

## BACTÉRIAS DA ORDEM RHIZOBIALES NO SOLO DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica*)

Anastácio, Larissa Márcia<sup>2</sup>; Marliane de Cássia Soares Silva<sup>3</sup>; Tomás Gomes Reis Veloso<sup>4</sup>; Aldemar Polonini Moreli<sup>5</sup>, Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>6</sup>; Lucas Louzada Pereira<sup>7</sup>.

<sup>1</sup> Trabalho financiado pela Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo- Sicoob e CNPq.

<sup>2</sup> Bolsista, Estudante Eng. Agrícola e Ambiental. Universidade Federal de Viçosa, Dep. Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. larissa.anastacio@ufv.br

<sup>3</sup> Pós doutora Universidade Federal De Viçosa, Departamento De Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mcassiabio@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Doutorando. Ms. Universidade Federal De Viçosa, Departamento De Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. tomasgomesrv@gmail.com

<sup>5</sup> Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Departamento de Administração, Venda Nova Do Imigrante. aldemar.moreli@ifes.edu.br

<sup>6</sup> Professora Dra. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa, Minas Gerais. mkasuya@ufv.br

<sup>7</sup> Professor Dr. do Instituto Federal do Espírito Santo, Dep. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Venda Nova do Imigrante. lucaslozada@hotmail.com

**RESUMO:** A qualidade final do café pode ser determinada pela comunidade de microrganismos presente nos solos dos cafeeiros. Para se obter café de alta qualidade, um conjunto de interações entre os fatores bióticos e abióticos devem ser considerados. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a comunidade de bactérias da ordem Rhizobiales presentes no solo do cafeeiro sob diferentes faces de exposição ao sol e altitudes, verificando sua potencialidade na produção da qualidade do café. As amostras do solo do cafeeiro foram coletadas de 9 propriedades do Estado do Espírito Santo que cultivam a variedade Catuaí. As propriedades apresentam altitude variando de 735 a 1.078 m e diferentes faces de exposição ao sol. Três locais foram amostrados 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 16 S do DNA foi amplificada por PCR e os produtos utilizados para montagem de biblioteca, os quais foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq 2x150pb. Todas as análises foram realizadas utilizando os softwares Qiime (v 1.9.1) and R (v3.5.1). Dentre os fatores analisados, a face de exposição ao sol é o fator que mais interferiu na comunidade de Rhizobiales, sendo encontradas nas faces leste e sul, respectivamente, as maiores e menores diversidades desta ordem. A riqueza variou principalmente entre 100 a 200 OTUs, porém não houve tendência significativa de aumento ou diminuição da mesma em função da altitude. Também não foi observada tendência de aumento ou diminuição para equitabilidade e diversidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rhizobiales, Microrganismos, Solos.

### RHIZOBIALES BACTERIA IN COFFEE SOIL (*Coffea arabica*)

**ABSTRACT:** The final quality of coffee can be determined by the community of microorganisms present in soils of coffee crops. A high quality coffee, relies on a set of interactions between biotic and abiotic factors, which must be considered in coffee farming. Thus, this work aimed to evaluate the bacterial community profile of Rhizobiales order presents in soil of coffee crops under different faces of sun exposure and altitudes, verifying their potentiality in coffee quality production. The soil samples were collected from 9 farms of the state of Espírito Santo that grows the Catuaí variety. In each farm were sampled three composite soil samples from three different sites, each composite sample were made by pooling 15 subsamples of soil which were collected from three plants (5 subsamples/plant). The farms have altitude ranging from 735 to 1,078 m and different sun-facing slopes. The samples were transferred to the Laboratory of Mycorrhizal Associations-UFVto processing. The genomic DNA was extracted using the kit Nucle Spin Soil, according manufacturer's instructions. The 16S region DNA were amplified by PCR and the products of this reaction used to construct DNA library to perform the sequencing in the platform Illumina MiSeq 1x150 pb. All the analyses were performed using the softwares Qiime (v 1.9.1) and R (v3.5.1). Among the analyzed factors, the sun-facing slope was the factor that most affected the Rhizobiales community, being east and south-facing slopes, respectively, the conditions that showed a most high and low diversities of this order. The richness ranged mainly from 100 to 200 OTUs, however there was not significant tendency of increase or decrease across the altitude range. In the same way, evenness and diversity were not affected by altitude.

