

ANÁLISE DE FUNGOS DO FILO GLOMEROMYCOTA NO SOLO DE CAFEIEIRO POR SEQUENCIAMENTO

Marcos Vinícius Pereira Barros²; Marliane de Cássia Soares Silva³; Tomás Gomes Reis Veloso⁴; Maria Catarina Megmuni Kasuya⁵; Aldemar Polonini Moreli⁶; Lucas Louzada Pereira⁷

1. Trabalho financiado pela Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo – Sicoob e CNPq.
2. Bolsista. Graduado em Agronomia. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. marcos.v.barros@outlook.com
3. Pós doutoranda Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mcassiabio@yahoo.com.br
4. Doutorando. Ms. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. tomasgomesrv@gmail.com
5. Professora Dra. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mkasuya@ufv.br
6. Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Administração, Venda Nova Do Imigrante. aldemar.moreli@ifes.edu.br
7. Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Administração, Venda Nova Do Imigrante. lucaslozada@hotmail.com

RESUMO: A presença de associações micorrízicas nas plantas é muito comum em condições naturais do solo. Apenas algumas plantas, como exemplo as *Brassicaceae*, não apresentam associação. A maioria das outras plantas, principalmente as de importância econômica, como espécies florestais, culturas anuais e perenes formam associações micorrízicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) presentes no solo de cafezais com cultivar de *Coffea Arabica L.* coletados em propriedades localizadas em diferentes altitudes e faces de exposição ao Sol pela técnica de sequenciamento de nova geração. Vinte e sete amostras compostas de solo de *C. arábica* foram coletadas de em 9 propriedades do Estado do Espírito Santo em diferentes altitudes e faces de exposição ao Sol. Três locais foram amostrados em lavouras de Catuai Vermelho em cada propriedade, cada local foi composto por 3 plantas e foram coletados solo em 5 pontos por planta. Estas foram transportadas no interior de sacos plástico sobre gelo até o laboratório. O DNA genômico das amostras compostas foi extraído utilizando o kit Nucleo Spin Soil, de acordo com as recomendações do fabricante. A região ITS1 do DNA foi amplificada por PCR e os produtos utilizados para montagem de biblioteca, os quais foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq 2x250pb. Todas as análises foram realizadas utilizando os softwares R e Qiime, após análises estatísticas observa-se que a riqueza e equitabilidade não diferenciaram entre si, não foi observada alteração significativa de riqueza, equitabilidade ou diversidade em função da altitude. Os FMAs foram encontrados em todas as altitudes e faces avaliadas mostrando sua importância para a cultura de *Coffea arábica*. A disponibilidade de P é um fator muito importante na diversidade de FMAs no solo, quando maior disponibilidade de P na solução do solo menor será a diversidade e a riqueza de FMAs.

PALAVRAS-CHAVE: microrganismo, diversidade, *Coffea arabica*

GLOMEROMYCOTA FUNGUS ANALYSIS IN COFFEE SOIL BY SEQUENCING

ABSTRACT: The presence of mycorrhizal associations in plants is very common under natural soil conditions. Only some plants, such as Brassicaceae, have no association. Most other plants, especially those of economic importance, such as forest species, annual and perennial crops form mycorrhizal associations. The objective of this study was to evaluate the community of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) present in the soil of *Coffea Arabica L.* cultivar coffee plantations collected in properties located at different altitudes and faces of sun exposure by the next generation sequencing technique. Twenty-seven *C. arábica* soil samples were collected from 9 properties of the state of Espírito Santo at different altitudes and sun exposure faces. Three sites were sampled on Catuai Vermelho crops on each property, each site consisted of 3 plants and soil were collected at 5 points per plant. These were transported in plastic bags on ice to the laboratory. Genomic DNA from the composite samples was extracted using the Nucleo Spin Soil kit according to the manufacturer's recommendations. The ITS1 region of the DNA was PCR amplified and library assembly products were sequenced on the Illumina MiSeq 2x250bp platform. All analyzes were performed using the R and Qiime software, after statistical analysis it was observed that the richness and evenness did not differ from each other, there was no significant change in richness, evenness or diversity as a function of altitude. The AMFs were found at all altitudes and faces evaluated showing their importance for *Coffea arabic* culture. P availability is a very important factor in AMF diversity in soil, when higher P availability in soil solution will be lower AMF diversity and richness.

