

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO FELIPE SILVA ORTA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA EM SOLO E FRUTO DE CAFÉS
ESPECIAIS DAS VARIEDADES PARAÍSO E CATUAÍ NA REGIÃO DO ALTO
PARANAÍBA**

PATOS DE MINAS, MG

ABRIL DE 2024

BRUNO FELIPE SILVA ORTA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA EM SOLO E FRUTO DE CAFÉS
ESPECIAIS DAS VARIEDADES PARAÍSO E CATUAÍ NA REGIÃO DO ALTO
PARANAÍBA**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Matheus de S. Gomes
Coorientadora: Dr^a. Livia C. F. Silva

**PATOS DE MINAS, MG
ABRIL DE 2024**

BRUNO FELIPE SILVA ORTA

Caracterização da microbiota em solo e fruto de cafés especiais das variedades Paraíso e Catuaí na região do Alto Paranaíba

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Presidente: Dr. Matheus de Souza Gomes
Universidade Federal de Uberlândia

Membro: Dra. Líbia Diniz Santos
Universidade Federal de Uberlândia

Membro: Renata Abadia Reis Rocha
Universidade Federal de Uberlândia

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, MG - 19 de abril de 2024

Dedico todo o esforço que me trouxe até este ponto à Deus e a minha amada família, cujo apoio incondicional tem sido a força propulsora da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu eterno agradecimento pelo apoio incondicional em todas as decisões que tomei até aqui. Sua confiança em mim e o incentivo para estudar em outro estado foram verdadeiramente inspiradores.

À Universidade Federal de Uberlândia e a todos os professores da instituição, agradeço por proporcionarem um ambiente de aprendizado enriquecedor e integrador. Seu compromisso contribuiu significativamente para minha formação tanto profissional quanto pessoal.

Ao Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes, sou profundamente grato pela oportunidade única de realizar a iniciação científica sob sua orientação. Sua orientação e apoio foram essenciais para o sucesso deste projeto.

À minha coorientadora e amiga, Dr^a Livia Carneiro Fidelis Silva, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade de trabalhar sob sua tutela. Sua orientação foi fundamental para a realização deste trabalho, e sou grato pelos sua paciência e solicitude em transmitir os ensinamentos necessários para o sucesso deste projeto.

Agradeço também ao técnico Milton Tomaz de Franco Junior pelo suporte técnico indispensável durante minhas análises. Sua expertise foi crucial para o progresso da pesquisa.

A todos os amigos que fiz ao longo da graduação e a todos que, de alguma forma, contribuíram para minha jornada acadêmica e para a realização deste trabalho, deixo o meu mais sincero “obrigado”.

A cada um de vocês, expresso minha gratidão por acreditarem em mim, por me incentivarem e por me ajudarem a alcançar meus objetivos.

*"Uma resposta aproximada para a pergunta
correta vale muito mais do que uma resposta
precisa para a pergunta errada."*

John Wilder Tukey

RESUMO

O termo "Café especial" refere-se a uma categoria de café de alta qualidade, cultivado e processado sob padrões rigorosos para atender a mercados internacionais exigentes. A qualidade sensorial do café é influenciada por diversos fatores, como o ambiente, a genética da planta, a microbiota, o manejo e o processo de torra. A microbiota desempenha um papel crucial em todas as fases da produção do café, desde o cultivo até a obtenção do grão seco. Em nosso estudo, utilizamos técnicas de sequenciamento de DNA e análises de bioinformática para investigar a diversidade microbiana no solo e nos frutos das variedades de *Coffea arabica* Catuaí e Paraíso, coletadas em campos experimentais da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizados nas cidades de Patrocínio e São Gotardo, na região do Alto Paranaíba. Identificamos 9.554 variantes de sequenciamento de amplicons (ASVs) bacterianas e 4.937 ASVs fúngicas. Entre os resultados, destacam-se nove gêneros fúngicos principais, incluindo produtores de metabólitos secundários como *Aspergillus* e *Fusarium*. A análise indicou a presença do gênero *Scedosporium* no solo de Patrocínio, sugerindo possível contaminação, além de gêneros benéficos como *Trichoderma* e *Humicola*. O gênero bacteriano *Methylobacterium*, conhecido por beneficiar o desenvolvimento vegetal, predominou nas amostras de frutos. Embora tenhamos identificado uma rica diversidade de comunidades microbianas nas variedades Catuaí e Paraíso, as comparações entre amostras de solo e frutos não revelaram diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que outros fatores podem estar influenciando a microbiota observada. A presença de gêneros fúngicos potencialmente patogênicos, como *Aspergillus* e *Fusarium*, requer atenção devido ao risco de produção de micotoxinas, enquanto a predominância de *Methylobacterium* nos frutos ressalta o potencial de manipulação da microbiota para a melhoria do desenvolvimento vegetal e da qualidade do café. Estes achados reforçam a importância de monitorar e gerenciar a microbiota no contexto da produção de café especial, visando otimizar tanto a segurança quanto a qualidade do produto final.

Palavras-chave: Análise taxonômica. Bioinformática. Microbioma.

ABSTRACT

The term "Specialty Coffee" refers to a category of high-quality coffee, cultivated and processed under rigorous standards to meet demanding international markets. The sensory quality of coffee is influenced by various factors such as the environment, plant genetics, microbiota, management, and roasting process. The microbiota plays a crucial role in all stages of coffee production, from cultivation to obtaining the dried bean. In our study, we used DNA sequencing techniques and bioinformatic analyses to investigate the microbial diversity in the soil and fruits of *Coffea arabica* varieties Catuaí and Paraíso, collected from experimental fields of the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG), located in the cities of Patrocínio and São Gotardo, in the Alto Paranaíba region. We identified 9,554 bacterial amplicon sequencing variants (ASVs) and 4,937 fungal ASVs. Among the results, nine major fungal genera stand out, including producers of secondary metabolites such as *Aspergillus* and *Fusarium*. The analysis indicated the presence of the genus *Scedosporium* in the soil of Patrocínio, suggesting possible contamination, as well as beneficial genera such as *Trichoderma* and *Humicola*. The bacterial genus *Methylobacterium*, known to benefit plant development, predominated in fruit samples. Although we identified a rich diversity of microbial communities in Catuaí and Paraíso varieties, comparisons between soil and fruit samples did not reveal statistically significant differences, suggesting that other factors may be influencing the observed microbiota. The presence of potentially pathogenic fungal genera such as *Aspergillus* and *Fusarium* requires attention due to the risk of mycotoxin production, while the predominance of *Methylobacterium* in fruits highlights the potential for manipulating the microbiota to improve plant development and coffee quality. These findings reinforce the importance of monitoring and managing the microbiota in the context of specialty coffee production, aiming to optimize both the safety and quality of the final product.

Keywords: Bioinformatics; Microbiome; Taxonomic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos filamentos de fungos identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: Fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), Variedade de café (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e Tipo de amostra (Solo e Fruta)	21
Figura 2 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais filamentos de fungos identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra.....	21
Figura 3 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos gêneros de fungos identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: Fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), Variedade de café (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e Tipo de amostra (Solo e Fruta)	23
Figura 4 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais gêneros de fungos identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra.....	24
Figura 5 - Índice de Richness para fungos, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra.....	33
Figura 6 - Índice de Shannon para fungos, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra.....	33
Figura 7 - Gráfico de PCoA (Análise de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para fungos: Comparação entre Solo e Fruto por Fazenda/Variedade de Café	34
Figura 8 - Gráfico de PCoA (Análises de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para fungos: Análise Abrangente com comparação entre todos os parâmetros: Tipos de Amostra, Fazenda e Variedade de Café.....	35
Figura 9 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos filamentos de bactérias identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), variedade (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e tipo de amostra (Solo e Fruta).....	36
Figura 10 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais filamentos de bactérias identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra.....	36
Figura 11 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos gêneros de bactérias identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: Fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), Variedade (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e Tipo de amostra (Solo e Fruta).....	41
Figura 12 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais gêneros de bactérias identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra.....	41
Figura 13 - Índice de Richness para bactérias, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra	43
Figura 14 - Índice de Shannon para bactérias, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra	43
Figura 15 - Gráfico de PCoA (Análise de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para bactérias: Comparação entre Solo e Fruto por Fazenda/Variedade de Café.....	45
Figura 16 - Gráfico de PCoA (Análises de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para bactérias: Análise Abrangente com comparação entre todos os parâmetros: Tipos de Amostra, Fazenda e Variedade de Café.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Extração do DNA	16
3.2	Sequenciamento	16
3.3	Softwares e recursos	17
3.4	Tratamento dos dados	17
3.5	Análise dos dados	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Fungos.....	20
4.1.1	Filos fúngicos.....	20
4.1.1.1	<i>Asmycota</i>	22
4.1.1.2	<i>Basidiomycota</i>	22
4.1.2	Gêneros fúngicos	23
4.1.2.1	<i>Fusarium</i>	24
4.1.2.2	<i>Scedosporium</i>	26
4.1.2.3	<i>Trichoderma</i>	27
4.1.2.4	<i>Aspergillus</i>	28
4.1.2.5	<i>Humicola</i>	29
4.1.2.6	<i>Strelitziana</i>	30
4.1.2.7	<i>Colletotrichum</i>	31
4.1.2.8	<i>Geastrum</i>	31
4.1.2.9	<i>Cladosporium</i>	32
4.1.3	Diversidade alfa de fungos	32
4.1.4	Diversidade beta de fungos.....	34
4.2	Bactérias	35
4.2.1	Filos bacterianos	35
4.2.1.1	<i>Proteobacteria</i>	37
4.2.1.2	<i>Actinobacteria</i>	38
4.2.1.3	<i>Chloroflexi</i>	39
4.2.2	Gêneros bacterianos.....	40
4.2.2.1	<i>Methylobacterium</i>	41
4.2.3	Diversidade alfa de bactérias	43
4.2.4	Diversidade beta de bactérias	44
5	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das principais *commodities* agrícolas do mundo, isto é, um produto primário que é comercializado em bolsas internacionais e negociados principalmente com base em preços padronizados. O café é cultivado em duas espécies principais: O café arabica (*Coffea arabica*) e o café canéfora (*Coffea canephora*). Neste contexto, o Brasil destaca-se como o principal produtor mundial de café, e de acordo com o monitoramento da safra brasileira de café realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) em janeiro de 2024, Minas Gerais desponta como o maior produtor de café arabica do país. A estimativa da área total de plantio no estado alcança 1.526.200 hectares, o que corresponde a mais de 73% da área agrícola nacional dedicada a essa cultivar, resultando em uma produção de mais de 40 milhões de sacas. O café figura como um dos principais produtos primários exportados pelo Brasil, com a região do Alto Paranaíba assumindo o papel de segunda principal produtora dessa commodity no estado.

Diferente do café *commodity*, os cafés especiais destacam-se por seus atributos sensoriais, proporcionando uma experiência sensorial única e de qualidade superior (SILVEIRA, *et al.* 2016). A avaliação desses cafés no Brasil é realizada por meio da análise sensorial, conhecida como "teste de xícara". A *Specialty Coffee Association* (SCA) estabelece critérios específicos para a avaliação sensorial, que é realizada por profissionais certificados conhecidos como "*Q-graders*". Essa avaliação torna-se mais rigorosa porque esses cafés possuem qualidade superior ao padrão de exportação, esta leva em consideração diversos aspectos do café, como corpo, aroma e acidez. Os cafés com pontuação entre 75 e 79 pontos são considerados commodities, enquanto aqueles com pontuação superiores a 80 pontos são classificados como cafés especiais (LINGLE, 2001, apud FIGUEIREDO, *et al.* 2013; SCA, 2024)

Sabe-se que o café é fortemente influenciado por fatores ambientais, como: temperatura, umidade do solo, incidência de radiação solar, altitude, micronutrientes disponíveis no solo, entre outros (BARBOSA, *et al.* 2012). Também ocorre diferenças relativas ao desempenho da cultivar utilizada, assim como carga genética e a microbiota componente do local. Existem também fatores associados ao manejo da cultivar antes, durante e após a colheita, como a secagem do grão, a fermentação e o armazenamento.

