

PERFIL DA COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES EM PLANTAÇÕES DE CAFÉ LOCALIZADOS EM DIFERENTES ALTITUDES

Vilian Borchardt Bullergahn²; Marliane de Cássia Soares³; Tomás Gomes Reis Veloso⁴; Rogério C. Guarçoni⁵; Maria Catarina Megmuni Kasuya⁶; Aldemar Polonini Moreli⁷; Lucas Louzada Pereira⁸.

1. Trabalho financiado pela Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo – Sicoob e pelo CNPq.
2. Estudante do curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Depart. Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. vilianborchardt@gmail.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. Pesquisador Dr. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Av. Domingos Perim, 1231 - Providência
6. Professora Dra. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mkasuya@ufv.br.
7. Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Administração, Venda Nova do Imigrante. aldemar.moreli@ifes.edu.br.
8. Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Administração, Venda Nova do Imigrante. lucaslozada@hotmail.com.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da altitude e características químicas do solo sobre o perfil da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), presente em plantios de *Coffea Arabica L.* Amostras compostas de solo foram coletadas em uma profundidade de 0 a 10 cm em fazendas em Venda Nova do Imigrante - ES. A extração de DNA foi realizada com o kit Nucleo Spin Soil a partir de amostras de solo e posteriormente a técnica Nested PCR-DGGE foi utilizada para analisar o perfil da comunidade de FMA e também para o cálculo dos índices de diversidade. Amostras de solo também foram utilizadas para as análises químicas. As variáveis de equidade e diversidade diminuíram significativamente com a elevação da altitude. A saturação por bases (V (%)) influenciou positivamente a riqueza, equitabilidade e diversidade de FMA, enquanto a acidez potencial (H + Al) influenciou negativamente essas variáveis. A disponibilidade de Ca²⁺ resultou em aumento da riqueza de FMA. Altitude e fatores químicos do solo modulam a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares do solo do cafeeiro. Assim, escolha do local de plantio e o manejo adequado do solo podem o aumento da diversidade destes fungos, que podem otimizar a absorção de água e sais minerais pelas raízes.

PALAVRAS-CHAVE: microrganismos, DGGE, diversidade, *Coffea Arabica L.*

PROFILE OF ARBUSCULAR MICORRIZAL FUNGI COMMUNITY ON COFFEE PLANTATIONS LOCATED IN DIFFERENT ALTITUDES

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the influence of altitude and chemical characteristics of the soil in the profile of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) community, present in *Coffea Arabica L.* plantations. Soil composite samples were collected at a depth of 0 to 10 cm in farms in Venda Nova do Imigrante - ES. DNA extraction were performed with the *Nucleo Spin Soil* kit from soil samples and subsequently the *Nested PCR-DGGE* technique. Equitability and diversity variables decreased significantly with elevation. Base saturation (V (%)) positively influences AMF richness, equitability and diversity, while potential acidity (H + Al) negatively influences these variables. The availability of Ca²⁺ resulted in increased MF richness. Altitude and soil chemical factors modulate the AMF community of coffee soil. Thus, the choosing of local of plantation and appropriate management can increase the diversity AMF, which an optimize mineral and water absorption by the plant roots.

KEY WORDS: Microorganism, DGGE, diversity, *Coffea Arabica L.*

INTRODUÇÃO

O consumo de café no mundo cresce a cada ano, principalmente em países não produtores do grão. Atrélado a isso, cresce também a exigência de qualidade do produto, da responsabilidade social e da responsabilidade ambiental da cadeia produtiva como um todo. Novas técnicas e processos são necessários para reduzir os impactos e custos de produção, consequentemente aumentar a qualidade e a produtividade, atendendo assim às exigências do mercado de cafés especiais. O Brasil, é o maior produtor e exportador mundial de café, além disso, é um país tropical, que se constitui em sua maioria, de solos ácidos, de baixa fertilidade, com altas concentrações de alumínio e em determinadas regiões baixos índices pluviométricos, sendo isso um grande desafio para a exigência do mercado. Visando contornar essas dificuldades e aumentar a eficiência do uso do solo e a manutenção de suas propriedades biológicas, com reflexos na qualidade final do produto, a comunidade microbiana do solo é de grande importância, pois proporciona melhorias em características do solo como agregação de partículas, mineralização, aeração, disponibilidade de nutrientes,