KEY WORDS: microorganism, diversity, *Coffea arábica*

INTRODUÇÃO

O café foi introduzido no Brasil em 1727, e ao longo do tempo o país se consolidou como um grande produtor de café do tipo *commodity*. Entretanto, o consumidor vem trocando o café “*commodity*” pelo café fino ou “especial”. Com o grande crescimento desse mercado com padrões de qualidade elevada, torna-se essencial estudar formas de aumentar a qualidade dos frutos do cafeeiro. Uma das formas é melhorar a qualidade das plantas de café através da utilização dos

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs). As micorrizas arbusculares são associações simbióticas entre fungos do filo Glomeromycota e raízes da maioria das plantas vasculares. Os FMAs atuam como um complemento do sistema radicular da planta hospedeira, capaz de aumentar a absorção de P e outros nutrientes, promover proteção contra patógenos e a estresse hídrico (Lynch e Ho, 2005; Colozzi Filho e Cardoso, 2000). Esta simbiose é particularmente importante para o cafeeiro, porque este apresenta elevada dependência dos FMAs, na fase de produção de mudas (Siqueira & Colozzi Filho, 1986). Entretanto, as informações sobre a ocorrência de FMAs em cafeeiros não-inoculados mostram a predominância de espécies indígenas de baixa eficiência simbiótica (Fernandes, 1987; Balota & Lopes, 1996a). Espécies selecionadas eficientes normalmente não ocorrem no campo (Lopes et al., 1983), e quando introduzidas via inoculação, têm dificuldade de permanecer no agrossistema (Balota & Lopes, 1996b). Por meio do manejo das culturas é possível aumentar o potencial de inóculo natural do solo (Baltruschat & Dehne, 1988) e a diversidade de espécies de FMAs, promovendo a sustentabilidade do agrossistema (Bethlenfalvay & Linderman, 1992). A influência de fatores topográficos e químicos do solo sobre a comunidade de FMAs ainda é pouco elucidada. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a comunidade de fungos micorrízicos no solo de cafeeiro de amostras coletadas em propriedades localizadas em diferentes altitudes (735 a 1078 m) e faces de exposição ao sol (Leste, oeste e sul) pela técnica de sequenciamento de nova geração.

MATERIAL E METODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Associações Micorrízicas e Genética de Microrganismos do Departamento de Microbiologia / Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), da Universidade Federal de Viçosa – UFV, em Viçosa – Minas Gerais.

Amostragem

Vinte e sete amostras compostas de solo de *C. arábica* foram coletadas de em 9 propriedades do Estado do Espírito Santo em diferentes altitudes e faces de exposição ao Sol (Figura 1). Três locais foram amostrados em lavouras de Catuai Vermelho em cada propriedade, cada local foi composto por 3 plantas e foram coletados solo em 5 pontos por planta. Estas foram transportadas no interior de sacos plástico sobre gelo até o laboratório de Associações Micorrízicas - UFV. Aproximadamente um 500 g de solo foram utilizados para extração do DNA total, utilizando o *kit* Nucleo Spin Soil (Machereye-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8 %) corados com brometo de etídio e visualização sob luz UV, para verificação de bandas indicativas da presença de DNA genômico do solo. A região ITS1 do DNA foi amplificada por PCR e os produtos da amplificação utilizados para montagem de biblioteca e sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq de ambas as fitas senso e antisense (2x250 pb). As sequências foram submetidas a filtros de qualidade utilizando o software QIIME 1.9.1, agrupadas em unidades taxonômicas de 97 % de similaridade usando vsearch, anotadas utilizando o algoritmo blast do QIIME 1.9.1 e o banco de dados UNITE. As análises estatísticas e gráficos foram realizadas no R 3.5.1 (R Core Team 2018).

