo na definição da comunidade microbiana associada.

4.4.2. Riqueza e composição de comunidades bacterianas não-cultiváveis em sementes de diferentes genótipos de cacau

Com os dados obtidos até o momento, observou-se claramente que variáveis como 'riqueza de cultiváveis' e 'abundância total' de micro-organismos sofrem uma grande influência de características individuais (árvores e, ou sementes), de modo que não somente há um mascaramento de potenciais efeitos de genótipos (clones), como também revela grande interferência do entorno ambiental na porção microbiana da planta holobionte.

Para se verificar a possibilidade de outras variáveis de diversidade ecológica servirem como instrumental analítico-comparativo entre genótipos foi necessário estabelecer um método que permitisse computar, com suficiente alcance e precisão, o número e tipos de espécies bacterianas associadas a sementes, de modo a se inferir as distintas 'riquezas' e 'composições' dessas comunidades. A partir do DNA total extraído das sementes dos experimentos anteriores (incluindo endofíticos da porção interna e externa ao tegumento), quatro bibliotecas de 16s rDNA do domínio *Bacteria* foram construídas, uma para cada genótipo. Estas, posteriormente, permitiram acesso, por sequenciamento e comparação com banco de dados, à diversidade de *Bacteria* presente em sementes dos diferentes genótipos de cacauzeiros. Um total de 768 clones de 16s rDNA foram obtidos e sequenciados pelo método de Sanger, em sequenciador ABI 3500 (ver Métodos); destes clones, 192 pertenceram a cada biblioteca/genótipo. Todas as sequências analisadas pertenceram ao domínio *Bacteria*. Quanto à qualidade geral do sequenciamento obtido, o total de clones bacterianos cujas sequências foram válidas foi de 728, perfazendo 94,8% do total das quatro bibliotecas. Em cada biblioteca, o número de clones válidos ficou assim distribuído: 181 para CCN51, 186 tanto para PH16 quanto para PS1319, e 175 para VB1151, sendo que uma análise de qui-quadrado revelou não ter havido significativa discrepância entre o número de clones válidos entre os genótipos. Com estes resultados, a partir da análise comparativa das sequências com outras no banco de dados (*GenBank*), foi possível comparar os genótipos quanto às suas composições específicas de micro-organismos.

A análise comparativa a partir dos dados de sequenciamento buscou partir de um número semelhante de sequências para cada genótipo, de tal forma que a

base de comparação não tivesse uma distorção quantitativa de grande monta; ou seja, buscou-se “normalizar” os resultados de comparação diretamente a partir de uma matriz de mesma magnitude para sequências disponíveis para as análises, de modo que as diferenças qualitativas nas comunidades bacterianas não-cultiváveis (ver a seguir **Figura 16, Tabela 8**) pudessem ser visualizadas e caracterizadas.

Esse procedimento justificou-se, à medida que não houve diferença significativa entre genótipos quanto às abundâncias totais de amplicons de 16s rDNA, ou seja, que os genótipos eram quantitativamente semelhantes em relação às respectivas porções microbianas de suas sementes.

Reconhece-se, porém, as limitações dessa estratégia no sentido de permitir conhecer a real proporcionalidade entre o DNA total da planta e o bacteriano para se inferir com maior precisão o número de células microbianas associadas. Não se sabe qual o percentual de diversidade total existente em cada semente que foi efetivamente acessado (tanto para riqueza quanto para abundância relativa das espécies), pois não se quantificou o DNA total extraído por g de tecido macerado (só foi verificada a concentração do DNA ressuspendido). Isto teria permitido normalizar o rendimento de extração entre as amostras, com impactos evidentes nas decisões sobre quantidades/volumes de DNA para a amplificação subsequente.

Além disso, não se sabe a quantidade total de células das sementes de cacau, nem a quantidade total esperada de células bacterianas associadas, para que se pudesse estimar uma proporção mais realista entre os DNAs totais dessas duas frações do hologenoma. Supõe-se que, à luz da enorme capacidade de sequenciamento/anotação possível com as técnicas atuais, seja viável a confecção de uma biblioteca “hologenômica” (células de sementes + micro-organismos associados), com um número de clones várias vezes superior ao esperado para uma cobertura total do hologenoma. Somente dessa forma, a proporção entre DNA de células da planta e dos micro-organismos poderia ser estimada com maior precisão.

Um extensivo processamento de bioinformática foi realizado com a totalidade das sequências válidas obtidas, com três objetivos específicos: (i) o de remover redundâncias, ou seja, sequências idênticas entre clones da biblioteca

(referente a um genótipo); (ii) o de identificar espécies a partir dos resultados do *BlastN*; e (iii) o de identificar isolados de uma mesma espécie, tanto por computar nº de acessos diferentes (de mesma espécie) no *GenBank*, quanto por identificar *gaps* e *mismatches* específicos recorrentes entre sequências da biblioteca, mas que alinharam com um mesmo acesso. Além disso, diversas análises taxonômicas e outras envolvendo *scripts* específicos de bioinformática foram realizadas com a colaboração do Dr. Luciano A. de Souza Bernardes (DCET/UESC). A série de tabelas e gráficos gerados com todo esse processamento de bioinformática para os dados não foi incluída nesta dissertação.