**KEY WORDS:** Rhizobiales, Microorganisms, Soils.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo correspondendo a um terço da produção mundial, conforme dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), fazendo com que esta commodity seja a principal fonte econômica de alguns estados brasileiros. O Espírito Santo é o segundo maior produtor de café arábica do Brasil e é responsável por 22 % da produção brasileira, com expressiva produção de arábica e conilon (INCAPER). O café

(*Coffea arabica* L.) é uma planta perene de clima tropical, onde possui um ciclo de precipitação bem distribuído e originalmente é uma espécie adaptada à sombra e a altitudes entre 1000 a 2500 m (ALVES; LIVRAMENTO, 2003). Na maioria dos países produtores, o café é cultivado a pleno Sol, o que promove uma grande variação ambiental nas áreas de cultivo, provocando variações morfológicas externa das plantas. Para a produção de mudas de cafeeiro, a simbiose com fungos e bactérias torna-se extremamente importante, pois o cafeeiro possui elevada dependência de nutrientes principalmente de nitrogênio que é necessário para o crescimento, assim como a síntese de compostos. Na maioria dos solos tropicais, a produção das culturas é severamente limitada pela deficiência de nitrogênio (N), o que as torna dependentes da aplicação de adubos nitrogenados sintéticos ou de fontes nitrogenadas alternativas (PAULINO, Gleicia Miranda et al., 2009). Em condições ambientais adequadas, o N<sub>2</sub> atmosférico, fixado por meio da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, incluindo os rizóbios, pode atender parte dessas necessidades (Martínez-Romero et al., 1991). Na planta do cafeeiro não ocorre formação de nódulos nas raízes, porém existem rizóbios de vida livre no solo que realizam fixação de nitrogênio, por isso, para a produção de mudas, devem ser priorizados os fixadores de nitrogênio que possuem elevada eficiência e que sejam mais adaptados ao solo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as bactérias da ordem rizobiales presentes no solo do cafeeiro do Espírito Santo, cultivados em diferentes altitudes e sob diferentes faces de exposição ao sol, verificando sua potencialidade na produção da qualidade do café.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e sete amostras compostas de solo de *C. arabica* foram coletadas de 9 propriedades do Estado do Espírito Santo em diferentes altitudes e faces de exposição ao Sol (Tabela 1). Cada amostra composta era constituída de solo coletado em cinco pontos ao redor de 3 árvores. Estas foram coletadas e transportadas no interior de sacos plástico sobre gelo até o laboratório de Associações Micorrízicas (DMB/BIOAGRO/UFV).

As amostras tiveram o DNA genômico extraído usando o kit NucleoSpin Soil® (Macherey-Nagel). A região 16 S 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 (2x150 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 SILVA. As análises estatísticas e gráficos foram realizadas no R 3.5.1.

Tabela 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

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que as faces de exposição solar interferem na riqueza, equitabilidade e diversidade de Rhizobiales presente no solo de *C. arabica* (Figura 1). A face leste apresentou valores maiores para estas três variáveis, enquanto a face oeste apresentou os menores valores. A face de exposição ao Sol interfere na quantidade de radiação incidente sobre o solo em diferentes períodos do dia. Estudos avaliando a comunidade bacteriana em solos de floresta sob diferentes faces de exposição ao Sol mostraram que as faces que recebiam menos radiação são as que apresentam maior diversidade bacteriana (Chu et al., 2016). A exposição ao sol promove uma variação na qualidade final do café (Pereira, et al, 2018), além disso o cafeeiro pode se adaptar as condições diferenciais de radiação do Sol levando a um aumento ou diminuição de produtividade e qualidade da bebida (Matta & Rena, 2002).

A riqueza variou principalmente entre 100 a 200 OTUs, porém não houve tendência significativa de aumento ou diminuição da mesma em função da altitude. Também não foi observada tendência de aumento ou diminuição para equitabilidade e diversidade ( $p$ -valor  $> 0.05$  pelo teste  $t$  de Student, (Figura 2). Entretanto estudos demonstraram que em algumas amostras de café as altitudes entre 676 até 1.187 m interferiram na diversidade das populações já que as densidades de microrganismos endofíticos variaram e as médias de densidades populacionais de bactérias, em relação a cultivares e à altitude, diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si, sendo assim, a correlação simples por Pearson mostrou relação positiva ( $p < 0,05$ ) entre as contagens e altitude (Cordero et al;2015) .Alguns estudos apontam que maiores altitudes podem influenciar positivamente a qualidade de bebida, (Barbosa et al;2011), sendo que preferencialmente em altitudes mais elevadas foram observadas a melhor qualidade na bebida do café. Além disso verificaram que cafés produzidos numa maior faixa de altitude apresentam corpo e acidez mais fracos e doçura mais alta do que os produzidos na faixa de altitude mais baixa, concluindo que as maiores altitudes possibilitaram a produção de cafés de melhor qualidade. (Silva et al. 2004). A riqueza variou principalmente entre 100 a 200 OTUs, porém não houve tendência significativa de aumento ou diminuição da mesma em função da altitude.