A microbiota desempenha um papel verdadeiramente vital em todos os estágios da produção de café, formando um ecossistema notável e complexo que abriga uma impressionante diversidade de espécies microbianas. Essa comunidade de microrganismos está presente desde o plantio inicial das mudas de café até as etapas avançadas do processamento, desempenhando um papel ativo na rizosfera, na endosfera e na filosfera vegetal e exercendo uma influência no desenvolvimento das plantas (LUCACIU, *et al.* 2019). Os fungos micorrízicos são um exemplo dessa relação, eles estabelecem uma relação simbiótica ficando nas raízes das plantas, auxiliando de diferentes maneiras na obtenção de nutrientes e água e contribuindo ativamente para o desenvolvimento vegetal (NARANJO-ORTIZ, *et al.* 2019a).

Além disso, esses microrganismos estão intrinsecamente envolvidos nos próprios frutos do café durante a fermentação, exercendo um impacto significativo no resultado do produto. A principal contribuição é realizada na degradação da mucilagem, produzindo várias enzimas, álcoois e ácidos durante o processo de fermentação, tanto a natural, que acontece durante o processo de secagem do café no terreiro, quanto a autoinduzida (HAILE, *et al.* 2019). A mucilagem é uma substância gelatinosa, rica em açúcares que envolve as sementes de café, essas condições podem fazer com que microrganismos indesejados também se desenvolvam, podendo comprometer a qualidade final da bebida de café.

Estima-se que apenas uma pequena fração dos microrganismos pode ser identificada e caracterizada por meio dos métodos tradicionais como cultivo em placas, devido às condições seletivas e à composição específica dos meios, entretanto, a abordagem independente de cultivo oferece acesso a muitas espécies que ainda não foram previamente cultivadas ou catalogadas (TORSVIK, *et al.*, 2002; SCHLOSS, *et al.*, 2004). Neste contexto, metodologias alternativas para investigar a diversidade microbiana que não se apoiam na cultura *in vitro*, mas sim na extração e sequenciamento de DNA de comunidades microbianas completas foram desenvolvidas.

Uma das metodologias alternativas é o sequenciamento de nova geração, e por meio da abordagem de *metabarcoding*, é possível a identificação automatizada de múltiplas espécies a partir de uma única amostra ambiental contendo DNA, como solo, água, fruto ou fezes (TABERLET, *et al.*, 2012). Essa técnica utiliza o chamado "código de barras de DNA", que é uma região conservada do DNA entre os domínios, curta e pequenas regiões altamente variáveis, para identificar diferentes microrganismos (FAJARNINGSIH, 2016). Assim, a identificação de comunidades de microrganismos diversos em amostras ambientais por meio

de sequenciamento depende da utilização de sequências taxonômicas distintivas de alta qualidade. Essas sequências devem ser abrangentes o bastante para cobrir um amplo grupo de táxons, ao mesmo tempo em que devem gerar amplicons suficientemente variáveis para distinguir eficientemente entre as espécies presentes na amostra. (OP DE BEECK, *et al.* 2014).

Exemplos já bem difundidos de genes alvo para a caracterização taxonômica são os genes ITS "*Internal transcribed spacer*" e 16S rRNA. O gene ITS, presente no RNA ribossômico (rRNA) é composto pelas regiões ITS1, 5,8S e ITS2 e é uma região não codificante altamente polimórfica com comprimento médio de 600 pb e se trata de um conhecido marcador para caracterizar em nível de espécie fungos e oomicetos (FAJARNINGSIH, 2016; OP DE BEECK, *et al.* 2014). Já o gene 16S, é um gene presente na região codificadora do RNA ribossomal, e contém nove regiões que vão de V1 até V9 que demonstram considerável diversidade de sequências entre diferentes linhagens e espécies de bactérias (CHAKRAVORTY, *et al.* 2007). A sua principal característica é que este gene está presente em todas as bactérias e apresenta extrema conservação da sequência ao longo das gerações, portanto, é um alvo universal para identificação bacteriana (TRINGE & HUNGEHOLTZ, 2008; PATEL, 2001).

Desde a introdução dos primeiros métodos práticos de sequenciamento de DNA nos anos 70 por Frederick Sanger, houve um rápido aprimoramento na tecnologia, atualmente existem diversas plataformas que utilizam diferentes tecnologias de sequenciamento. Uma das mais utilizadas para a análise de microbiota é o sequenciamento de nova geração (NGS), que diferentemente do método desenvolvido por Sanger se baseiam no sequenciamento de milhões de pequenos fragmentos de DNA em paralelo (NELSON, *et al.* 2017; BEHJATI & PARTEY, 2013). Desta maneira o NGS ficou conhecido como o método “massivamente paralelo”, que tinha capacidade de gerar dados robustos do sequenciamento na ordem de milhares a bilhões de sequências simultaneamente (MCCOMBIE, *et al.* 2019). Existem diferentes tipos de NGS como é o caso da tecnologia “Illumina”, que imobiliza fragmentos de DNA em uma superfície em um sequenciamento *paired-end* (PE) que envolve sequenciar ambas as extremidades dos fragmentos do gene analisado em *forward* e *reverse*, e em seguida, realiza amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase) em superfície sólida, com nucleotídeos fluorescentes resultando em pequenos agrupamentos de fragmentos de DNA idênticos (THOMAS, *et al.* 2012). A interpretação biológica desse grande volume de dados gerado, requer análises computacionais sofisticadas, como montagem de sequências, agrupamento taxonômico e elaboração de perfis taxonômicos (SCZYRBA, *et al.*, 2017).

O arquivo gerado no sequenciamento (*read*) é do formato “.fastQ”, que é uma extensão do formato “.FASTA”, comumente utilizado para armazenar sequências de nucleotídeos em formato de texto. Esse formato amplia as funcionalidades do tradicional formato FASTA, ao possibilitar a inclusão de um fator de qualidade numérica associada a cada caractere na sequência, denominado *Phred score* (Q) (COCK, *et al.* 2010). Este parâmetro de qualidade varia de 0 a 40, onde quanto mais próximo de 40 estiver o Q do nucleotídeo, maior será a confiabilidade do nucleotídeo e menor a chance de ocorrer inserções errôneas (*mismatches*) (BOKULICH, *et al.* 2012).

O processo ideal de análise dos dados de sequenciamento começa com o pré-tratamento dos dados brutos e o controle de qualidade das leituras geradas (FADIJI, *et al.* 2020). Inicialmente, as leituras brutas são agrupadas de acordo com o código de barras característico e tem seus primers removidos.

A partir disso, os dados podem ser agrupados e mesclados para obter sequências representativas, aqui chamadas de *amplicon*, com a remoção da sequência de código de barras e os primers, nesse processo também podem ser removidos os amplicons de baixa qualidade gerados (LIU, *et al.* 2021). Com isso, duas principais abordagens para seleção das sequências representativa de alta qualidade pode ser usadas, são elas o agrupamento para a formação das unidades taxonômicas operacionais OTUs, que são sequencias com similaridade acima de um determinado limite, geralmente definido como 97% (CHIARELLO, *et al.* 2022), ou a remoção de ruído para *amplicon sequence variants* (ASVs), que tem um limite de similaridade acima 99% em comparação com as OTUs, para isso existem vários algoritmos de remoção de ruído e bancos de dados que podem ser usados para remover o erro associado, um ASV só pode ser formado quando a sequência da amostra é comparada com uma sequência de referência presente em um banco de dados (CALAHAN. *et al.* 2016; LIU *et al.* 2021; WILDING, *et al.* 2023). Por fim, é possível obter uma tabela de recursos quantificando a frequência de cada recurso (OTU ou ASV) em todas as amostras. Além disso, as sequências podem ser categorizadas a diferentes níveis taxonômicos ou até mesmo linhagem, permitindo uma visão mais abrangente da composição da microbiota (LIU, *et al.* 2021).

Diversos índices de diversidade realçam a variedade ou uniformidade das espécies em diferentes graus. O principal objetivo desses índices é oferecer uma medida quantitativa da diversidade biológica, permitindo comparações entre diferentes entidades biológicas ao longo do tempo ou em diferentes locais (CLARKE, *et al.* 2001; ORTIZ-BURGOS, 2016).

Dois principais parâmetros são aplicados para isso: Diversidade alfa (α) e diversidade beta (β). A diversidade alfa reflete a diversidade microbiana específica de cada amostra, incluindo a medição da riqueza (número de espécies) e da abundância (número de indivíduos por espécie) (LIU, *et al.* 2021). O índice de *Richness* é um dos principais índices usados para análises de diversidade alfa e se baseia na medição total do número de diferentes microrganismos em uma amostra, contudo, as estimativas de riqueza são sensíveis às proporções das espécies na comunidade amostrada (ROSWELL, *et al.* 2021). Seguido pelo índice de Shannon, amplamente empregado na comparação da diversidade de diferentes habitats. O índice de Shannon reflete a diversidade e mede a incerteza sobre a identidade das espécies na amostra, assumindo que os indivíduos são amostrados aleatoriamente de uma grande população e que todas as espécies estão representadas na amostra, obtendo uma estimativa quantitativa da variabilidade e da equidade biológica presente na amostra (ORTIZ-BURGOS, 2016).

A diversidade beta (β) mede a dissimilaridade entre as amostras (BOKULICH, *et al.* 2012; WEI, *et al.* 2016). A análise da diversidade beta ocorre após a ordenação dos dados de acordo com a diversidade alfa. Para essa análise, é comum utilizar matrizes para ordenar a distância entre as leituras, como a análise de coordenadas principais (PCoA), visando obter representações visuais (WEI, *et al.* 2016; LIU, *et al.* 2020). As disparidades na diversidade podem ser avaliadas por meio do método estatístico da análise de variância (ANOVA) e análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA), conforme abordado por WEI, *et al.* (2016).

Nos últimos anos, tem sido observado um notável aumento no consumo global de café, evidenciando uma crescente demanda por essa bebida estimulante e culturalmente significativa em diversas regiões do mundo. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), estima-se que o consumo global de café atingirá a marca de 169,5 milhões de sacas para o ano de 2024. Diante desse contexto, os objetivos deste estudo visam explorar mais profundamente a interação entre a microbiota e o café, com foco em identificar os principais microrganismos presentes no campo, compreender suas funções e impactos no desenvolvimento das plantas e na qualidade final do produto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar e caracterizar a microbiota presente e atuante durante a etapa de cultivo do café das variedades Paraíso e Catuaí na região do Alto Paranaíba, utilizando métodos moleculares independentes de cultivo e análises de bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair o DNA das amostras de solo e fruto e enviar para sequenciamento;
- Agrupar as sequências de DNA do microbioma do solo e fruto de duas variedades de café presentes em dois campos experimentais em *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) por meio do *Software R* utilizando o pacote DADA2.
- Classificar taxonomicamente as ASVs utilizando o banco de dados Silva versão 138 para bactérias e UNITE para fungos.
- Identificar e caracterizar os principais gêneros de bactérias e fungos presentes na microbiota do solo e fruto café.
- Analisar e interpretar os resultados com base nos principais gêneros microbianos identificados, comparando a microbiota entre diferentes tipos de amostra (solo e fruto), entre as variedades (Paraíso e Catuaí) e entre diferentes locais (Patrocínio e São Gotardo).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 4 amostras de solo e 4 amostras de frutos, em triplicata, das variedades Paraíso e Catuaí para a análise da diversidade microbiana, essas amostras foram coletadas nos municípios de Patrocínio e São Gotardo, ambos no estado de Minas Gerais, Brasil. Em Patrocínio, a coleta ocorreu na Fazenda EPAMIG (Latitude: 19°28'04.3"S; Longitude: 46°17'31.5"W), enquanto em São Gotardo, a coleta ocorreu na Fazenda Shimada (Latitude: 18°59'47.0"S; Longitude: 46°59'02.0"W), ambos são campos experimentais da EPAMIG. As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de uma pá de jardinagem e transferidas para um saco plástico estéril. Foram coletadas amostras em triplicata biológica, cada réplica foi formada por 9 subamostras, provenientes de três plantas próximas (3 subamostras de cada planta, aproximadamente 100 g cada), coletadas na profundidade de 0 a

20 cm. Ao final da coleta das 9 subamostras, elas foram homogeneizadas e 200 g da amostra composta foram transferido para um novo saco plástico estéril. Esse procedimento foi realizado em três áreas diferentes (sítios de coleta) escolhidos randomicamente dentro do mesmo talhão (réplica biológica), e a cada troca de sítio de coleta o aparato de amostragem foi esterilizado com álcool 70%. Os frutos foram coletados dos pés de café que o solo também foi padronizando 10 frutos por pé, totalizando 30 frutos por replicata biológica. Os solos e frutos coletados foram acondicionadas e transportados no gelo até o laboratório onde foram congelados (-20°C) para análises futuras.