A partir de sequências não redundantes obtidas pelo seqüenciamento (o percentual de redundância foi considerado baixo – dados não mostrados), foi feita a comparação das mesmas com as depositadas no *GenBank*, permitindo a determinação das espécies microbianas com sequências mais próximas às encontradas nesta pesquisa, em termos de % de identidade de nucleotídeos, % de cobertura da seqüência ‘*query*’ usada no *BlastN*, tamanho das sequências e escores mais altos de alinhamento. Conforme dito acima, o número de acesso do organismo no banco de dados foi utilizado para diferenciar sequências distintas, depositadas como pertencentes à mesma espécie, mas de diferentes cepas.

Quando diferenças recorrentes de *gaps* e *mismatches* específicos ocorreram entre nossas sequências que alinharam com mesmo número de acesso (dados não mostrados), supôs-se estar diante de possíveis variantes (isolados ou cepas) de mesma espécie, de modo que extensões (letras) foram adicionadas ao nº de acesso correspondente para individualizar o isolado. Nestes casos, entendeu-se que isolados (e, ou novas espécies) poderiam estar ocorrendo. Com base nessa realidade, entendeu-se que o micro-organismo referente a uma dada seqüência de nossas bibliotecas seria melhor concebido neste trabalho como sendo uma ‘unidade taxonômica operacional’ (UTO) distinta. Assim, curvas de rarefação foram então construídas para estimar a riqueza destas UTOs, nas quatro comunidades bacterianas (bibliotecas) referentes aos genótipos de cacauero sob estudo (**Figura 16**).

Ao contrário do que ocorreu com a riqueza de micro-organismos cultiváveis (ver item 4.3), neste caso de micro-organismos ‘não-cultiváveis’ identificados de

sementes, foi possível verificar significativamente uma maior riqueza para a comunidade de *Bacteria* presente no genótipo CCN51, seguida pela riqueza em PH16; estas duas bibliotecas apresentaram maior número de UTOs sequenciados (dados não mostrados). As comunidades presentes nos genótipos PS1319 e VB1151 não diferiram entre si quanto à riqueza e apresentaram menor número de UTOs observados. (**Figura 16**). A inclinação da curva de rarefação e os intervalos de confiança apresentados foram baseados em um nível de significância de 5%.

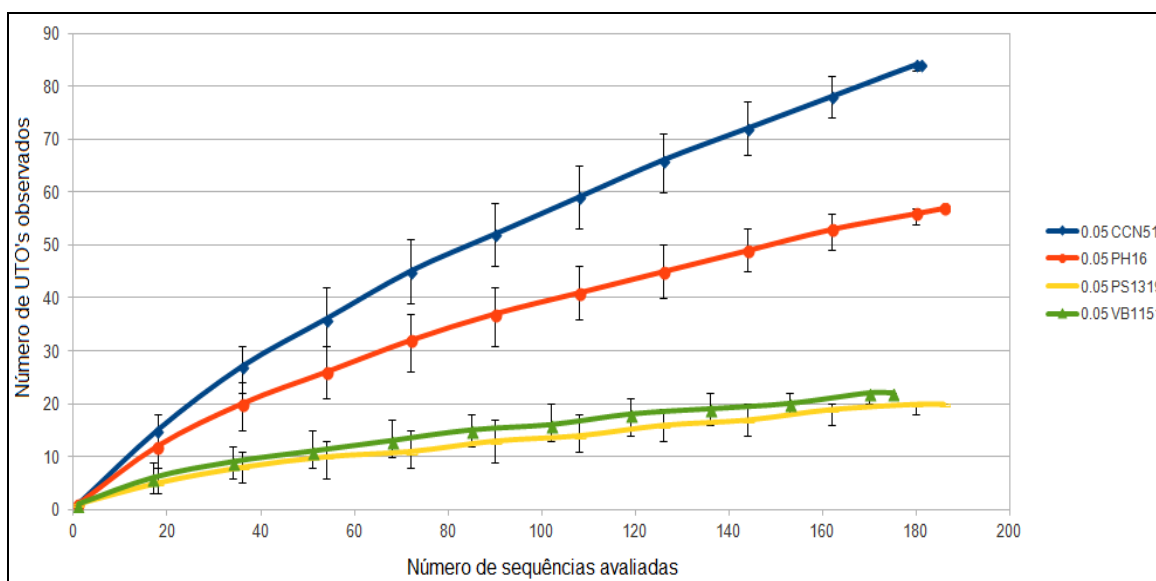


Figura 16: Curva de rarefação para riqueza de quatro comunidades de espécies bacterianas, obtidas pelo cômputo de sequências do gene 16s rDNA e comparação com banco de dados (*GenBank*). Dados referem-se ao DNA extraído de amostras de sementes de cacauzeiros dos quatro genótipos indicados. Significância estatística avaliada a 5% de probabilidade; intervalos de confiança não sobrepostos indicam diferença estatística entre as riquezas.

O uso de técnicas moleculares, que permitem acessar uma maior representatividade da diversidade microbiana de um dado ambiente, permitiu a identificação de um efeito significativo do fator 'genótipo' na definição da diversidade microbiana endofítica em sementes.