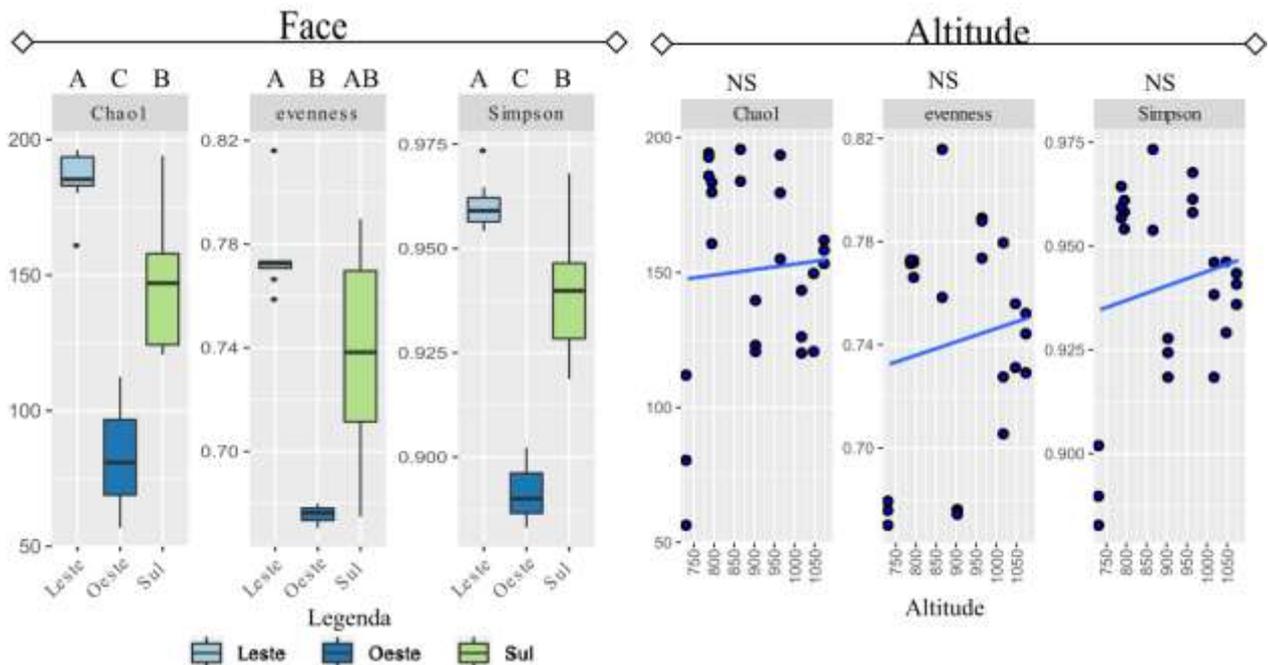


Figura 1. Índices de riqueza (Chao<sup>1</sup>), equitabilidade (evenness) e diversidade (Simpson) de bactérias da ordem Rhizobiales presentes em solo de cafeeiro em diferentes faces de exposição do solo e altitudes. Faces apresentando a mesma letra sobre o gráfico não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 0.05. NS = Não significativo pelo teste  $t$  de Student.

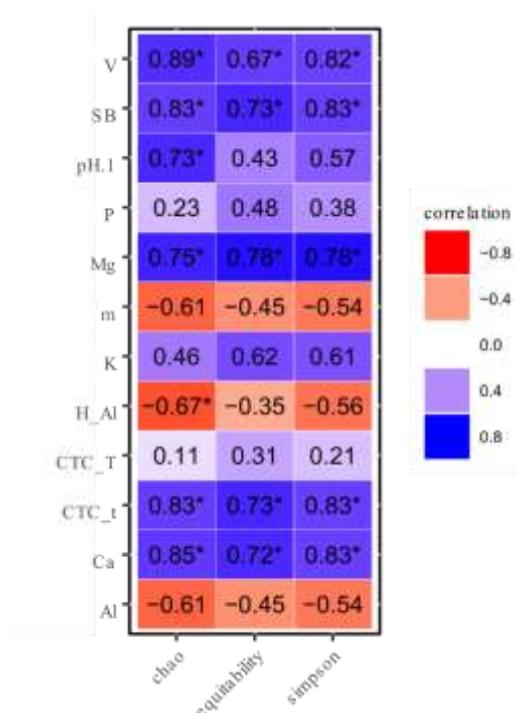


Figura 2. correlações entre variáveis químicas do solo (linhas) e índices biológicos (riqueza, equitabilidade e diversidade; colunas) de bactérias da ordem Rhizobiales presentes em solo de cafeeiro.