Propriedade	Altitude	Face de exposição ao sol
FA1	799.19	Leste
FA2	791.00	Leste
DB	907.69	Sul
FC	735.00	Oeste
LP	1078.08	Sul
FS	1052.17	Sul
LD	969.00	Sul
WT	1021.99	Sul
ST	870.24	Leste

Figura 1: Altitude e face e exposição ao Sol associadas a cada propriedade onde foram coletadas as amostras de solo e raiz de *Coffea arabica* L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas duas classes do filo *Glomeromycota*: *Paraglomeromycetes* e *Glomeromycetes*, e três ordens: *Paraglomerales*, *Glomerales* e GS24 (Figura 2). A ordem *Paraglomerales* foi encontrada somente na face leste (Figura 2).

Reino	Filo	Classe	Ordem	Oeste	Leste	Leste	Leste	Sul	Sul	Sul	Sul	Sul
				735.00	791.00	799.19	870.24	907.69	969.00	1021.99	1052.17	1078.08
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	0	33	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	0	8	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	13	0	0	0	2	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	4	0	0	0	1	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	32	3	0	10	13	1	0	12	2
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	0	18	0	0	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	0	0	0	0	7	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Glomerales	0	15	0	13	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	GS24	0	7	0	0	144	5	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	GS24	0	8	9	33	0	1	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	GS24	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	GS24	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	GS24	0	0	0	0	50	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	GS24	0	77	19	118	2	58	93	9	0
Fungi	Glomeromycota	Paraglomeromycetes	Paraglomerales	0	13	7	52	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	unidentified	unidentified	0	0	0	9	0	0	0	0	0
Fungi	Glomeromycota	unidentified	unidentified	0	0	0	0	0	0	0	13	0

Figura 2: Diversidades de fungos presente nas análises do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq, das 9 propriedades estudadas. (FC- 735; FA2- 791; FA1-799.19; ST-870.24; DB-907.69; LD-969; WT-1021.99; FS-1052.17; LP-1078.08).

A comunidade de FMAs mostrou a mesma equitabilidade e riqueza em todas as faces de exposição ao Sol. Entretanto a diversidade na face leste e na face sul foram, respectivamente, a maior e a menor. Solos da face sul tem uma menor incidência de radiação solar, enquanto que solos da face leste e oeste, recebem, respectivamente, maiores quantidades de radiação no período da manhã e da tarde (Chu et al. 2016). O nível de radiação varia em função da face de exposição e interfere na umidade do solo, o que pode estar relacionado com as diferenças na diversidade de espécies de FMAs observadas (Figura 3A), além de influenciar na qualidade final da bebida de café (de Assis Silva et al. 2016; Avelino et al. 2005), logo deve-se atentar para a mesma na implantação de lavouras. Não foi observada alteração significativa de riqueza (p -valor = 0.18), equitabilidade (p -valor = 0.39) ou diversidade (p -valor = 0.19) em função da altitude (Figura 3B). Resultado similar a este já foi relatado previamente (De Beenhouwer et al. 2015), entretanto outros trabalhos mostram que a altitude apresenta forte influência sobre a comunidade de FMAs (Jansa et al. 2014; Oehl et al. 2011). Os resultados das correlações entre fatores edáficos e índices biológicos (riqueza, equitabilidade e diversidade) mostram correlações significativas entre estas variáveis (Figura 4). Com aumento do pH, ocorre um aumento da equitabilidade da comunidade de FMAs. O aumento da disponibilidade de fósforo no solo esteve diretamente relacionado com aumento da diversidade e abundância de FMAs. O pH e a disponibilidade de P, Ca e Mg, têm sido amplamente citados como importantes sobre a ocorrência de FMAs, sua germinação no solo e colonização de plantas (Siqueira et al., 1989; 1990). Entretanto, a determinação de correlações entre ocorrência de FMAs e estes fatores é difícil. O que se observa nos trabalhos de levantamento são tendências de ocorrências de FMAs em função de algumas variáveis de solo.