Entende-se que, pelos procedimentos adotados, que as variações individuais identificadas (**Figura 16**), supostamente determinadas pelo ambiente de entorno da planta, foram compensadas por genótipos, por se ter agrupado essas repetições (sementes) antes da qPCR e construção das bibliotecas; isto sugere que houve controle suficiente do fator ambiente na variação total, de modo que se pode considerar as diferenças de riqueza encontradas como realmente associadas a genótipos.

Os resultados de diferenças significativas de riqueza entre alguns genótipos, mas não entre outros, sugere um efeito aparentemente genótipo-dependente para essa variável.

Estes resultados em conjunto sugerem mais um nível de interação para a porção microbiana endofítica, como seria de esperar de acordo com a teoria hologenômica da evolução; esta interação parece se dar em nível genético, como consequência de características moleculares, bioquímicas e fisiológicas específicas de cada genótipo da planta.

Devido à grande variância experimental observada no experimento de qPCR (**Figura 15**), o fato disso interferir diretamente na matéria-prima para a construção das bibliotecas, e mesmo tendo-se tomado cuidado para compensar a variação ambiental (ver acima), não se pode descartar, porém, a hipótese de que o emprego de um número maior de repetições (sementes) pode alterar esses resultados. Assim, cautela deve ser tomada em relação às conclusões.

Buscando uma abordagem preliminar da variável ‘composição’ na comparação entre as comunidades expressas por cada biblioteca, procedeu-se uma categorização das espécies encontradas pelo *BlastN*, identificando co-ocorrências de espécies entre genótipos, bem como ocorrências exclusivas em cada genótipo. Considerando os clones das quatro bibliotecas em conjunto foram observados 91 espécies (nesta análise não se computou isolados e UTOs – somente espécies diferentes e números de sequências não-redundantes em cada uma). Os resultados de composição (**Tabela 8**) claramente demonstraram uma grande diversidade de interações entre as comunidades bacterianas presentes nas sementes entre os genótipos de cacaueteiro, com base nas semelhanças e diferenças taxonômicas. Foram identificadas diferentes espécies bacterianas associadas exclusivamente a um único genótipo, enquanto outras são compartilhadas pelos quatro genótipos, ou somente entre alguns genótipos (**Tabela 8**).

A ocorrência de espécies bacterianas compartilhadas se deu em quase todas as combinações de genótipos possíveis. Das espécies encontradas nas bibliotecas, 2,19% ocorreram em todos os genótipos, 5,49 % ocorreram nas combinações de três genótipos, 27,47% ocorreram nas combinações de dois genótipos. Interessante observar que a maioria das espécies das bibliotecas –

64,83% – foram espécies genótipo-exclusivas. Este alto nível de exclusividade aparentemente associou-se com as maiores riquezas observadas na curva de rarefação (**Figura 16**). O genótipo CCN51 foi o que teve o maior percentual de ocorrência de espécies exclusivas (51,8% das identificadas neste genótipo), seguido pelo PH16 (48,7%); o PS1319 foi o genótipo que apresentou o menor número de espécies bacterianas, com menor percentual de exclusividade (20%) (**Tabela 8**).

Uma análise das espécies co-ocorrentes e exclusivas entre genótipos mostrou uma tendência a uma maior abundância (maior número de sequências identificadas por espécie) para aquelas espécies co-ocorrentes; estes dados implicam em que, na maior parte dos casos, houve mais sequências de uma espécie (valores entre parêntesis na **Tabela 8**) do que o número de genótipos em que co-ocorreram. Para exemplificar a observação dessa maior abundância, uma espécie foi considerada mais abundante quando houve mais de 2 sequências para ela nas co-ocorrências duplas (2 genótipos), mais de 3 nas co-ocorrências triplas (3 genótipos) e mais que quatro na co-ocorrência em todos os genótipos testados. Foi também observado (como se poderia esperar), que a maioria das sequências 16s rDNA correspondentes a essas espécies exclusivas ocorreu em apenas um clone da biblioteca (**Tabela 8**).

Interessante notar que as sequências que corresponderam à espécie *Microcystis aeruginosa* apareceram 411 vezes nas análises das bibliotecas, sendo a espécie com maior abundância, e ocorrendo em todas as bibliotecas (genótipos). Além desta, as espécies *Bacillus stratosphericus* (20 sequências), *Enterobacter cancerogenus* (13 sequências) e *Sneathiella chinensis* (7 sequências) mostraram-se mais abundantes e co-ocorrentes entre genótipos, aparecendo em 3 dos 4 clones de cacauero. Nas combinações de dois genótipos, o CCN51 e o PH16 (genótipos com riquezas significativamente maiores que os demais – **Figura 16**), foram os que também apresentaram maior ocorrência de espécies em comum, com a maioria delas com maior abundância (**Tabela 8**).

Tabela 8: Co-ocorrência de espécies bacterianas em amostras de sementes de cacauero, por genótipo(s), com base nos resultados do *BlastN* para sequências de 16s rDNA.