3.1 Extração do DNA

O DNA das amostras de solo foi extraído utilizando o kit de extração e purificação da QIAGEN – *DNeasy Power Soil Pro*, conforme as orientações do fabricante. Já para o fruto do café, foi necessário a adaptação do protocolo do kit de extração de solo, devido a não disponibilidade de um kit de extração próprio para café. Para o café foi utilizada uma quantidade de 5 frutos de café por amostra. Os frutos foram cortados em pedaços menores com o auxílio de um bisturi estéril, e depois macerados com nitrogênio líquido, esta técnica permite que a amostra se torne facilmente quebradiça e preserva o material genético do calor gerado durante fricção, a fim de se obter uma amostra particulada que será utilizada no kit (BURDEN, 2012).

Foram utilizadas 4 amostras de solo e 4 amostras de frutos, em triplicata, totalizando 24 extrações ao todo (12 de solo e fruto). O DNA extraído teve sua qualidade analisada em duas frentes, utilizando eletroforese em gel de agarose horizontal, para verificar possíveis degradações do mesmo durante o processo de extração. Com visualização das amostras sob luz ultravioleta no transiluminador. Em seguida foi atestada a eficiência da extração através da quantificação do DNA, utilizando medidas de absorbância na região do ultravioleta de 260 nm com o aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Fisher.

3.2 Sequenciamento

As amostras de DNA extraídos foram enviadas para sequenciamento parcial dos genes 16s rRNA e ITS, para identificação de bactérias e leveduras, realizado em plataforma Illumina NovaSeq PE250 pela empresa NovoGene America (<https://www.novogene.com/us-en/>),

localizada na cidade de Sacramento, Estado da Califórnia, Estados Unidos da América. Utilizando-se de primers universais para a região V3 e V4 do gene 16S e para a região ITS1 e ITS2 no gene ITS (CHAKRAVORTY, *et al.* 2007; MARTIN, *et al.* 2005). Como foram avaliadas duas regiões de interesse, uma para bactérias e uma para fungos, ao final foram obtidos 48 arquivos de sequenciamento fastQ (24 arquivos para cada gene).

3.3 Softwares e recursos

Para o tratamento e análise dos dados, foi utilizado o programa R, com o suporte da interface RStudio. Essa escolha proporciona um ambiente integrado, flexível e altamente eficiente, que facilita o desenvolvimento e execução de análises estatísticas e a criação de gráficos de forma ágil e precisa, permitindo a adição de funcionalidades por meio de diversos pacotes de extensões disponíveis na CRAN “*Comprehensive R Archive Network*” (R CORE TEAM. 2024).

No RStudio, as análises se iniciaram com o carregamento das principais bibliotecas necessárias para a análise da microbiota utilizando o comando `"library()"`. Estas bibliotecas incluem: *dada2*, *Phyloseq*, *mctoolsr*, *microbiome* e *Vegan*. Além disso, para suportar futuras manipulações, também integraremos as bibliotecas: *Biostrings*, *ggplot2*, *Knitr*, *Magrittr*, *readxl*, *dplyr* e *pairwiseAdonis*. Com recursos específicos que complementam as funcionalidades das bibliotecas principais, fornecendo funções projetadas para facilitar a manipulação dos *dataframes* de forma prática e eficiente.

3.4 Tratamento dos dados

Para uma análise preliminar inicial dos dados brutos, foi necessário delimitar o diretório de trabalho onde estavam localizados os arquivos de sequenciamento, já descompactados, e organizados de maneira ordenada, a fim de facilitar as avaliações. Utilizando o comando `"Sort()"`, os arquivos foram ordenados com base em um padrão comum no nome do arquivo .fastq. No processo de sequenciamento, as leituras foram geradas e identificadas ao final do nome como "_1" e "_2". Essas identificações indicam o sentido do sequenciamento, onde "_1" corresponde ao primer *forward* e "_2" ao primer *reverse*, elucidando a direção da leitura.

Com as amostras devidamente organizadas, o comando “*plotQualityProfile()*” foi utilizado para gerar uma visualização gráfica que nos permite avaliar a qualidade e o ruído associado a cada sequenciamento. Esse gráfico é fundamentado no Phred score de cada nucleotídeo da sequência. Para a filtragem, foi estabelecido um valor de $Q > 20$, para filtrar os *mismatches* presentes em cada leitura, com o auxílio do comando “*FilterAndTrim()*”, as regiões que serão truncadas da sequência, isso é, as sequência que não satisfaçam o valor mínimo de Q, serão removidas, com isso esses erros serão detectados e tratados de maneira a gerar uma leitura mais fidedigna as sequencias biológicas verdadeiras. (CALAHAN, *et al.* 2016)

Logo após, utilizando o comando “*learnErrors()*”, foram estimados os erros de sequenciamento, visando detectar e corrigir imprecisões nos ASVs e com o comando “*plotErrors()*”, pode-se averiguar a estimativa da frequência do erro associado a cada nucleotídeo (NARAYAN, *et al.* 2020). Após a conclusão desse processo de aprendizagem dos erros, um algoritmo foi utilizado para realizar inferências sobre as amostras. Para isso, foi empregado o comando “*dada()*”, o qual nos permite fazer deduções sobre as amostras com base nos parâmetros do modelo de erro desenvolvido e na composição inferida (CALLAHAN, *et al.* 2016).

Assim, as fitas *forward* e *reverse* foram unidas usando o comando “*mergePairs()*”, o que proporciona sequências completas e livres de ruído, representando tanto as leituras diretas quanto seus complementos reversos. A partir disso, as sequencias podem ser agrupadas em ASVs com o comando “*makeSequenceTable()*”, gerando uma tabela de recursos contendo as contagens e a frequência de cada ASV em cada uma das amostras, para posterior análise de taxonomia. (WEI, *et al.* 2016). A presença das chamadas sequenciais quiméricas formadas pela união artificial de partes desconectadas do *amplicon*, também comprometem a qualidade da leitura e, portanto, devem ser removidas usando a função “*removeBimeraDenovo()*” (CHIARELLO, *et al.* 2022)

Torna-se imprescindível recorrer a um banco de dados de referência para a identificação das sequências únicas presentes em cada amostra, visando à sua classificação a diferentes níveis taxonômicos. Com o comando “*assignTaxonomy()*”, as sequências únicas podem ser devidamente alinhadas ao banco de dados Silva versão 138.1 para as ASVs de 16S, enquanto para as ASVs de ITS, foi utilizado o banco de dados UNITE versão 9.0. Além disso, foi aplicado o comando “*addSpecies()*” para obter informações de afiliação a nível de espécie, possibilitando

assim a afiliação taxonômica precisa dos microrganismos em questão (BECKERS, *et al.* 2017; CHIARELLO, *et al.* 2022).

Após a obtenção das matrizes resultantes da afiliação taxonômica, o comando "*phyloseq()*" foi utilizado para gerar um objeto *Phyloseq*, consolidando e organizando os dados. Este objeto engloba as sequências de nucleotídeo fundidas, as ASVs e suas respectivas associações taxonômicas. Em seguida, o comando "*write.table()*" foi empregado para exportar os dados em formato de texto separado por tabulações. Esses arquivos .txt podem ser posteriormente convertidos em .xlsx utilizando o Excel, o que facilita a visualização e manipulação dos dados.

3.5 Análise dos dados

As análises dos dados tratados também foram realizadas no R. Com o comando "*load_taxa_table()*", os arquivos criados anteriormente foram carregados para as próximas análises. Assim, com a função "*plot_diversity()*" foi utilizado para plotar os índices de *richness* e Shannon em um gráfico. Além disso, foi possível empregar o comando "*summarize_taxonomy()*" na variável para agrupar as ASVs de acordo com diversos níveis taxonômicos de nosso interesse. Neste caso, optou-se por realizar o agrupamento nos níveis de filo e gênero. Dessa forma, podemos utilizar as características a serem testadas, que determinamos no arquivo de mapeamento, juntamente com as variáveis de alinhamento taxonômico, para gerar diferentes gráficos que representam as composições de táxons nessas condições. Para produzir gráficos de calor, empregaremos o comando "*plot_ts_heatmap()*", enquanto para gráficos de barras, foi utilizado o comando "*plot_taxa_bars()*".

Utilizando os comandos "*calc_dm()*" e "*calc_ordination()*", uma matriz de dissimilaridade da tabela de táxons foi calculada, a partir do índice de Bray-Curtis, para obtenção das coordenadas das amostras testadas como pontos em um espaço de ordenação específico. Isso permite visualizar esses pontos em gráficos, para auxiliar a compreender a relação entre as diferentes amostras. Para isso, foi empregado o método PCoA (Análise de Coordenadas Principais) para estimar a distância entre as amostras. Em seguida, com o comando "*plot_ordination()*", uma visualização gráfica dos processos anteriormente descritos foi gerada.

Para as análises estatísticas, primeiro foi avaliada a homogeneidade entre as matrizes, calculando os índices de dissimilaridade utilizando “*vegdist()*”. Com “*anova()*”, foi realizado uma análise de variância do modelo gerado. Para comparar a dispersão e a homogeneidade entre os diferentes grupos, o comando “*betadisper()*” foi utilizado, seguido por um teste de Tukey com “*tukeyHSD()*” para comparar as variáveis entre os diferentes grupos. Em seguida, foi aplicado o teste “*adonis2()*” para realizar uma PERMANOVA usando matrizes de distância.

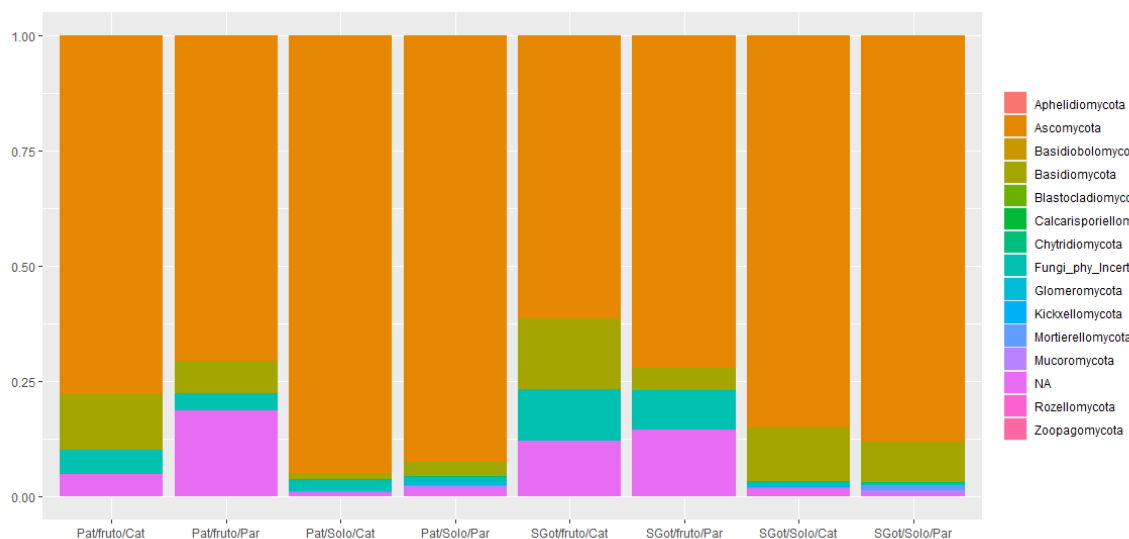
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a conclusão da etapa de processamento dos dados, foram identificados um total de 9554 ASVs para o gene 16S, relacionado a comunidade bacteriana, e 4937 ASVs para o gene ITS, associado a comunidade fúngica. Foi estabelecido um critério de representatividade mínima de 1% em relação à população total do grupo taxonômico, somando-se a população de todas as amostras analisadas, para que os dados fossem incluídos nos gráficos. Grupos que não atendiam a esse critério foram agrupados em uma categoria denominada “Other”. Para determinar as principais populações predominantes nas amostras analisadas, adotou-se como critério que esses grupos que apresentam uma representatividade mínima de pelo menos 10% em relação à população total em termos relativos em ao menos alguma das amostras, conforme evidenciado no mapa de calor. Este critério foi selecionado para enfatizar as espécies ou grupos taxonômicos que exercem uma influência significativa na composição geral da microbiota estudada, permitindo uma análise mais detalhada e relevante das comunidades microbianas presentes.