Os resultados da Figura 3 sugerem que as variáveis químicas dos solos estão ligadas às variações dos seus índices biológicos. Isso sugere que os componentes presentes no solo juntamente com os fatores exercidos sobre o ambiente, contribuem para uma menor ou maior manifestação de determinado tipo de microrganismo alterando a sua riqueza, equitabilidade e diversidade. A diversidade microbiana pode ter papel importante na manutenção da qualidade dos solos, pois a organização em diferentes condições e adaptações podem ser usadas como indicador de qualidade, sendo seus componentes o fator de para essa manutenção. Alguns estudos demonstraram que tanto a quantidade quanto a qualidade de matéria orgânica do solo podem afetar de maneira significativa a diversidade microbiana e a estrutura de suas comunidades (Kim et al.,2002). Sendo o responsável pelos processos biogeoquímicos mais importantes no solo a diversidade dos processos biogeoquímicos podem ser integrados em um fator único de expressão de qualidade, por meio de um índice associado à diversidade microbiana (Lambais et al;2005).

## CONCLUSÕES

Dentre os fatores analisados, a face é o fator que mais interferiu na comunidade de Rhizobiales, sendo assim esta deve ser considerada no planejamento de lavouras de café que visam a utilização do potencial bacteriano de fixação de nitrogênio presente no solo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Cooperativa de Crédito de Livre Admissão Sul Serrana do Espírito Santo-Sicoob, pelo financiamento da pesquisa, pelo provimento de recursos para desenvolvimento das ações, bem como o laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa, pelo suporte laboratorial para condução dos estudos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J.D. E LIVRAMENTO, D.E. **Morfologia e Fisiologia do Cafeeiro**. Textos Acadêmicos. Faepe/Ufla. 50p.2004.
- BARBOSA, J. N.; BORÉM, F. M.; ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C.; SOUZA, V. C. O. **Distribuição espacial de cafés do estado de Minas Gerais e sua relação com a qualidade**. Coffee Science, Lavras, v. 5, n. 3, p. 237- 250, 2011.
- CHU et al;2016. H, Chu, X. Xiang, J. Yang, J.M. Adams, K. Zhang, Y. Li, Y. Shi**Effects of slope aspects on soil bacterial and arbuscular fungal communities in a boreal forest in China** Pedosphere, 26 (2016), pp. 226-234.

- CORDERO, Alexander Francisco Perez. Diversity of endophytic bacteria in coffee cherries. 2008. 89 f. Tese (Doutorado em Associações micorrízicas; Bactérias lácticas e probióticos; Biologia molecular de fungos de interesse) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- DA MATTA, F.M.; RENA, A.B. Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: UFV, 2002. p.93-136
- INCAPER- Instituto Capixaba de Pesquisas, Assistência Técnica e Extensão Rural
- KIM, J.S.; JOO, J.B.; WEON, H.Y.; KANG, C.S.; LEE, S.K. & YAHNG, C.S. FAME. **Analysis to monitor impact of organic matter on soil bacterial populations. J. Microbiol. Biotec.**, 12:382-388, 2002.
- Lambais, M.S. **Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas**.2005.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. Trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.
- MAPA -Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- PAULINO, Gleicia Miranda et al. **Fixação biológica e transferência de nitrogênio por leguminosas em pomar orgânico de mangueira e gravioleira. Pesq. agropec. bras.** [online]. 2009, vol.44, n.12
- PEREIRA, L. L.; GUARÇONI, R. G.; CARDOSO, W. S.; TAQUES, R. C.; MOREIRA, T. R.; SILVA, S. F. da.; CATEN, C. S. T. **Influence of Solar Radiation and Wer Processing on the Final Quality of Arabica Coffee**.2018.Espírito Santo.
- SILVA, R. F.; PEREIRA, R. G. F. A; BORÉM, F. M.; MUNIZ, J. A. **Qualidade do café-cereja descascado produzido na região Sul de Minas Gerais**. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, 2004.