Genótipos	Nº spp.	Nº seqs.	Espécies (Nº de ocorrências)
CCN, PH16, PS1319, VB1151	2	417	<i>Alcaligenes faecalis</i> (6); <i>Microcystis aeruginosa</i> (411)
CCN51, PH16, PS1319	2	23	<i>Bacillus stratosphericus</i> (20); <i>Bartonella henselae</i> (3)
CCN51, PH16, VB1151	1	13	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (13)
CCN51, PS1319, VB1151	2	10	<i>Pectobacterium wasabiae</i> (3); <i>Sneathiella chinensis</i> (7)
CCN51, PH16	10	99	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (7); <i>B. clausii</i> (3); <i>B. weihenstephanensis</i> (2); <i>Koribacter versatilis</i> [Candidatus] (40); <i>Solibacter usitatus</i> [Candidatus] (21); <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (4); <i>Pelobacter propionicus</i> (2); <i>Pseudolabrys taiwanensis</i> (14); <i>Rhodoplanes serenus</i> (3); <i>Stella vacuolata</i> (3)
CCN51, PS1319	2	4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (2); <i>Pantoea ananatis</i> (2).
CCN51, VB1151	7	50	<i>Buttiauxella izardii</i> (6); <i>Chondromyces apiculatus</i> (2); <i>Enterobacter cloacae</i> (2); <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (7); <i>Pseudomonas cichorii</i> (4); <i>P. putida</i> F1 (8); <i>P. putida</i> KT2440 (21)
PH16, PS1319	3	6	<i>B. pumilus</i> (2); <i>Lysinibacillus sphaericus</i> (2); <i>Paenibacillus tundra</i> (2)
PH16, VB1151	2	4	<i>B. anthracis</i> (2); <i>Prosthecomicrobium consociatum</i> (2)
PS1319, VB1151	1	2	<i>Planococcus maitriensis</i> (2)
CCN51	28	50	<i>Advenella kashmirensis</i> (1); <i>Alkanibacter difficilis</i> (1); <i>B. atrophaeus</i> (1); <i>B. drementensis</i> (1); <i>B. safensis</i> (1); <i>Bordetella holmesii</i> (1); <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> (1); <i>Desulfonauticus autotrophicus</i> (1); <i>Devosia geojensis</i> (1); <i>Edaphobacter aggregans</i> (2); <i>Flavisolibacter ginsengiterrae</i> (1); <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> (3); <i>Iamia majanohamensis</i> (1); <i>Legionella feeleeii</i> (1); <i>Legionella maceachernii</i> (1); <i>Leptothrix discophora</i> (1); <i>Novosphingobium naphthalenivorans</i> (2); <i>Oceanibaculum indicum</i> (2); <i>Oligotropha carboxidovorans</i> (1); <i>P. plecoglossicida</i> (1); <i>P. trivialis</i> (1); <i>Serratia grimesii</i> (1); <i>Serratia proteamaculans</i> (1); <i>Shigella sonnei</i> (5); <i>Shinella zoogloeoides</i> (1); <i>Tatumella ptyseos</i> (3); <i>Thiofaba tepidiphila</i> (2); <i>Weissella ghanensis</i> (11)
PH16	19	36	<i>Chitinophaga terrae</i> (11); <i>Dechloromonas denitrificans</i> (1); <i>Frankia alni</i> (1); <i>Geobacter bemidjiensis</i> (2); <i>G. uraniireducens</i> (1); <i>Haloferula sargassicola</i> (1); <i>Insolitospirillum peregrinum</i> (1); <i>Legionella birminghamensis</i> (1); <i>Leminorella grimontii</i> (1); <i>Methylacidiphilum infernorum</i> (1); <i>Obesumbacterium proteus</i> (1); <i>Pectobacterium carotovorum</i> (3); <i>Propionibacterium acnes</i> (2); <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (1); <i>Rhodomicrobium vanniellii</i> (2); <i>Serratia plymuthica</i> (2); <i>Sphingobacterium siyangense</i> (2); <i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> (1); <i>Verrucomicrobium spinosum</i> (1).
PS1319	3	5	<i>B. flexus</i> (1); <i>Burkholderia unamae</i> (2); <i>D. hortensis</i> (2);
VB1151	9	9	<i>Allofustis seminis</i> (1); <i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (1); <i>Hydrocarboniphaga effusa</i> (1); <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1); <i>Kluyvera ascorbata</i> (1); <i>Ochrobactrum anthropi</i> (1); <i>Serratia ficaria</i> (1); <i>Solibacillus silvestris</i> (1); <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> (1)
Total	91	728	

Os resultados de composição/abundância relativa de espécies microbianas identificadas pelo sequenciamento do 16s rDNA sugerem fortemente a existência de uma correlação entre esta(s) variável(is) e o genótipo da planta.

As maiores riquezas de não-cultiváveis observadas para os genótipos CCN51 e PH16 (**Figura 16**) parecem se correlacionar diretamente com a maior exclusividade de ocorrência de suas espécies bacterianas identificadas.

Em estudo recente, Bodenhausen et al. (2013) avaliaram as comunidades bacterianas associadas a folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana*, e compararam as comunidades exofíticas e endofíticas através de métodos independentes de cultivo. Os autores encontraram uma riqueza de comunidades exofíticas mais elevada em comparação às comunidades endofíticas nas amostras de raízes ($P = 0,024$), ao passo que o inverso é verdadeiro para as comunidades bacterianas de folhas ($P = 0,032$).