4.1 Fungos

4.1.1 Filos fúngicos

Figura 1 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos filões de fungos identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: Fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), Variedade de café (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e Tipo de amostra (Solo e Fruta)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais filões de fungos identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra

Sao_Gotardo/Paraíso/Solo	68	8.8	0.1	0.4	0.1	1	0.6	0.3	0.6
Sao_Gotardo/Paraíso/Fruto	72.1	4.9	0	8.5	0	0	0	0	14.5
Sao_Gotardo/Catuaí/Solo	84.9	11.5	0.2	0.7	0.3	0.3	0.1	0.6	1.5
Sao_Gotardo/Catuaí/Fruto	61.5	15.2	0	11.3	0	0	0	0	12
Patrocínio/Paraíso/Solo	92.5	2.9	0.3	0.8	0.8	0.2	0.5	0.2	1.7
Patrocínio/Paraíso/Fruto	70.7	6.9	0	3.8	0	0	0	0	18.6
Patrocínio/Catuaí/Solo	84.8	1.3	0.3	2.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.8
Patrocínio/Catuaí/Fruto	77.9	12	0	5.2	0	0	0	0	4.9
	Ascomycota	Basidiomycota	Chytridiomycota	Fungi_phy_Incertae_sedis	Glomeromycota	Mortierellomycota	Mucoromycota	Other	NA

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com a Figura 2, o grupo "*Incertae sedis*" representou 11,3% da população total nas amostras de fruto da variedade Catuaí colhida em São Gotardo. A expressão "*Incertae sedis*", é proveniente do latim e significa "assento incerto", e é comumente encontrada em diferentes níveis da hierarquia taxonômica. Ela é utilizada para designar espécies ou grupos que

têm uma posição ainda incerta na classificação taxonômica, ou seja, indivíduos cujo táxons ainda não foram corretamente definidos (REDELINGS, *et al.* 2019)

Também observamos a presença significativa de ASVs com filós ainda não identificados, representados pela sigla "NA". Essas sequências ainda não foram identificadas e, portanto, são agrupadas nesse conjunto, embora sejam de origens distintas. Com exceção das amostras de fruto da variedade Catuaí colhida em Patrocínio e de todas as amostras de solo, o grupo "NA" representou mais de 10% da população total nas amostras de frutos. Isso indica que, apesar da conhecida maior diversidade microbiana no solo, a nível de filo, a maior parte dos organismos não identificados nas nossas amostras estava presente no fruto.

4.1.1.1 *Ascomycota*

Em todas as amostras, o filo mais abundante foi o dos ascomicetos, representando mais de 60% da população total em cada uma delas. Em particular, nas amostras de solo de Patrocínio, essa representação chegou a 90%. O filo *Ascomycota* representa um dos principais grupos de fungos existentes na natureza. Morfologicamente caracterizado pela produção de um corpo frutífero distintivo, conhecido como ascoma, que contém os esporos (PRIETO, *et al.* 2013). Em termos de diversidade de espécies, o filo *Ascomycota* é o maior entre os fungos. Sua presença é praticamente ubíqua, podendo ser encontrada tanto em habitats terrestres quanto aquáticos. Devido ao seu meio de reprodução, esses fungos têm a capacidade de se propagar por uma variedade de meios e de se adaptar a diversos modos de vida, incluindo o parasitismo oportunista, o que torna esses organismos também importantes agentes patogênicos em diferentes condições, tanto para animais como para plantas (MAHARACHCHIKUMBURA, *et al.* 2021). Assim, constatamos que o filo *Ascomycota* está amplamente presente e representado nas diferentes amostras de ITS, tanto em amostras de solo quanto de fruto, bem como entre diferentes fazendas e variedades.

4.1.1.2 *Basidiomycota*

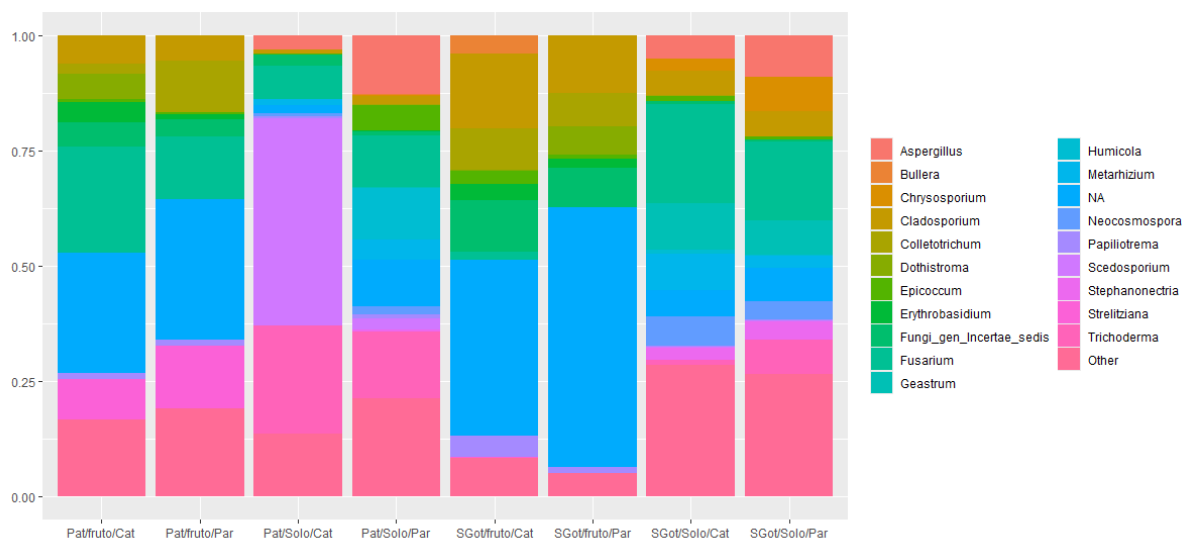
Outro filo que se mostrou consideravelmente presente é o filo *Basidiomycota*, que se destaca como o segundo filo de fungos mais rico em espécies, com mais de 40.000 espécies já descritas (HE *et al.*, 2022). Entre os diferentes clados presentes em sua linhagem, os

basidiomicetos apresentam distribuições ambientais distintas, podendo estar presente em estado saprófitos, realizando o papel de degradadores de matéria orgânica, em relação simbiótica na rizosfera de plantas ou até como parasitas facultativos (NARANJO-ORTIZ, *et al.* 2019b; HE, *et al.* 2022) A principal característica do grupo é, assim como os ascomicetos, a produção de células reprodutoras chamadas basídios, que geralmente produzem quatro esporos sexuais (NARANJO-ORTIZ, *et al.* 2019b).

Junto, ambos os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, formam o sub-reino *Dikarya*, seus membros são marcados por um ciclo reprodutivo que inclui fusão de hifas segmentadas, produzindo células binucleadas durante o processo, além de apresentarem ergosterol na estrutura da membrana (NARANJO-ORTIZ, *et al.* 2019; HE, *et al.* 2022).

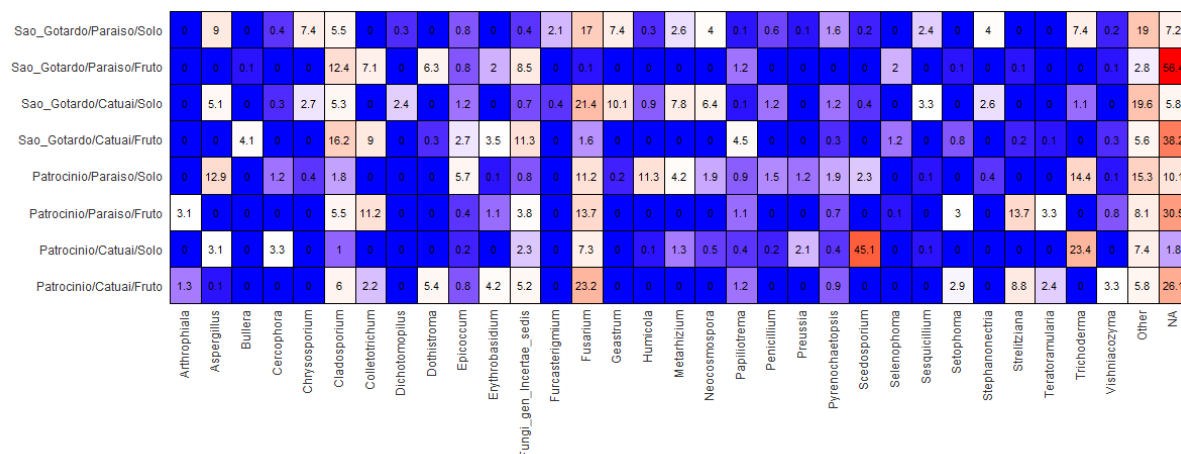
4.1.2 Gêneros fúngicos

Figura 3 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos gêneros de fungos identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: Fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), Variedade de café (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e Tipo de amostra (Solo e Fruta)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais gêneros de fungos identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra.



Fonte: elaborado pelo autor

De acordo com a Figura 4, pode-se observar detalhadamente que a representatividade das ASVs ainda não identificadas é significativamente maior do que qualquer um dos grupos de ASVs identificados em frutos. Agrupados como "Other" estão todos os outros diversos ASVs de gêneros distintos que não tiveram representatividade acima de 1% da população total para aparecerem no gráfico. Portanto, esse agrupamento também demonstra uma grande quantidade de ASVs. Isso indica uma maior diversificação de espécies tanto nas amostras de solo de São Gotardo quanto na amostra de solo da variedade Catuaí de Patrocínio. Há exceções apenas nas amostras de solo da variedade Catuaí em Patrocínio, que apresentam como população dominante os fungos do gênero *Scedosporium* (45,1%), seguidos por fungos do gênero *Trichoderma* (23,4%). Na amostra de solo da variedade Catuaí colhida em São Gotardo, a população dominante é do gênero *Fusarium* (21,4%), com baixa presença de fungos ainda não classificados em ambas as amostras.

4.1.2.1 *Fusarium*

O gênero fúngico mais comum identificado nas ASVs foi o *Fusarium*, encontrado em todas as amostras, com uma representação inferior a 10% apenas nas amostras de frutos da região de São Gotardo e na amostra de solo da variedade Catuaí de Patrocínio. Em todas as outras amostras, esse gênero estava presente em mais de 10%, sendo mais abundante nos frutos da variedade Catuaí na região de Patrocínio, representando 23% da população total de ASVs,

seguido pelo solo também da variedade Catuaí de Patrocínio, compondo 21,4% da população total de ASVs.

O gênero *Fusarium* é comumente encontrado no solo e tem uma distribuição global abrangente, estando presente em diversas regiões ao redor do globo. Esses fungos geralmente habitam áreas onde há presença de matéria orgânica, mas também podem ser encontrados associados a raízes, plantas em decomposição, além de ocorrerem no ar, na água e até mesmo parasitando insetos (MANDEEL, 2006; NIKITIN, *et al.* 2023). De acordo com MANDEEL (2006) e NIKITIN, *et al.* (2023), esses fungos colonizam uma variedade ampla e complexa de ambientes, influenciando a função, forma e estrutura dos ecossistemas. A diversidade taxonômica em diferentes áreas é principalmente determinada por fatores climáticos, físico-químicos do solo e tipo de vegetação.

Para *Fusarium* e outros fungos, a sequência de DNA é mais frequentemente usada para diferenciar espécies filogenéticas. As diferenças nas sequências entre as espécies são indicativas do isolamento genético de espécies individuais (MUNKVOLD, *et al.* 2021). Várias espécies dentro deste gênero exibem variações significativas em suas características morfológicas, fisiológicas e ecológicas. Por esse motivo, a análise da sequência de DNA é frequentemente empregada para distinguir entre as espécies, pois as diferenças nas sequências fornecem indicações do isolamento genético entre as espécies individuais (MUNKVOLD, *et al.* 2021; NIKITIN, *et al.* 2023). Os indivíduos não patogênicos desempenham atividades de controle biológico, competindo por recursos e induzindo resistência em espécies patogênicas, o que beneficia a produtividade das plantas (HARMAN, *et al.* 2003). Por outro lado, como patógenos de plantas, eles são responsáveis por problemas como podridão de raízes e caules, murcha vascular e decomposição de frutas, resultando em significativas perdas econômicas (RAMBERSAD, 2020; SERANI, *et al.* 2007). Ainda, as espécies patogênicas costumam figurar entre e os principais produtores de micotoxinas, podendo causar múltiplas doenças em animais e terem efeitos fitotóxicos. (MUNKVOLD, *et al.* 2021; SERANI, *et al.* 2007).