Estudo anterior em cafezais na Etiópia (Muleta et al. 2007) mostrou uma relação positiva entre as contagens de esporos de FMA e os gêneros de FMA no solo de florestas cafeeiras e disponibilidade de P no solo. Surpreendentemente, também estudos de marcadores moleculares focados em comunidades de FMA de solo não relataram efeitos negativos do P na diversidade FMA (Jansa et al., 2014; Xiang et al., 2014), sendo conflitante com os resultados obtidos no qual modelo estatístico indica que o conteúdo de fósforo (P) no solo foi a única variável que significativamente correlacionado com a diversidade de FMA, onde a riqueza e a diversidade diminuíram significativamente com o aumento de P (Figura 4), indicando que a disponibilidade de P é um fator diretamente relacionado com a diversidade de FMAs no solo.

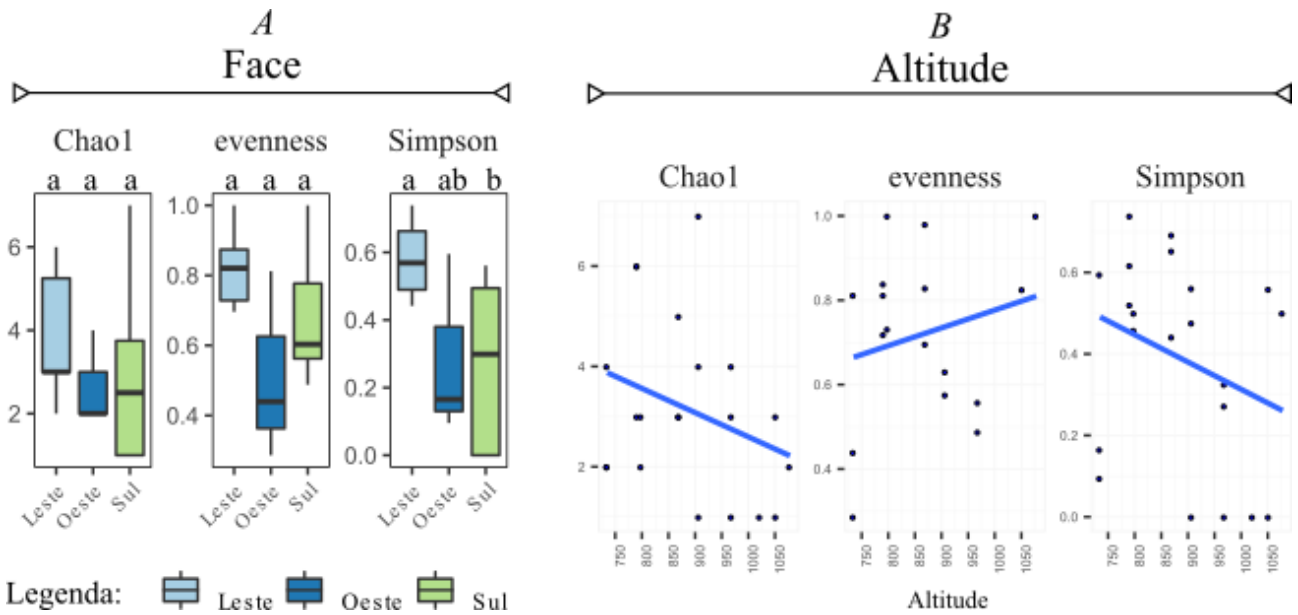


Figura 3: Índices de riqueza (Chao¹), equitabilidade (evenness) e diversidade (Simpson) de fungo do filo glomeromycota presentes em solo de cafeeiro em diferentes faces de exposição do solo (A) e altitudes (B). Faces apresentando a mesma letra sobre o gráfico não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 0.05.