Os resultados destes autores tal como os resultados do presente trabalho, podem indicar uma dinâmica diferente entre as comunidades de micro-organismos presentes em diferentes tecidos da planta. Os micro-organismos cultiváveis deste trabalho indicaram maior riqueza microbiana na porção exofítica em relação à endofítica de sementes com polpa (**Tabela 3**).

Curiosamente, os resultados daqueles autores indicaram que bactérias endofíticas de folhas e raízes não diferem em riqueza, diversidade e equitabilidade, contudo, eles diferem na composição da comunidade ($P = 0,001$). Isto pode indicar uma exclusividade de micro-organismos para diferentes tecidos.

Nesse sentido, os resultados obtidos com a presente pesquisa sugerem que composição é um parâmetro que possibilita diferenciar com maior eficácia as comunidades de bactérias presentes em um mesmo tecido vegetal de diferentes genótipos de cacauzeiros. Novos estudos podem ser realizados para verificar se esta tendência é mantida para diferentes tecidos do cacauzeiro, tal como ocorre para a espécie *Arabidopsis thaliana*.

O fato de se ter observado uma clara tendência de uma maior abundância de espécies de micro-organismos para aquelas que são co-ocorrentes, sugere que seriam elas mais adaptadas ao ambiente de sementes entre genótipos; à luz da teoria hologenômica, poderiam representar aquelas há mais tempo em interação com a espécie *Theobroma cacao*, representando uma porção

microbiana mais estável do hologenoma do cacau (do ponto de vista evolutivo, em escala de tempo microbiana).

Sugere-se que estudos funcionais mais aprofundados para essas espécies bacterianas de maior co-ocorrência entre genótipos pode revelar funções bioquímicas ou fisiológicas fundamentais para o funcionamento das plantas da espécie, confirmando a visão da mesma como holobionte.

É muito importante salientar que há uma limitação clara quanto à definição das espécies microbianas com base em alinhamento de sequências novas com as já depositadas/annotadas de banco de dados. É possível que várias sequências obtidas neste estudo, e que alinharam com enorme identidade com outras encontradas no *GenBank* (**Tabela 8**), possam estar representando, na realidade, outras espécies bacterianas ainda não descritas. Uma evidência nesse sentido foi a existência (ou ausência) de pequenas sequências de nucleotídeos, dentro da sequência total alinhada, que não alinharam com nenhuma seqüência depositada, gerando *gaps* recorrentes de alinhamento com todas as sequências retornadas pelo *BlastN* (dados não mostrados).

Ainda nesse sentido, outro aspecto a considerar é o fato de que identidades entre sequências somente para a região 16s rDNA não permite revelar possíveis variações genéticas em todos os outros genes do genoma bacteriano, as quais, tomadas em conjunto, podem levar a caracterização de novas espécies.

5. CONCLUSÕES

- Há um efeito de árvore (indivíduo) na riqueza de bactérias e fungos exo/endofíticos de frutos do holobionte cacauero;
- Há um fenômeno de competição endofítica entre membros dos dois grandes domínios taxonômicos (fungos e bactérias);
- O parâmetro ecológico abundância não é eficiente na detecção de diferenças entre comunidades de bactérias endofíticas em sementes do holobionte cacauero, considerando a comunidade de não-cultiváveis;
- Há um significativo efeito genótipo-dependente para a variável riqueza da comunidade bacteriana endofítica dos frutos do cacauero;
- O parâmetro composição foi mais eficaz em detectar as diferenças entre as comunidades de bactérias endofíticas entre os quatro genótipos clonais de cacaueros estudados (CCN51, PH16, PS1319, VB1151), revelando uma composição genótipo-específica.

6. REFERÊNCIAS

ABELHO, M. **Métodos básicos em microbiologia**. Modificado de: GALHANO, C., DUARTE, I. & ABELHO, M. *Trabalhos práticos de Biologia – módulo Microbiologia*, 2007/2008. ESAC, Coimbra. 2007. 2009.

ABELOVSKA, L.; BUJDOS, M.; KUBOVA J.; PETREZSELYOVA, S.; NOSEK, J.; TOMASKA, L. **Comparison of element levels in minimal and complex yeast media**. *Can J Microbiol.* v. 53, n. 4. p. 533 – 555. 2007.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SHLEIFER, K. H. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation**. *Microbiological Reviews.* v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants**. *Brazilian Journal of Microbiology.* v. 40, p. 417 – 432. 2009.

ARAUJO, M.; ROCHA, R.; ALGER, K.; MESQUITA, C. A. B. **A mata Atlântica do sul da Bahia: situação atual, ações e perspectivas**. *Conselho da reserva da biosfera da Mata Atlântica.* n. 8. São Paulo. 1998.

AMANN, R.; LUDWIG, W. **Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology**. *FEMS Microbiol Rev.* v. 24, n. 5, p. 555-65. 2000.

ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J-M.; GUILTINAN, M. J.; DROC, G.; GOUZY, J.; ALLEGRE, M.; CHAPARRO, C.; LEGAVRE, T.; MAXIMOVA, S. **The genome of *Theobroma cacao***. *Nature Genetics*, v. 43, p. 101-108. 2011.