Além de serem capazes de causar traqueomicose no cafeeiro, pesquisas revelaram que várias espécies de *Fusarium* colonizam naturalmente frutos de café em diferentes estágios de maturação (CALDWELL, *et al.*, 2023; SERANI, *et al.*, 2007). Segundo SILVA, *et al.* (2000), a ocorrência desses fungos filamentosos em grãos de café está associada à redução na qualidade da bebida. Já que ele pode causar contaminação por micotoxinas em diferentes etapas da colheita (NIKITIN, *et al.* 2023; SILVA, *et al.* 2000). Portanto a presença desses organismos nas

amostras observadas pode representar uma futura fonte de contaminação e pôr em risco a qualidade do café.

4.1.2.2 *Scedosporium*

Conforme previamente comentado, foi identificado o gênero *Scedosporium* como população predominante em uma das amostras de solo em Patrocínio, representando quase metade da população fúngica identificada nessa amostra. Esse gênero é composto por fungos filamentosos saprófitos geralmente encontrados em solos abundantes em nutrientes e com baixa oxigenação, como pântanos, manguezais e fundos de lagoas (CORTEZ, *et al.* 2008; ROUGERON, *et al.* 2018). As espécies de *Scedosporium* são comumente encontradas em climas temperados e menos frequentemente encontradas nos trópicos e são capazes de tolerar altas concentrações de sal, também há correlações da sua presença e atividade com o aumento da concentração de nitrogênio e a acidificação do solo (ROUGERON, *et al.* 2018; MOUHAJIR, *et al.* 2020)

Além disso, diversas espécies de *Scedosporium* têm sido historicamente associadas a locais fortemente influenciados pela ação humana, sendo possível encontrar espécies desse grupo em esgotos, solos industriais e agrícolas (ROLLIN-PINHEIRO, *et al.* 2020). Com isso bem estabelecido, podemos dizer que a presença destes microrganismos no solo, podem servir como um indicador da qualidade desse solo. De acordo com CORTEZ e seus contribuintes (2008), a recorrente detecção de espécies de *Scedosporium* em solos contaminados e águas poluídas, tornou este gênero em objeto de estudo para a sua aplicação como agente de biorremediação. Foi descoberto sobre a bioquímica metabólica desses fungos, que eles são capazes de degradar compostos alifáticos e aromáticos, normalmente encontrados em locais poluídos (ROLLIN-PINHEIRO, *et al.* 2020).

No entanto, as espécies de *Scedosporium* também são reconhecidas como agentes patogênicos com relevância clínica, estando associadas a uma ampla variedade de doenças em seres humanos, desde infecções superficiais até casos mais invasivos. Os locais mais comuns de infecção fúngica por este gênero incluem seios da face, articulações, olhos e, em casos mais graves, pulmões e o cérebro (CORTEZ, *et al.* 2008). Além disso, a sua parede celular contém moléculas que desempenham papéis cruciais na virulência e patogenicidade, sendo juntamente com o *Aspergillus*, um dos gêneros de fungos mais frequentemente associados à colonização

fúngica em pacientes com fibrose cística (ROLLIN-PINHEIRO, *et al.*, 2020). Adicionalmente, várias infecções locais relacionadas a acidentes, como micetoma subcutâneo, infecções ósseas e articulares, ou ceratite, são causadas pela inoculação traumática de certos elementos fúngicos (MOUHAJIR, *et al.*, 2020).

4.1.2.3 *Trichoderma*

Observou-se uma considerável presença de fungos do gênero *Trichoderma* nas amostras de solo da região de Patrocínio, acompanhando a população de *Scedosporium*. Esses microrganismos são fungos esporulados de vida livre e são comumente encontrados na rizosfera em solos agrícolas, sendo um importante componente da micoflora, em alguns casos sendo encontrados também em porções pertencentes a filosfera e podendo serem até mesmo encontrados associados a endosfera, podendo desenvolver-se como organismos endófitos oportunistas (GUZMÁN-GUZMÁN, *et al.* 2018).

Sabe-se que no solo, as espécies do gênero *Trichoderma* competem por nutrientes com outros microrganismos. Ao longo da evolução, desenvolveram-se uma variedade de mecanismos que garantem o sucesso desse gênero nesse cenário, como a produção de uma ampla diversidade de substâncias antibióticas e o micoparasitismo, onde esses indivíduos parasitam outros fungos patogênicos (HARMAN, *et al.* 2003). Uma vez que atingem um fungo competidor, há uma projeção das suas hifas em torno formando uma estrutura similar a um involucro, liberando diferentes enzimas degradadoras da parede celular (GUZMÁN-GUZMÁN, *et al.* 2018). Essa capacidade de associação as raízes das plantas e enquanto compete com microrganismos patogênicos, torna o gênero um importante agente de controle biológico de fungos fitopatogênicos no solo e como produtores de antibióticos para a indústria (DRUZHININA, *et al.* 2006). Sugerindo uma possível competição significativa entre os gêneros *Trichoderma*, *Scedosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Humicola* no solo das amostras coletadas em Patrocínio.

Ademais, estes microrganismos também desenvolveram estratégias benéficas de comunicação interespecies através de compostos químicos, que incluem a secreção de moléculas efetoras e metabólitos secundários que alteram a expressão genica das plantas habitadas, proporcionando melhora de produtividade e indução tolerância aos estresses bióticos e abióticos (GUZMÁN-GUZMÁN, *et al.* 2018; ALFIKY, *et al.* 2021). No que diz respeito ao

crescimento das plantas associadas ao *Trichoderma*, ALFIKY e colaboradores (2021) sugerem que o efeito pode ocorrer tanto de forma direta, por meio da ação das moléculas moduladoras liberadas pelo simbionte, quanto de forma indireta, relacionada à modificação do ambiente ao redor da planta. Essa modificação pode envolver a alteração de parâmetros físico-químicos do solo, resultando em um aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas.

4.1.2.4 *Aspergillus*

Foi observado que o gênero fúngico *Aspergillus* representava 12,9% das ASVs encontradas nas amostras de solo da variedade Paraíso, na região de Patrocínio. Embora também tenham sido encontradas em outras amostras, sua presença não excedeu 10% da população total. Além disso, nas amostras de solo da variedade Paraíso em São Gotardo, *Aspergillus* foi identificado em uma proporção de 9% das ASVs, permanecendo abaixo do limite estabelecido de 10%.

Esse gênero é composto por fungos filamentosos ubíquos, que podem levar diferentes estilos de vida, como: endófitos, saprófitos e fitopatógenos oportunistas. (NJI, *et al.* 2023). Os membros desse grupo estão disseminados em diferentes ecossistemas, numa vasta gama de zonas ambientais e climáticas, crescendo em plantas, matéria orgânica em decomposição, solos e até mesmo ambientes aquáticos (ABDEL-AZEEM, *et al.* 2016; PAULUSSEN, *et al.* 2016). A presença de espécies de *Aspergillus* em diversos ambientes é afetada por vários fatores, tais como o microclima, a disponibilidade de substratos e a atividade de água, além das complexas interações ecológicas com outros organismos presentes nesses locais, favorecendo cepas mais patogênicas devido a desafios ecológicos. (ABDEL-AZEEM, *et al.* 2016; PAULUSSEN, *et al.* 2016; FRISVAD, *et al.* 2015). Há registros de que algumas espécies produzem e secretam uma grande quantidade de enzimas extracelulares que aumentam sua capacidade de utilizar uma ampla variedade de recursos orgânicos, o que pode explicar os diferentes estilos de vida observado dentro desse gênero, como o mutualismo, o parasitismo e o saprofitismo (POWELL, *et al.* 2013). Além disso, os aspergilli produzem esporos que facilmente se espalham pelo ar e são altamente tolerantes ao estresse ambiental.

De acordo com FRISVAD, *et al.* (2015), as espécies de *Aspergillus* têm características sexuais amplamente diferentes, e são quase tão divergentes molecularmente quanto os humanos são dos peixes. Isso fundamenta a falta de características comuns para enquadrar esses

indivíduos na identificação taxonômica, tornando métodos moleculares com um dos principais meio de distinguir as espécies atualmente.

Os aspergilli estão entre os fungos capazes de biossintetizar uma ampla variedade de metabólitos secundários estruturalmente heterogêneos, usando para isso substratos como: aminoácidos, acetil-CoA e malonil-CoA, esses metabólitos são de grande importância industrial e terapêutica, como por exemplo antibióticos (SOLTANI, 2016).

Segundo VADLAPUDI e colaboradores (2017), em uma pesquisa que utilizou diversos bancos de dados para investigar a diversidade de metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, foram identificados 807 metabólitos distintos dentro deste gênero. Além disso, este estudo revelou a produção de 60 micotoxinas diferentes por 35 espécies de *Aspergillus*. Desta maneira, isso coloca o gênero *Aspergillus* como um dos mais importantes, devido a muitas espécies estarem entre os maiores produtores de micotoxinas, estas tendo um sério impacto na saúde humana, animal e vegetal. As principais micotoxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus* incluem: aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxinas, fumonisinas, patulina, gliotoxina e ácido ciclopiazônico (VARGA, *et al.* 2015).

É de conhecimento que espécies produtoras de micotoxinas são contaminantes naturais encontrados em diferentes alimentos, e nos grãos e nas cerejas de café, não é diferente estando expostos à contaminação e consequente colonização por microrganismos durante diferentes fases de desenvolvimento da planta, até colheita, transporte e armazenamento (VIEGAS, *et al.* 2017). Apesar disso, foi observado na Figura 4 que o gênero *Aspergillus* não tinha representatividade significativa nas amostras de fruto, estando concentrados exclusivamente no solo.

4.1.2.5 *Humicola*

Outro grupo que se mostrou presente nas amostras de solo de Patrocínio, representando 11,3% da população total identificada, foi o gênero *Humicola*. Este gênero foi primeiramente relatado por Traaen em 1914, e compreende espécies fúngicas termofílicas conidioforicas, que geralmente possuem esporos pigmentados e de paredes espessas, podendo ser formadas em hifas terminais ou laterais (IBRAHIM, *et al.* 2021; WANG, *et al.* 2019). Devido à sua classificação desafiadora, o principal método utilizado atualmente para diferenciar espécies dentro desse gênero é por meio de métodos moleculares. Isso se deve ao fato de que as espécies

desse gênero não apresentam características específicas que englobem todos os seus membros, além de alguns indivíduos serem morfológicamente muito semelhantes (JIANG, *et al.*, 2016).

A maioria das espécies do gênero *Humicola* são isoladas do solo, embora também possam ser encontradas em locais abundantes em matéria orgânica, como materiais vegetais em decomposição, podendo decompor substratos naturais complexos. (IBRAHIM, *et al.* 2021). Também podem ser isoladas de ambientes de habitação humana como ambientes residenciais e até mesmo em animais domésticos (WANG, *et al.* 2019). Fora que, algumas espécies pertencentes a esse grupo são micoparasitas que colonizam e invadem as estruturas de sobrevivência ou hifas de outras espécies de fungo, podendo também sendo possíveis de serem isoladas em amostras pertencentes a outros gêneros fúngicos (IBRAHIM, *et al.* 2021). Com isso as espécies pertencentes a esse grupo demonstram ser um importante agente de controle biológico em plantas pela sua capacidade de antagonizar outros microrganismos no solo e se apresentam assim como fertilizantes orgânicos em potencial (WANG, *et al.* 2019).

Apesar de tudo, não há uma literatura rica e abrangente descrevendo os principais comportamentos desse gênero em interações no holobionte vegetal. Contudo, o gênero é alvo de interesse farmacêutico devido a sua capacidade de produzir compostos bioativos estruturalmente diversos, como cerebrosídeos, terpenóides, xantonas, xantoquinonas, entre outros compostos. (IBRAHIM, *et al.* 2021).

4.1.2.6 *Strelitziana*

Ainda nas amostras de fruto da região de Patrocínio, foi identificado ASVs do gênero *Strelitziana* em ambas as amostras. Esse gênero fúngico é recém-descoberto, sendo primeiramente descritos em 2006, tendo poucas espécies descritas até o presente momento. Como resultado, há pouca literatura disponível sobre esse gênero, pois é relativamente novo. Isso contribui para uma certa incerteza na classificação filogenética desses indivíduos, bem como nas interações ambientais associadas a este gênero (RANA, *et al.*, 2019).

As características morfológicas ainda não foram totalmente determinadas, entretanto ZHANG e seus colaboradores (2010), fizeram uma breve descrição de algumas características de algumas espécies identificadas, e essas incluem: conídios eretos e solitários, subcilíndricos, de coloração marrom-claros e surgem de micélios aéreos e/ou vegetativos.