armazenamento de água, prevenção de fitopatógenos e outros, refletindo assim na qualidade do fruto. Em lavouras cafeeiras em solos de baixa fertilidade, microrganismos como fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são de grande importância para o desenvolvimento, pois aumentam área rizosférica, resultando em maior eficiência na absorção de nutrientes e água, além de auxiliar contra infestação de alguns patógenos (TAVARES, 2011). Os FMAs são microrganismos biotróficos obrigatórios que colonizam 80 % das plantas terrestres (SMITH & SMITH 2008). Auxiliam na absorção de P, N e outros elementos (TIAN et al., 2010; HAJONG ET AL., 2013; VERGARA ET AL., 2019). Embora os FMA possam favorecer o crescimento de plantas, os efeitos podem variar conforme a interação entre espécies de fungo, espécie vegetal e ambiente (BHATTACHARYA & BAGYARAJ, 2002). E a ocorrência de diferentes gêneros e espécies de FMAs no solo e nas raízes de plantas de cafés varia dependendo de vários fatores tais como condições edafoclimáticas e práticas culturais (ANDRADE et al., 2009). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da altitude e de características químicas do solo no perfil da comunidade de FMAs, presentes em plantações de *Coffea arabica* L.

MATERIAL E METODOS

As coletas foram realizadas na cidade de Venda Nova do Imigrante – ES, em nove propriedades em altitudes variando de 735 a 1078 metros. Em cada propriedade foram coletados dados de altitude e três amostras compostas de solo, sendo que uma amostra era composta por 3 pontos numa área de 1 m², numa profundidade de 0 a 10 cm (Faoro, 2010). Amostras de solo foram enviadas para um laboratório para análises de rotinas. Aproximadamente 1 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. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em tubos de PCR de paredes finas com volume de 0,5 mL, utilizando-se a enzima Go Taq[®] Flex DNA Polimerase (Promega, Madison, USA) em um volume de 50 µL de tampão (20mM Tris-HCl; 50mM KCl; pH 8,4). A PCR consistiu em uma mistura de 20 ng de DNA total, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mg mL⁻¹ de albumina de soro bovino (BSA), 0,2 µM de cada primer e 1,25 unidades de GoTaq[®] Flex DNA Polimerase (Promega, Madison, USA). Os controles negativos consistiram de 1 µL de água MilliQ, em substituição à amostra de DNA, para se checar a presença de possíveis contaminantes. Todo o material utilizado no preparo das reações foi previamente esterilizado. Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos correspondentes ao rDNA 18S, no solo na primeira rodada foram: AML1 (5'- ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-3') em combinação com o *primer* AML2 (5'- GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3') (Lee et al., 2008). As amostras de DNA utilizadas para amplificação da região desejada consistiram de 1 µL do DNA total extraído do solo. A mistura de reação para realização do PCR foi composta de 200 µM de cada um dos quatro desoxinucleosídeos trifosfatados, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM de cada primer e 1,25 U de Go Taq DNA polimerase. Foi adicionada, também uma alíquota de 0,8 µL (0,8 µg µL⁻¹) de albumina bovina acetilada (BSA, Promega) para cada reação, com a finalidade de potencializar a ação da polimerase. As amplificações do PCR foram conduzidas em um termociclador (Mastercycler eppgradient, Eppendorf). Para a confirmação da presença do produto amplificado, alíquotas dos produtos das reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8 % p/v), corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. A amplificação do fragmento de DNA que corresponde ao rDNA 18S dos FMAs, a partir destes dois primeiros *primers* descritos (AML1 e AML2), resultou em fragmentos de DNA de aproximadamente 800 pb. Com a finalidade de se obter um fragmento de DNA menor para realização da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), e melhor observação das bandas no gel, foi realizada uma segunda rodada de reações de PCR (*Nested* PCR). Uma alíquota de 1µL da primeira reação foi utilizada como amostra para o *Nested* PCR. Foram utilizados os primers NS31-GC e Glo1, empregando-se a mesma reação de mistura utilizada na primeira rodada de PCR. Foi realizada a desnaturação inicial do DNA da amostra por 5 min a 94 °C, seguidos por 35 ciclos com desnaturação por 45s a 94 °C, pareamento por 45s a 52 °C e extensão por 1 min a 72 °C e para a extensão final dos fragmentos a 72 °C por 30 min. Para a confirmação da presença dos produtos, 5 µL da reação de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1,5 % p/v) corados com brometo de etídio, e visualizados sob luz UV. Dos produtos obtidos pela técnica de *Nested* PCR a partir dos *primers* acima citados recolheu-se uma alíquota de 20 µL de cada repetição para ser submetida a análises por DGGE (Modelo Dcode[™] System – BIO-Rad Califórnia, USA). Uma amostra de 20 µL do produto do *Nested* PCR foi aplicada ao gel de poliacrilamida 8 % (p/v) em tampão TAE 1X. Os géis foram preparados com gradiente desnaturante variando de 35-55 % para FMAs, (onde 100 % de desnaturação apresentaram a concentração de 7M de uréia e 40 % de formamida). Os géis foram submetidos à eletroforese vertical por 10 min a 120 V seguidos de 12 h a 100 V à temperatura de 60 °C, e posteriormente corado por 40 min com SYBR Gold (1x) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e fotografado sob luz ultravioleta no fotodocumentador Molecular Imaging (Loccus biotecnologic L-Pix Chemi). Os perfis das bandas foram analisados e comparados usando o software BioNumerics (Version 5.1, Applied Maths NV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil da comunidade de FMA, obtido por meio da técnica de DGGE (Figura 1), mostrou um grupo principal com mais de 60 % de similaridade, com amostras localizadas em altitude de 735 a 969 m de. As amostras oriundas de maiores altitudes não se agruparam neste grupo principal, mostrando que a altitude influencia a distribuição da comunidade de FMAs.