ARNOLD, A. E. ; MEJI´A, L. C. ; KYLLO, D. ; ROJAS, E. I. ; MAYNARD, Z. ; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. **Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree**. *PNAS.* v. 100, n. 26. 2003.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos Endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna-SP: EMBRAPA. p.117-137. 1998.

BODENHAUSEN, N.; HORTON, M. W.; BERGELSON, J. **Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana***. PLOS ONE . v. 8, n. 2. 2013.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v.41, p.252-263, 2001.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENault, C. GERMON, J. C. **16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils**. FEMS Microbiology Ecology. v. 34, p. 121-128, 2000.

CLEGG, C. **Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to anaged grasslands on the microbial community composition of soils**. Application Soil Ecology. v. 31, p. 73-82, 2006.

DANTAS, L. G.; GUERRA, M. **Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum.** Genet. Mol. Biol. v.33, n.1, p. 94-98, 2010.

DE NOVAIS, C. B. Disponível em:

http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma_metodos_transform_celulas.html. Acesso em: 25 de agosto de 2009.

DOS SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M. A. **Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212. 2011.

DUARTE; T. S.; BARBOSA, L. P. J. De L.; BARBOSA, F. H. F. **Avaliação microbiológica para detecção de *Staphylococcus aureus* em quatro marcas**

de queijo tipo mussarela comercializadas no município de Luz, Minas Gerais. *Ciência Equatorial*. v. 1, n. 1. – 2011.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. **Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities.** *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, p. 4630-4636, 1999.

GARCIA-ARMISEN, T.; PAPALEXANDRATOU, Z.; HENDRYCKX, H.; CAMU, N.; VRANCKEN, G.; DE VUYST, L.; CORNELIS, P. **Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16S rRNA gene clone library.** *Appl Microbiol. Biotechnol* v. 87, p. 2281–2292. 2010.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. **Bacterial endophytes in agricultural crops.** *Canadian Journal of Microbiology*. v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HANADA, R.E., POMELLA, A.W.V., SOBERANIS, W., LOGUERCIO, L.L., PEREIRA, J.O. **Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* (ALF 247) against Black-Pod Disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao.** *Biol Control* v. 50, p. 143-149. 2009.

HUEY, B.; HALL, J. **Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13.** *J Bacteriol*. v. 171, n. 5, p. 2528-2532. 1989.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. **Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution.** *Ethnography and Ecology*, v. 6, n. 6, 2011a.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. **Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management.** *Comprehensive Biotechnology*, 2. ed, v. 4, p. 713-727, 2011b.

KENNEDY, A. C. **Bacterial diversity in agroecosystems.** Agriculture, Ecosystems and Environment, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KENNEDY, A.; DORAN, J. **Sustainable agriculture: role of microorganisms.** In: BITTON, G. (Org.) Encyclopedia of Environmental Microbiology. New York: John Wiley & Sons, p. 3116-3126, 2002.

KIRKA, J. L.; BEAUDETTEA, L. A.; HARTB, M.; MOUTOGLISC, P.; KLIRONOMOSB, J. N.; LEEA, H.; TREVORSA, J. T. **Methods of studying soil microbial diversity.** Journal of Microbiological Methods. v. 58, p. 169– 188. 2004.

KUSHMARO, A.; LOYA, Y.; FINE, M.; ROSENBERG, E. **Bacterial infection and coral bleaching.** Nature. p. 380: 396. 1996.

KUSHMARO, A.; ROSENBERG, E.; FINE, M.; BEN-HAIM, Y.; LOYA, Y. **Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio shiloi* AK-1.** Mar Ecol Prog Ser. v. 171, p. 131–37. 1998.

KUSHMARO, A.; ROSENBERG, E.; FINE, M.; LOYA, Y. **Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1.** Mar Ecol Prog Ser. v. 147, p. 159–65. 1997.

LEIGH, M. B.; TAYLOR, L.; NEUFELDCLONE, J. D. **Libraries of Ribosomal RNA Gene Sequences for Characterization of Bacterial and Fungal Communities.** Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Editora Springer. p. 3969 – 3993. 2010.

LIMA, L. J. R.; KAMPHUIS, H. J.; NOUT, M. J. R.; ZWIETERING, M. H. **Microbiota Dynamics and Diversity at Different Stages of Industrial Processing of Cocoa Beans into Cocoa Powder.** Applied and Environmental Microbiology. v. 78, n. 08, p. 2904 –2913. 2012.

LYNCH, J. M.; BENEDETTI, A.; INSAM, H.; NUTI, M. P.; SMALLA, K.; TORSVIK, V.; NANNIPIERI, P. **Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms.** Biol Fertil Soils. v. 40, p. 363–385. 2004.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L.; DE BRUIJN, F. J. **The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis.** Anual Review of Phytopathology. v. 37, p. 81-125, 1999.

LOVELOCK, Christopher H. **Principles of Service Marketing and Management.** Upper Saddle River New Jersey: Prentice Hall, v. 43, p. 295-304, 1998.

MACDONALD, C. A.; ANG, R.; CORDINER, S. J.; HORSWELL, J. **Discrimination of Soils at Regional and Local Levels Using Bacterial and Fungal T-RFLP Profiling.** J Forensic Sci, v. 56, n. 1, p. 61 - 69. 2011.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity.** Oxford: Blackwell Publishing, 256p. 2004.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Thebroma cacao* L.).** 128f. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

MARGULIS, L. **Symbiosis in Cell Evolution: Microbial Communities in the Archean and Proterozoic Eons.** 2^a ed. W.H. Freeman and Co., New York. 1993.