4.1.2.7 *Colletotrichum*

Foi identificada o gênero *Colletotrichum* em ambas as amostras de fruto em São Gotardo e uma população significativa (11,2%) na variedade Catuaí em Patrocínio. Este é um amplo gênero de fungos ascomicetos, composto por espécies com diversos estilos de vida. No entanto, ele é predominantemente reconhecido pelas espécies fitopatogênicas endofíticas, apesar de também englobarem indivíduos saprófitos no gênero, que infectam culturas agrônômicas de grande importância, resultando em perdas econômicas significativas em decorrência da redução da produtividade (JAYAWARDENA, *et al.* 2016; SILVA, *et al.* 2020). Muitas das espécies são conhecidas por causar diferentes doenças em várias culturas vegetais ao redor do mundo, como antracnose e ferrugem, para isso usam diferentes estratégias para invadir o tecido do hospedeiro, desde uma fase inicial de crescimento dentro das células até uma fase destrutiva fora das células, formando várias estruturas de infecção especializadas e assim afetando uma ampla variedade de culturas alimentares e ornamentais (PERFECT, *et al.*, 1999). Ademais, a presença de uma ampla variedade de espécies de *Colletotrichum* como parasitas endófitos aumenta a complexidade na compreensão da especificidade do hospedeiro (CANNON, *et al.*, 2012). Sendo relatado por JI e seus colaboradores (2022), a presença e a manifestação da infecção desses fungos em muitas plantas da família *Rosaceae*, variam desde podridão pós-colheita de frutos e mancha foliar a desfolha prematura, além disso a não manifestação em plantas assintomáticas é um dos principais responsáveis pela propagação dessa praga.

4.1.2.8 *Geastrum*

Nas amostras de solo da região de São Gotardo foi identificado fungos do gênero *Geastrum*, tendo uma população relevante na variedade Catuaí (10,1%). Fungos pertencentes a este gênero, já foram descritos em todos os continentes do mundo. Tendo as características físico-químicas do solo como fatores determinantes na diversidade e distribuição das espécies, apresentando capacidade de colonizar uma ampla variedade de ambientes, sendo costumeiramente encontrado em locais ricos em material vegetal em decomposição, como húmus da floresta e pastagens (TRIERVERLER-PEREIRA, *et al.* 2014; SANTANA, *et al.* 2020; WANG, *et al.* 2023). A principal característica morfológica desse grupo é o seu exoperídeo com estrutura em forma similar à de uma estrela, com raios curvados para trás que

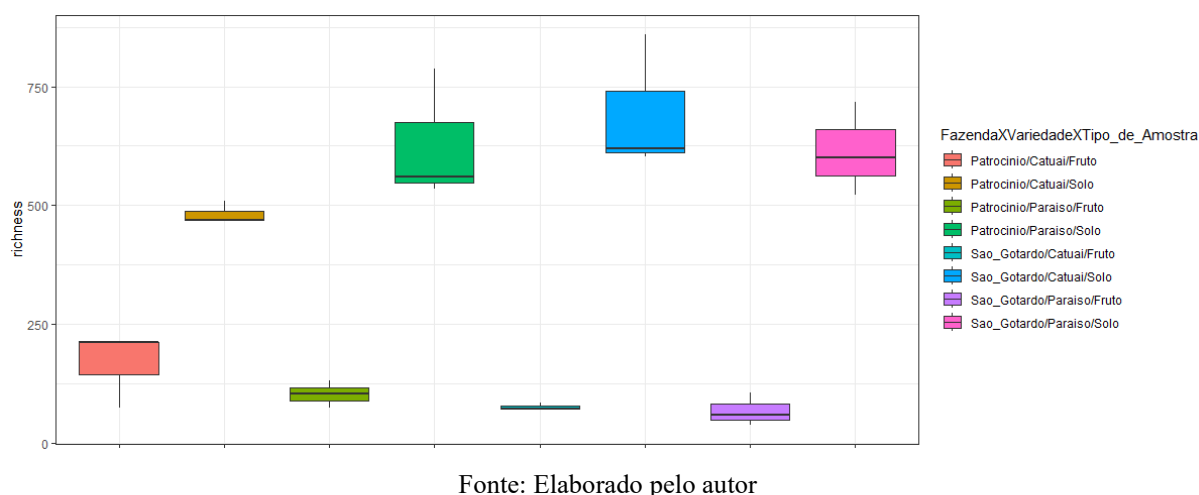
abrem um espaço ao redor do endoperídio (KARUN, *et al.*, 2014). Além de desempenharem um papel na decomposição de matéria orgânica esses indivíduos também são capazes de formar associações micorrízicas benéficas para as plantas, sendo inclusive empregados devido a capacidade de aumentar a absorção de nutrientes pelas raízes no solo (SANTANA, *et al.*, 2020; WANG, *et al.* 2023). De maneira oposta, aos fungos do gênero do *Scedosporium* esses microrganismos podem servir como um bom indicador de qualidade do solo.

4.1.2.9 *Cladosporium*

Identificados em ambas as amostras de fruto de São Gotardo, representando 12,4% da população total para a variedade Paraíso e 16,2% para a variedade Catuaí. As espécies pertencentes ao gênero *Cladosporium* têm uma distribuição global e são encontradas em uma variedade locais, sendo um dos agrupamentos fúngicos mais abundantes no ar e sendo frequentemente isolados de materiais orgânicos (BENSCH, *et al.*, 2012). Certas espécies podem atuar como patógenos em várias culturas, podendo colonizar lesões foliares como invasores secundários, muitas vezes causadas por fungos patogênicos de plantas e, causando uma ampla gama de doenças em plantas de significância econômica, que frequentemente recebem nomes diversos de acordo com os sintomas observados na planta (OGORÉK, *et al.*, 2012; BENSCH, *et al.*, 2012). Essas espécies também são reconhecidas como micoparasitas. Recentemente, PEREIRA, *et al.* (2024) identificaram a presença de diversas espécies de *Cladosporium* em folhas de café infectadas pela ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), evidenciando a atividade parasitária de diferentes microrganismos desse gênero em um dos principais patógenos do café. É importante destacar que a ferrugem é uma das principais ameaças à produção global de café, resultando anualmente em perdas econômicas significativas. Além disso, seu controle representa um desafio considerável para os produtores.

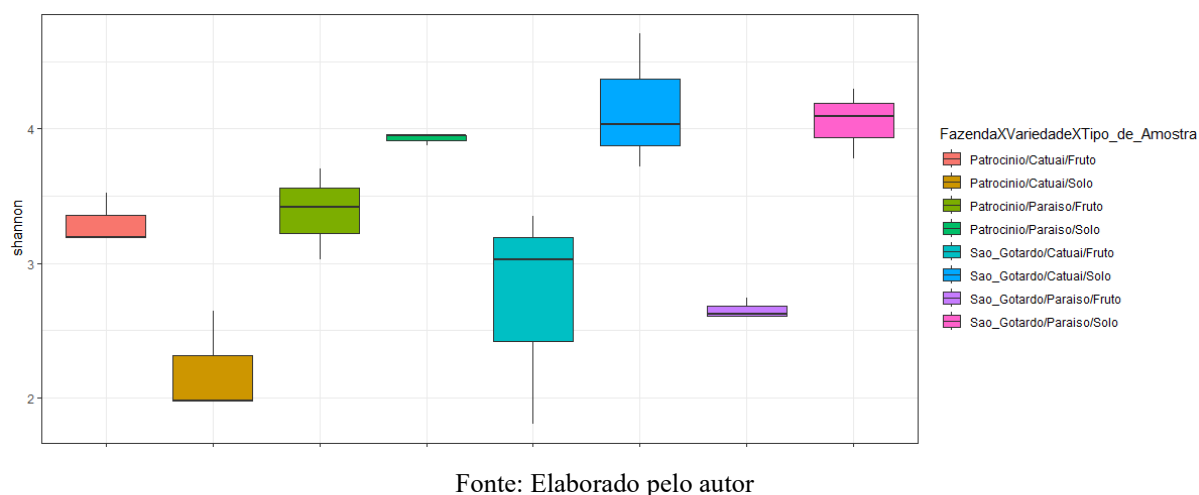
4.1.3 Diversidade alfa de fungos

Figura 5 - Índice de *Richness* para fungos, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra



De acordo com o índice de riqueza (Figura 5), as amostras de solo exibiram um maior número de ASVs, indicando uma maior variedade de espécies em comparação com as amostras de fruto. A amostra que apresentou a maior riqueza de espécies foi a amostra de solo da variedade Catuaí de São Gotardo, com uma média de 694 ASVs por amostra. Por outro lado, a amostra de fruto da variedade Paraíso, também de São Gotardo, demonstrou a menor riqueza. Esses resultados revelam uma tendência em que as amostras de fruto tendem a ter menos de 250 ASVs, enquanto as amostras de solo possuem mais de 400 ASVs, ou seja, possuem maior riqueza de espécies.

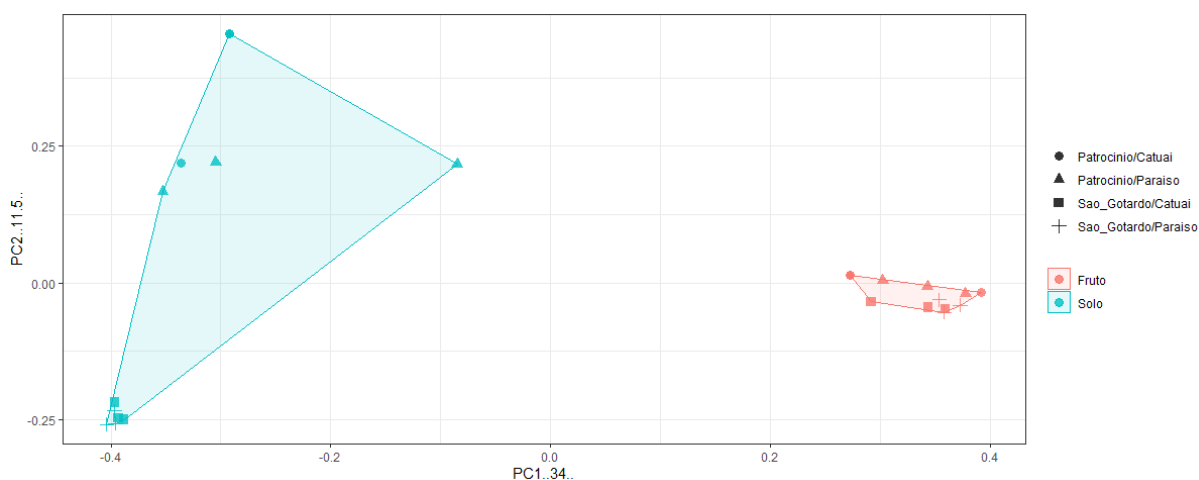
Figura 6 - Índice de Shannon para fungos, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra



Conforme evidenciado pelo índice de Shannon (Figura 6), a média da complexidade do microbioma em ambas as amostras de solo de São Gotardo é superior a 4, indicando uma maior diversidade de espécies e um maior número de espécies raras. A amostra de solo da variedade Paraíso de Patrocínio apresenta um valor médio ligeiramente inferior, em torno de 3,9. Por outro lado, ambas as amostras de fruto de Patrocínio exibem uma diversidade superior a 3, superando até mesmo a amostra de solo da variedade Catuaí. Esses resultados sugerem que a complexidade do microbioma na amostra de solo da variedade Catuaí é relativamente baixa em comparação com as outras amostras de solo. Essa interpretação está alinhada com as observações feitas no mapa de calor (Figura 4), no qual foi constatado que aproximadamente 60% da população fúngica era composta por apenas dois gêneros.