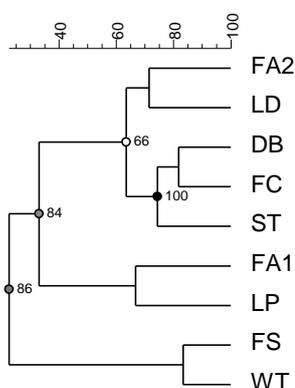


Figura 1. Dendrograma do perfil da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares obtidos pela técnica de DGGE, Utilizando a correção de DICE WARD.

De modo geral, os indicadores de riqueza e diversidade diminuíram com o aumento da altitude, com exceção da propriedade “LP” (Tabela 1), mostrando que outros fatores além da altitude influenciam a população de FMA. Ao avaliar a interação entre as variáveis químicas e biológicas do solo, observa-se que a riqueza, equitabilidade e diversidade de FMA aumentou de acordo com o aumento da saturação por bases (V(%)) e diminuiu com maior acidez potencial (H+A1) (Figura 2), o que pode ser devido a uma maior disponibilidade de nutrientes resultar em maior absorção pelos FMA e maior produção de fotoassimilados pela planta, tornando a interação entre ambos mais significativa, afetando positivamente o desenvolvimento. Menores valores das variáveis riqueza, equitabilidade e diversidade com o aumento da acidez está em contrapartida a muitos trabalhos da literatura, visto que fungos se desenvolvem melhor em solos ácidos (LEITE, 2007).

Tabela 1. Indicadores de riqueza (Chao), equitabilidade e diversidade (Shannon) de fungos micorrízicos arbusculares em solo rizosférico de *Coffea arabica*.