MARSH, T.L. **Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products.** Curr. Opin. Microbiol. v. 2, p. 323-327. 1999.

MARTINS, F. R.; SANTOS, F. A. M. **Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade.** Revista Holos, v. 1, p. 236-267, 1999.

MELO, A. S. **O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade?** Biota Neotrop. Campinas, v. 8, n. 3. 2008 .

MENDES, L. W.; TAKETANI, R. G.; NAVARRETE, A. A.; TSAI, S. M. **Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil.** Research in Microbiology. v. 163, p. 366 – 377. 2012.

MONARD, C.; VANDENKOORNHUYSE, P.; LE BOT, B.; BINET, F. **Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study.** The ISME Journal, v. 5, p. 1048–1056, 2011.

MOTAMAYOR, J. C.; LACHENAUD, P.; MOTA, J. W. Da S.; LOOR, R.; KUHN, D. N.; BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J. **Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L).** PLoS ONE. v. 3, n. 10, p. 1 - 8. 2008.

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

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. **Filtrates of endophytic bacterium cultures on motility, mortality and hatching of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*.** Fitopatologia Brasileira. v. 29, n. 4. p. 384 - 388. 2004.

NOSS, R. **Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach.** Conservation Biology. v. 4, p. 355–364, 1990.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. **An ecological perspective of microbial secondary metabolism.** Curr. Op. Biotechnol, v. 22, p. 552-558. 2011.

PARK, S. H.; KWON, K. K.; LEE, D.; LEE, H. K. **Morphological Diversity of Marine Microorganisms on Different Isolation Media.** The Journal of Microbiology, v. 40, n. 2, p.161-165. 2002.

PAIXÃO, D. A. A.; DIMITROV, M. R.; PEREIRA, R. M.; ACCORSINI, F. R.; VIDOTTI, M. B.; LEMOS, E. G. De M. **Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation.** R. Bras. Ci. Solo. v.34. p. 773-781.2010.

PIRES, J. L.; ROSA, E. S.; MACÊDO, M. M. **Avaliação de clones de cacauero na Bahia, Brasil.** Revista Agrotrópica. v. 24, n. 2, p.79 - 84. 2012.

POULSEN, M.; ERHARDT, D. P.; MOLINARO, D. J.; LIN, T. CURRIE, C. R. **Antagonistic Bacterial Interactions Help Shape Host-Symbiont Dynamics within the Fungus-Growing Ant-Microbe Mutualism .** PLoS ONE, n. 9. 2007.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J.; M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREEN, L. E.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. W. **Essay - The role of ecological theory in microbial ecology.** Nat. Rev. Microbiol. v. 5, n. 5, p. 384-392. 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. **Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques.** Research in Microbiology. v. 151, n. 3, p. 167–177, 2000b.

RANJARD, L.; BROTHIER, E.; NAZARET, S. **Sequencing bands of RISA fingerprints for the characterization and the microscale distribution of soil bacterial populations responding to mercury spiking.** Appl Environ Microbiol.v. 66, p. 5334–5339. (2000a).

RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. **The uncultured microbial majority.** Annu. Rev. Microbiol, p. 57:369-394, 2003.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª ed., 2003.

ROSENBERG, E.; KOREN, O.; RESHEF, L.; EFRONY, R.; ROSENBERG, I. Z. **The role of microorganisms in coral health, disease and evolution.** Nature Reviews Microbiology. p.1-8. 2007.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. **Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium**, Ft Lauderdale, Florida. Session number 9 From bacterial bleaching to the hologenome theory of evolution. 2008.

ROSENBERG, E.; SHARON, G. ZILBER-ROSENBERG, Z. **The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework.** Environmental Microbiology. v. 11, n. 12,p. 2959–2962. 2009.

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

SAITO, IKEDA, S.; EZURA, H.; MINAMISAWA, K. **Paper Microbial Community Analysis of the Phytosphere Using Culture-Independent Methodologies.** Journal: Microbes and Environments - MICROBES ENVIRONMENTS , v. 22, n. 2, p. 93-105. 2007.

SANTOS, A. K. R. **Comparação entre os meios de cultura baird-parker, bairdparker – rpf e petrifilmtm staph express na detecção de staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária (Mestrado em Ciência Animal). 53p. 2008.

SCHULZ, B; BOYLE, C. **The endophytic continuum.** Mycol. Res. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.

SETENTA, W.; LOBÃO, D. E. **Conservação Produtiva: cacau por mais 250 anos por Wallace Setenta e Dan Érico Lobão.** p. 1 – 190. CEPLAC - Itabuna. BA. 2012.

SHI, Z.; MAXIMOVA, S. N.; LIU, Y.; VERICA, J.; GUILTINAN, M. J. **Functional analysis of the *Theobroma cacao* NPR1 gene in Arabidopsis.** BMC Plant Biology. v. 10, p. 248- 265. 2010.