4.1.4 Diversidade beta de fungos

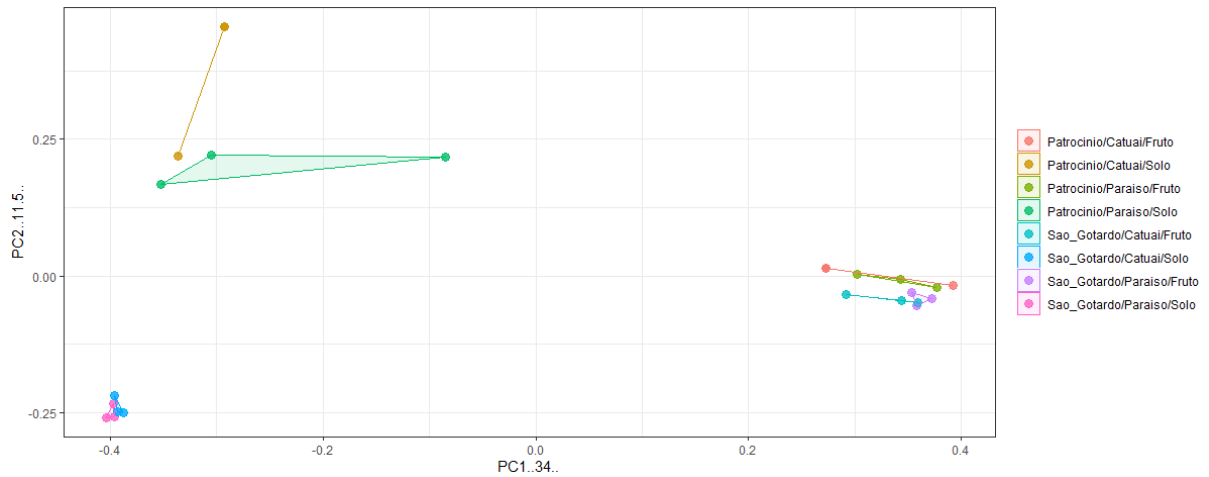
Figura 7 - Gráfico de PCoA (Análise de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para fungos: Comparação entre Solo e Fruto por Fazenda/Variedade de Café



Fonte: Elaborado pelo autor

O teste de PERMANOVA aplicado à nossa matriz de distâncias revelou um valor de $p > 0,05$ ao comparar as categorias de Fazenda/Variedade. No entanto, ao se considerar o tipo de amostra (solo e fruto), obteve-se um valor de $p = 0,001$, indicando uma diferença estatisticamente significativa entre ambos os ambientes. Esses resultados sugerem que a maior disparidade entre os parâmetros testados está relacionada ao tipo de amostra, evidenciando uma distinção estatística na composição fúngica entre os diferentes tipos de amostra.

Figura 8 - Gráfico de PCoA (Análises de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para fungos: Análise Abrangente com comparação entre todos os parâmetros: Tipos de Amostra, Fazenda e Variedade de Café



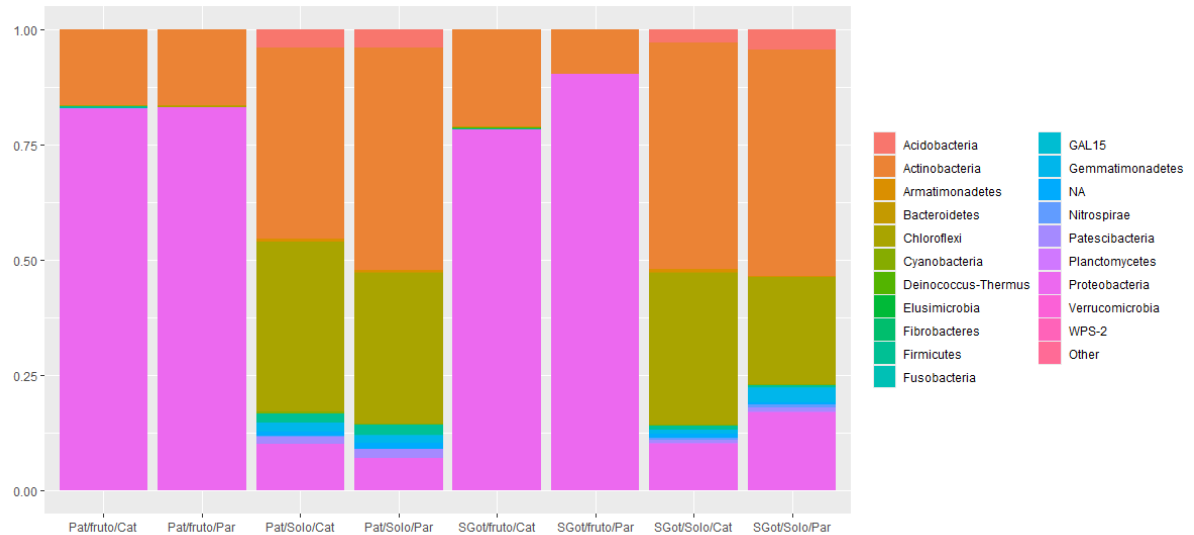
Fonte: Elaborado pelo autor

Na análise da matriz de distância, que compara todas as variáveis testadas (Figura 8), observa-se uma clara distinção entre as diferentes amostras, com as triplicatas agrupadas muito próximas na matriz de distância de PCoA. No entanto, na análise estatística por PERMANOVA, constatou-se que o valor de $p > 0,05$ estava presente em todas as comparações possíveis. Isso sugere que, apesar do claro distanciamento na matriz de dissimilaridade, não há diferença estatisticamente significativa entre amostras específicas quando consideramos todos os parâmetros avaliados.

4.2 Bactérias

4.2.1 Filos bacterianos

Figura 9 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos filos de bactérias identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), variedade (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e tipo de amostra (Solo e Fruta)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais filos de bactérias identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra

Sao_Gotardo/Paraíso/Solo	4.5	48.9	0.3	23.2	0.1	0.6	3.1	0.7	0.9	0.3	16.7	0.3	0.5
Sao_Gotardo/Paraíso/Fruto	0	9.7	0	0	0	0	0	0	0	0	90.3	0	0
Sao_Gotardo/Catuaí/Solo	2.9	49.2	0.7	32.9	0.2	0.8	0.9	0.3	0.8	0.2	10	0.1	1
Sao_Gotardo/Catuaí/Fruto	0.1	21	0.1	0.1	0	0.2	0	0	0	0.1	78.1	0.2	0
Patrocínio/Paraíso/Solo	4.1	48.1	0.6	32.8	0.1	2.2	1.7	0.1	1.9	0.1	7	0.2	1.2
Patrocínio/Paraíso/Fruto	0	16.5	0	0.3	0	0	0	0	0	0.1	83	0.1	0
Patrocínio/Catuaí/Solo	4	41.4	0.8	36.8	0.4	1.9	1.9	0.1	1.6	0	10	0.1	1
Patrocínio/Catuaí/Fruto	0.1	16.4	0	0.2	0	0.3	0	0	0	0.2	82.6	0	0
	Acidobacteria	Actinobacteria	Armatimonadetes	Chloroflexi	Cyanobacteria	Firmicutes	Gemmatimonadetes	Nitrospirae	Patescibacteria	Planctomycetes	Proteobacteria	Other	NA

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com a Figura 10, foram identificados três filos principais acima do limite mínimo estabelecido em qualquer uma das amostras. Nas amostras de fruto, o filo predominante foi o *Proteobacteria*, representando mais de 75% da população em todas as amostras, chegando a 90% na amostra de fruto da variedade Paraíso de São Gotardo. Em seguida, o filo *Actinobacteria* representou mais de 10% da população em quase todas as amostras, exceto

naquela em que as proteobactérias representaram 90%, onde as Actinobactérias ficaram abaixo de 10%. O filo *Chloroflexi* estava subrepresentado nas amostras de fruto, e em nenhuma das amostras chegou a representar ao menos 1% da população.

Para as amostras de solo, os três filos estavam presentes, com *Actinobacteria* e *Chloroflexi* sendo os mais abundantes. Nas amostras de solo, as Actinobactérias representaram mais de 40% da população em todas as amostras, enquanto o *Chloroflexi* teve uma representação acima de 30% em todas as amostras de solo de Patrocínio e na amostra da variedade Catuaí de São Gotardo, representando menos de 30% apenas na amostra da variedade Paraíso de São Gotardo (23,3%). Apesar de serem predominantes nas amostras de fruto, as proteobactérias também tiveram uma representação significativa na microbiota do solo, exceto na amostra de solo de Patrocínio da variedade Paraíso, representando mais de 10% da comunidade em todas as outras amostras de solo.

4.2.1.1 *Proteobacteria*

Dentre todos os filos identificados pelas análises (Figura 12), o mais significativo foi o das proteobactérias, encontrado em todas as amostras. O filo *Proteobacteria* é uma das maiores divisões dentro dos procariontes e é amplamente conhecido como o filo mais ubíquo e predominante nos ambientes naturais, ainda são reconhecidos como o maior filo dentro do domínio das bactérias, sendo também predominantes em locais frequentemente afetado por atividades antrópicas (LEÃO, *et al.* 2022; RIZZATTI, *et al.* 2017; GUPTA, 2000). Entre as amostras avaliadas, as proteobactérias representaram mais de 10% da população total em todas as amostras, com exceção da amostra de solo colhida em Patrocínio da variedade Paraíso, que apresentou uma representação abaixo do limite estabelecido. Destaca-se ainda que essas bactérias foram mais abundantemente encontradas nas amostras de frutos, representando mais de 75% da comunidade total em todas as amostras.

Inicialmente descritos por STACKEBRANDT, *et al.* em 1988, esse filo foi agrupado com base em uma característica comum: sua coloração gram-negativa roxa, resultante da presença de lipopolissacarídeos na membrana externa. Foi proposta a nomenclatura *Proteobacteria* para o grupo, inspirada em Proteus, o deus grego capaz de assumir diversas formas, remetendo assim a uma das principais características desse grupo, sua grande diversidade morfológica. Devido à incerteza do parentesco dos membros e a falta de

características comuns, o “Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática” posteriormente decidiu renomear o filo *Proteobacteria*, e este é atualmente conhecido como *Pseudomonadota*, tendo o seu desígnio anterior utilizado muitas vezes como sinônimo (GUPTA, 2000). Este filo é subdividido em diversos grupos como por exemplo: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gamaproteobacteria*, *Zetaproteobacteria*, entre outros (RIZZATTI, *et al.* 2017). A grande diversidade de características dentro deste filo levou à estabelecimento de suas divisões principalmente por meio da investigação do parentesco molecular entre seus diferentes componentes (RIZZATTI, *et al.* 2017). Com isso, o filo *Pseudomonadota* se destaca por sua complexidade e importância biológica, incluindo diversos patógenos humanos, animais e vegetais, bem como patógenos oportunistas, além de cepas de microrganismos que podem resistir aos tratamentos antibacterianos atualmente disponíveis (LEÃO, *et al.* 2022; GUPTA, 2000).

4.2.1.2 *Actinobacteria*

O filo das actinobactérias destacou-se como o grupo predominante nas amostras de solo, representando mais de 40% da população total identificada em todas as amostras. Além disso, também estão significativamente presentes nas amostras de frutos, ficando apenas atrás do filo das Proteobactérias em termos de abundância. Apenas a amostra de fruto da cultivar Paraíso, de São Gotardo, não atingiu o limite mínimo de 10% de representação da população total.

O filo *Actinobacteria* é um dos maiores e mais antigos filios dentro do domínio de bactérias, o filo é composto principalmente por bactérias gram-positivas com alta constituição de guanina e citosina no material genético, este constitui um dos maiores filios dentro do reino das bactérias (LAWSON, 2018; VERMA, *et al.* 2013; GOHAIN, *et al.* 2020). Seus membros variam de organismos anaeróbicos e unicelulares a linhagens aeróbicas, filamentosas, formadoras de micélio, e formadoras de esporos (LEWIN, *et al.* 2016). Convencionalmente, pensava-se que eram um grupo intermediário de fungos e bactérias, mas posteriormente os taxonomistas os alocaram no domínio das bactérias devido às suas propriedades únicas (GOHAIN, *et al.* 2020).

Entre seus pares é possível encontrar organizações distintas para o material gnômico, tendo a presença de genoma circular em alguns membros e do genoma linear em outros. (VERMA, *et al.* 2013). As actinobactérias demonstram uma vasta diversidade de características

morfológicas, fisiológicas e metabólicas, resultado de sua considerável heterogeneidade genômica (GOHAIN, *et al.* 2020). Por essa razão, o gene 16S tem sido fortemente utilizado para determinar as afiliações taxonômicas e avaliar o grau de proximidade filogenética entre os membros desse grupo (VERMA, *et al.* 2013)

Como microrganismos de vida livre, são abundantes em ambientes de solo, sendo este o habitat com maior diversidade, especialmente aqueles com pH mais elevado, e em ecossistemas marinhos (LEWIN, *et al.* 2016). O faixa de pH ideal para o crescimento de actinobactérias varia de pH 6,0 a pH 9,0 (GOHAIN, *et al.* 2020). Isso reforça a maior presença e distribuição desses organismos em nossas amostras.