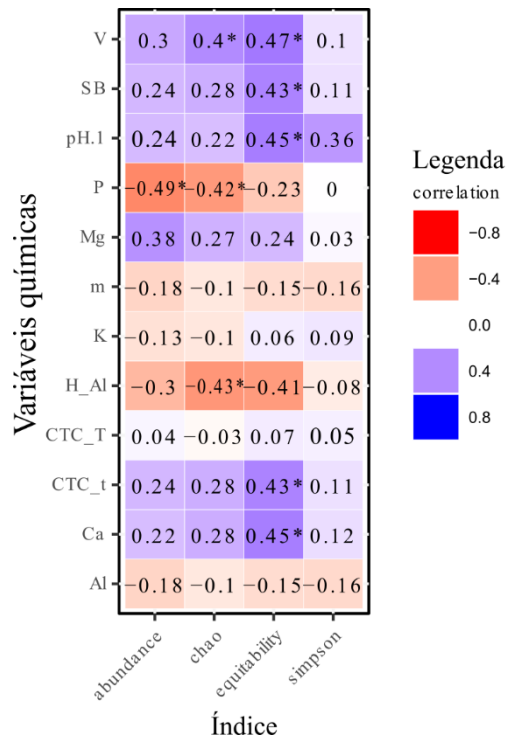


Figura 4: correlações entre variáveis químicas do solo (linhas) e índices biológicos (abundancia, riqueza, equitabilidade e diversidade; colunas) de fungos do filo glomeromycota presentes em solo de cafeeiro.

CONCLUSÕES

- 1 - Os FMAs estão presentes em todas as altitudes e todas as faces avaliadas mostrando sua importância para a cultura de *Coffea* arábica.
- 2 - A disponibilidade de P é um fator muito importante na diversidade de FMAs no solo, quando maior disponibilidade de P na solução do solo menor será a diversidade e a riqueza de FMAs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S. Introdução de fungo micorrízico arbuscular no cafeeiro em condições de campo. II. Flutuação sazonal de raízes, de colonização e de fungos micorrízicos arbusculares associados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.20, p.225-232, 1996b.
- BALTRUSCHAT, H.; DEHNE, H.W. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. II. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential of winter barley. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.113, p.251-256, 1988.
- BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p.1-25. (ASA Special Publication 54).
- COLOZZI FILHO, A.; CARDOSO, E.J.B.N. Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalaria cultivada na entrelinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.2033-2042, 2000.
- FERNANDES, A.B. *Micorrizas vesicular-arbusculares em cafeeiro da região sul do Estado de Minas Gerais*. Lavras: ESAL, 1987. 98p. Dissertação de Mestrado.
- JANSA, J., ERB, A., OBERHOLZER, H.-R., SMILAUER, P., EGLI, S., 2014. Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Molecular Ecology* 23, 2118e2135.
- LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; DIAS, R.; SCHENCK, N.C. Occurrence and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coffee e (*Coffea arabica* L.) plantations in central São Paulo State, Brazil. *Turrialba*, San José, v.33, n.4, p.417-422, 1983.
- LYNCH, J.P.; HO, M.D. Rhizoeconomics: Carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant and Soil*, v. 269, p.45-56, 2005.
- MULETA, D., ASSEFA, F., NEMOMISSA, S., GRANHALL, U., 2007. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. *Forest Ecology and Management* 241, 145e154.
- R Core Team. 2018. "R: A Language and Environment for Statistical Computing."
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.10, p.207-211, 1986.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.12, p.1499-1506, dez. 1989.
- SIQUEIRA, J.O.; ROCHA JÚNIOR, W.F.; OLIVEIRA, E.; COLOZZI FILHO, A. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.10, p.65-71, 1990.
- XIANG, D., VERBRUGGEN, E., HU, Y., VERESOGLOU, S.D., RILLIG, M.C., ZHOU, W., XU, T., LI, H., CHEN, Y., CHEN, B., 2014. Land use influences arbuscular mycorrhizal fungal communities in the farming-pastoral ecotone of northern China. *New Phytologist* 204, 968e978.