SILVA, C.R.S.; FIGUEIRA, A. V. O.; SOUZA, C.A.S. **Diversidade no gênero *Theobroma*.** In DIAS, L.A.S (Ed.) Melhoramento Genético do Cacaueiro. Cap. 2, p. 49-80. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001.

SILVA NETO, P. J.; De MATOS, P. G. G.; MARTINS, A. C. De S.; SILVA A. De P. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira.** p. 1 - 125 Belém, CEPLAC, 2001.

SMITH, D.; RYAN, M.J.; STACKEBRANDT, E. **The ex situ conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management.** In: Biotechnology [Eds. Horst W.Doelle, Edgar J.DaSilva], in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, 2008.

STACH, J. E. M.; MALDONADO, L. A.; MASSON, D. G.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. and BULL, A. T. **Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments.** Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 10, p. 6189-6200, 2003.

STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. **New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes.** Appl. Environ. Microbiol. v. 70, n. 8, p. 4748. 2004.

STOLZ, J.F.; CHANG, S.R.; KIRSCHVINK, J.L. **Biogenic magnetite in stromatolites. I. Occurrence in modern sedimentary environments.** Precambrian Res., v.43, p. 295-304 1989.

TAKAMUNE, L. F. T.; VIEIRA, D. C. M. **Comparação da metodologia para determinação da potência de amoxicilina: método de difusão em ágar e**

método de espalhamento. Seminário de Iniciação Científica da UNIFAL-MG – Edição 2012.

TIQUIA, S. M. **Microbial community dynamics in manure composts based on 16S and 18S rDNA T- RFLP profiles.** Environmental Technology. v. 26, p. 1101 – 1113. 2005.

TURNBULL, C.J.; HADLEY, P. **International Cocoa Germplasm Database (ICGD). [Online Database].** CRA Ltd./NYSE Liffe/University of Reading, UK. Disponível em: <http://www.icgd.reading.ac.uk> (Acesso em 25 de agosto de 2013).

TRÜPER, H. G. **Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance.** Biodiversity and Conservation, London, v. 1, n. 2, p. 227-236. 1992.

URSEL, M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J., SHYU, C.; WILLIAMS, C. J.; PIERSON, J. D.; FORNEY, L. J. **Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities.** Appl Microbiol Biotechnol. v. 80, p. 365–380, 2008.

WALKER, B. H. **Biodiversity and ecological redundancy.** Conservation Biology, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 18-23, 1992.

WATANABE, K. **Microorganisms relevant to bioremediation.** Current Opinion in Biotechnology. v. 12, p. 237–241. 2001.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. **Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados.** Rev. Virtual Quim. v. 3, n. 2, p. 78-87. 2011.

WHITTAKER, R. H. **Evolution and measurement of species diversity.** v. 21, p. 213-251. 1972.

WILSEY, B. J., CHALCRAFT, D. R., BOWLES, C. M. & WILLIG, M. R. **Relationships among indices suggest that richness is an incomplete surrogate for grassland biodiversity.** Ecology, v. 86, n. 5, p. 1178-1184. 2005.

ZAYATZ, L.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. **Development of wild and transformant strain of endophytic *Fusarium verticillioides* after colonization in *Zea mays* L.** Rev. Saúde e Biol., v.6, n.2, p. 27-34. 2011.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. **Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution .** FEMS Microbiol Rev. v. 32, p. 723–735. 2008.

ANEXO 1

Tabelas com os respectivos dados utilizados nas análises da dissertação, geradores da tabela 2 na seção de Resultados:

Tabela 1: Sumário dos isolados bacterianos exofíticos dos quatro genótipos do cacaueteiro *Theobroma cacao*

GENÓTIPO	ÁRVORE I	ÁRVORE II	ÁRVORE III	ÁRVORE IV	TOTAL
PH16	10	18	10	14	52
CCN51	10	10	20	12	52
VB1151	20	6	9	11	46
PS1319	21	9	7	5	42
TOTAL	61	43	46	42	192

Tabela 2: Sumário dos isolados fúngicos exofíticos dos quatro genótipos do cacaueteiro *Theobroma cacao*

GENÓTIPO	ÁRVORE I	ÁRVORE II	ÁRVORE III	ÁRVORE IV	TOTAL
PH16	14	14	29	13	70
CCN51	12	14	10	10	46
VB1151	86	9	15	22	132
PS1319	11	20	13	6	50
TOTAL	123	57	67	51	298

Tabela 3: Sumário dos isolados bacterianos endofíticos dos quatro genótipos do cacaueteiro *Theobroma cacao*

GENÓTIPO	ÁRVORE I	ÁRVORE II	ÁRVORE III	ÁRVORE IV	TOTAL
PH16	3	1	0	6	10
CCN51	27	1	33	7	68
VB1151	2	1	27	5	35
PS1319	0	4	7	3	14
TOTAL	32	7	67	21	127

Tabela 4: Sumário dos isolados fúngicos endofíticos dos quatro genótipos do cacaueteiro *Theobroma cacao*

GENÓTIPO	ÁRVORE I	ÁRVORE II	ÁRVORE III	ÁRVORE IV	TOTAL
PH16	8	8	10	1	27
CCN51	0	10	1	2	13
VB1151	7	3	2	2	14
PS1319	0	20	19	0	39
TOTAL	15	41	32	5	93