Propriedades	Altitude (m)	Riqueza Chao	Equitabilidade	Diversidade Shannon
FC	735	11	0.96	0.89
FA2	792	14	0.98	0.92
FA1	799	12	0.98	0.91
ST	870	10	0.92	0.86
DB	908	11	0.98	0.90
LD	969	14	0.97	0.92
WT	1022	6	0.89	0.76
FS	1052	6	0.90	0.77
LP	1078	12	0.93	0.89

A riqueza aumentou de acordo com o aumento da disponibilidade de Ca^{2+} , mas não houve interferência na equitabilidade e diversidade (Figura 2). O teor de Ca^{2+} no solo pode estar influenciando a comunidade de FMA de maneira direta e ou indireta. Este elemento pode também estar influenciando a disponibilidade de outros nutrientes como o caso do Fe, Zn, Cu e Mn que são conhecidos por interferir na micorrização. É possível ainda que essas variáveis químicas atuem na composição da biota antagonista presente no solo influenciando por consequência a população de FMA (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

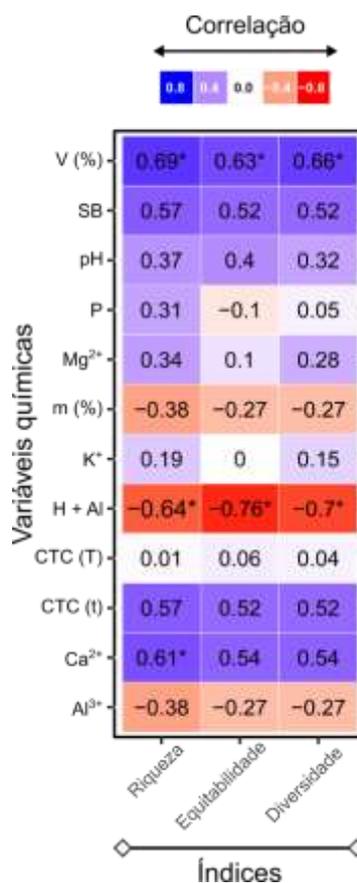


Figura 2. Correlação entre índices biológicos (riqueza, equitabilidade e diversidade) da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares e variáveis químicas do solo. Valores seguidos por asterisco (*) dentro das células representam a correlação significativa de Spearman ($\alpha = 0.1$).

CONCLUSÕES

1. A altitude e fatores químicos do solo modulam a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares de solo de cafeeiro.
2. A escolha do local de plantio e o manejo adequado do solo podem aumentar da diversidade destes fungos, que podem otimizar a absorção de água e sais minerais pelas raízes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S., MAZZAFERA, P., SCHIAVINATO, M., & SILVEIRA, A. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *The Journal of Agricultural Science*, 147(2), 105-115. doi:10.1017/S0021859608008344. 2009.
- Lee, J., Lee, S., Young, J.P.W., 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 339–349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x>.
- TAVARES, RODRIGO DE CASTRO. Funcionalidade das micorrizas arbusculares em cafezais agroecológicos. 2011.
- HAJONG, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Comparative study of key phosphorus and nitrogen metabolizing enzymes in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.35, p.2311-2322. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11738013-1268-z>. 2013.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. Mycorrhizal Symbiosis. 3ª Edition, Academic Press, London. 2008.
- TIAN, C.; KASIBORSKI, B.; KOUL, R.; LAMMERS, P.J.; BÜCKING, H.; SHACHAR-HILL, Y. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology*, v.153, p.1175-1187. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.156430>. 2010.
- VERGARA, C.; ARAUJO, K.E.C.; SOUZA, S.R. de; SCHULTZ, N.; JAGGIN JÚNIOR, O.J.; SPERANDIO, M.V.L.; ZILLI, J.É. Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.54, e25140. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.25140>. 2019.
- LEITE, L. F. C. Ecologia Microbiana do Solo/ Luiz Fernando Carvalho Leite, Ademir Sérgio Araujo. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007.