Outros fatores físico-químicos, também afetam a diversidade e densidade populacional desses indivíduos em seus habitats, como: temperatura, pH, umidade do solo. Tendo a umidade como um dos fatores mais determinantes para o crescimento de actinobactérias (LEWIN, *et al.* 2016). Adicionalmente, as Actinobactérias estão intimamente ligadas às plantas, tanto na rizosfera quanto como endófitos, sendo mais diversificadas em ambientes tropicais (QIN, *et al.* 2019; LEWIN, *et al.* 2016).

De acordo com LEWIN, *et al.* (2016), as associações mais bem definidas entre plantas e Actinobactérias incluem a relação simbiótica entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas actinorrízicas, facilitando a colonização precoce das plantas durante a sucessão primária. Além disso, há a contribuição das bactérias na inibição de agentes patogênicos por meio da produção de metabólitos secundários, induzindo a supressão desses agentes ao ativar o sistema imunológico das plantas.

4.2.1.3 *Chloroflexi*

O filo *Chloroflexi* é o segundo filo mais abundante nas amostras de solo, representando mais de 20% da população total em todas as amostras. Porém, este filo está sub representado nas nossas amostras de fruto, representando em todas as mostras menos de 1% da população total. Assim, como outros filos bacterianos, os membros desse filo estão amplamente distribuídos e são encontrado em uma variedade de habitats, com uma abundância comparável à do filo *Proteobacteria* (YAMADA, *et al.*, 2009). Embora não possuam as estruturas de membrana típicas do grupo, o filo *Chloroflexi* é geralmente composto por bactérias filamentosas

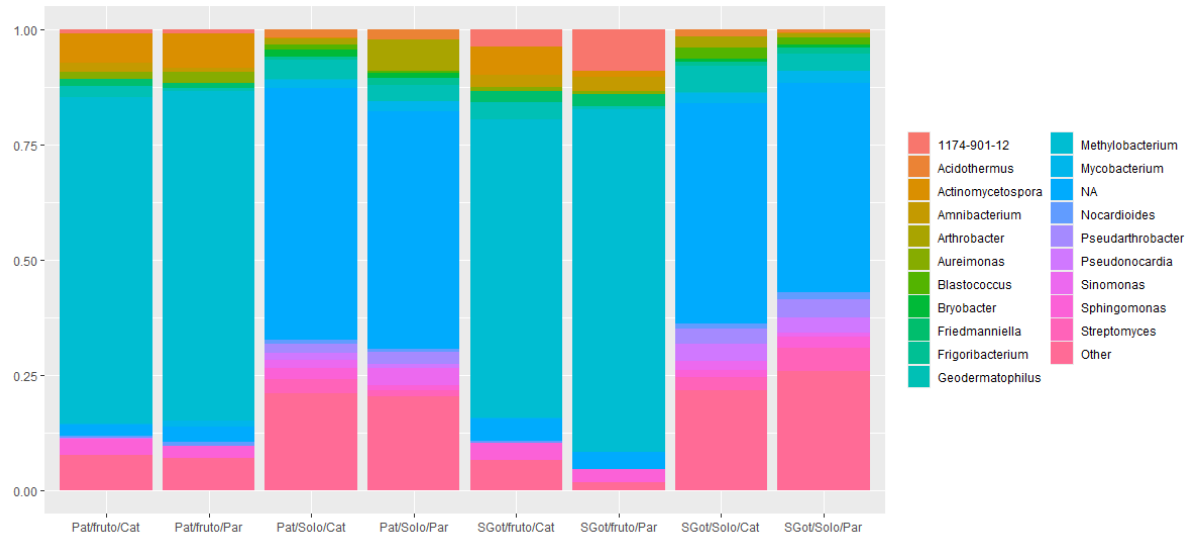
gram-negativas, e possui uma ampla diversidade de morfologias e funções ecológicas (SUTCLIFFE, 2010; SPIERS, *et al.* 2015; WARD, *et al.* 2019).

Os membros desse filo são notavelmente abundantes nos mais diversos ambientes anaeróbicos, além de também habitarem ambientes extremos como fontes termais (WARD, *et al.* 2019; SPEIRS, *et al.* 2015). Ambientes ricos em moléculas inorgânicas, como monóxido de carbono e hidrogênio, provenientes de fontes geotérmicas e atmosféricas, tendem a ser propícios para o crescimento destes indivíduos (ISLAM, *et al.* 2019). O filo *Chloroflexi* se destaca também pela capacidade dos seus membros de apresentarem um metabolismo anaeróbio facultativo versátil, conferindo-lhes uma vantagem competitiva em relação a outros organismos em ambientes extremos (PETREGLIERI, *et al.* 2023). Os *Chloroflexi* que não habitam locais tão extremos são conhecidos por degradar polímeros complexos como carboidratos e aminoácidos (PETRIGLIERI, *et al.* 2023). Os *Chloroflexi* também são encontrados em abundância em ecossistemas anaeróbicos fortemente influenciados pela ação humana (YAMADA, *et al.* 2009).

Segundo WEST-ROBERTS, *et al.* (2021), o filo *Chloroflexi* foi dividido em vários subgrupos com base em estudos de crescimento em meio de cultura, incluindo *Cloroflexia*, *Dehalococcoidia*, *Ktedonobacteria*, *Thermoflexia* entre outros. Apesar de ocuparem o mesmo filo, cada subgrupo apresenta uma particularidade única que os subdividem entre si, e geram vantagens ecológicas distintas, por exemplo: temos redutores de haloalcanos na classe *Dehalococcoidia*, formadores de esporos na classe *Ktedonobacteria*, e fotossintetizantes na classe *Cloroflexia* e termofílicos na classe *Thermoflexia* (WEST-ROBERTS, *et al.* 2021). Isso permite os membros desse grupo ocuparem os mais diversos nichos ecológicos, tornando este um dos mais bem sucedidos grupos bacterianos.

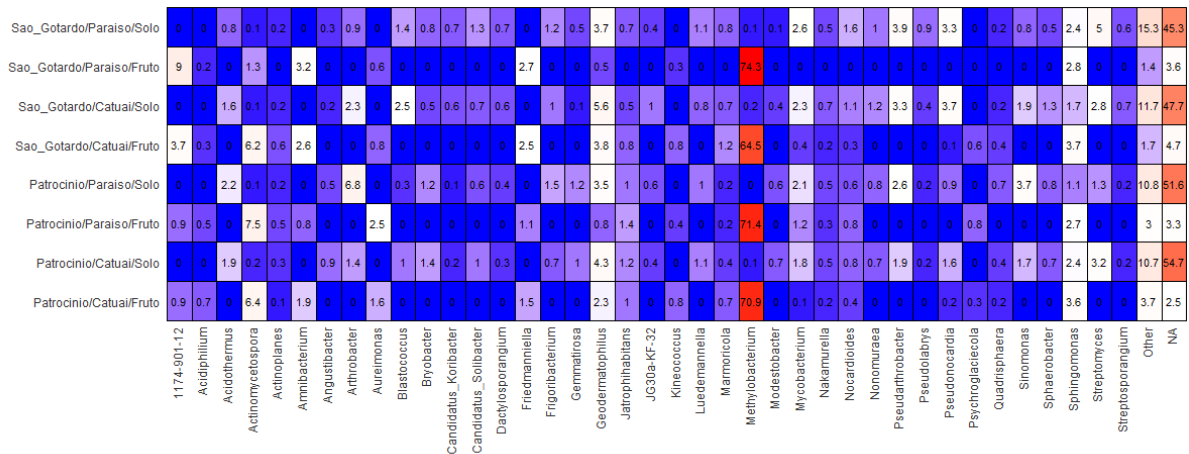
4.2.2 Gêneros bacterianos

Figura 11 - Gráfico de barras que representa a distribuição da abundância relativa dos gêneros de bactérias identificados nas amostras, classificadas de acordo com diferentes parâmetros: Fazenda (Cat – Catuaí; Pat - Patrocínio), Variedade (Par – Paraíso; Sgot - São Gotardo) e Tipo de amostra (Solo e Fruta)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12 - Mapa de calor que apresenta a distribuição dos principais gêneros de bactérias identificados nas amostras em diferentes parâmetros, incluindo: Fazenda, Variedade de café e Tipos de amostra



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.2.1 *Methylobacterium*

O grupo bacteriano mais proeminente em todas as amostras de fruto foi o das metilobactérias, representando mais de 60% da população em cada uma delas. O gênero *Methylobacterium* foi proposto por PATT, *et al.* (1976) e é composto por bactérias Gram-

negativas pertencentes à família *Alphaproteobacteria*. É um gênero de bactérias onipresentes na natureza e são comumente encontrados na atmosfera, no solo e na filosfera (VERDE, *et al.* 2016). Bactérias pertencentes a esse gênero podem crescer de forma heterotrófica, usando compostos orgânicos simples que contenham um ou mais átomos de carbono (PATT, *et al.* 1976). Com isso, a maioria dos membros do gênero *Methylobacterium* são denotados como indivíduos metilotróficos facultativo (ZHANG, *et al.* 2021).

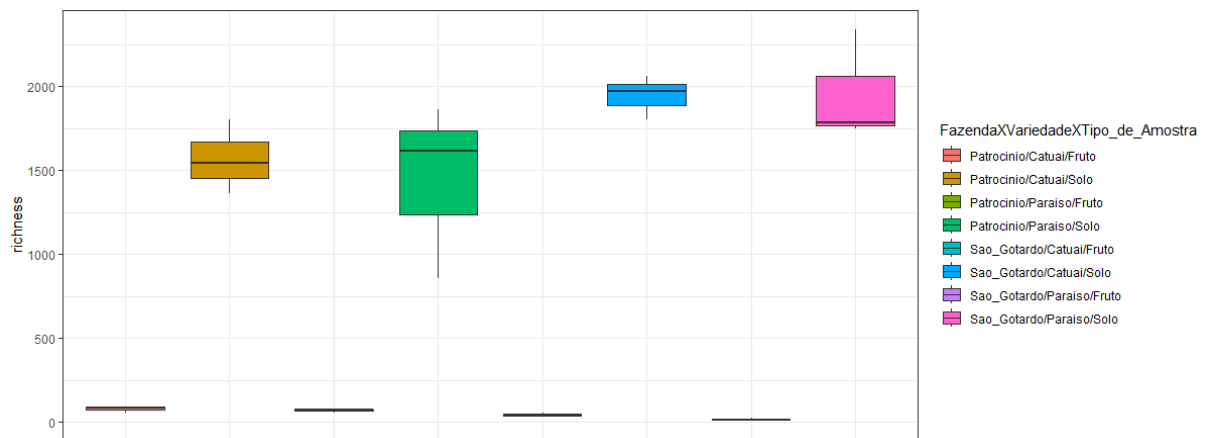
O gênero *Methylobacterium* é um dos principais componentes dos microbiomas vegetais, onde alguns podem produzir substâncias benéficas para as plantas (ZHANG, *et al.* 2021; VERDE, *et al.* 2016). Pode interagir com as plantas de diversas maneiras, estando presente em todas as áreas componentes do holobionte vegetal, tanto na rizosfera, habitando o solo em que a planta se encontra, como na superfície das plantas e endófitos habitando dentro da planta, conforme descrito por ZHANG, *et al.* (2021). De acordo com WELLNER e seus colaboradores (2011), a diversidade e o número de indivíduos do gênero *Methylobacterium* são influenciados principalmente pelas espécies de plantas e pelo ambiente, o que indica uma adaptação de espécies para plantas específicas.

Apesar de existirem na rizosfera, podendo fixar nitrogênio e solubilizar elementos como fósforo e ferro que beneficiam o desenvolvimento vegetal, a diversidade da comunidade *Methylobacterium* no solo é influenciada pelo próprio desenvolvimento das plantas (ZHANG, *et al.* 2021; VERDE, *et al.* 2016). Foi relatado que esses indivíduos preferem habitar a filosfera, sendo atraídos pelo fluxo de compostos carbônicos simples que passam pelos estômatos, o que pode resultar na formação de um biofilme bacteriano que protege a folha contra a exposição direta aos raios solares e o estresse hídrico (ZHANG, *et al.*, 2021). Reforçando assim a predominância populacional desse gênero em nossas amostras de fruto.

Os membros deste gênero são frequentemente encontrados vivendo como endófitos (ARDANOV, *et al.* 2012). Nessa condição, produzem auxinas e citocininas, hormônios vegetais que estimulam a divisão celular ou o alongamento das plantas (KUMAR, *et al.* 2016), resultando no aumento da germinação das sementes, expansão da área foliar, crescimento em altura e número de entrenós (ZHANG, *et al.* 2021). Além disso, contribuem para a resistência das plantas contra vários tipos de estresses bióticos e abióticos, como exposição a metais no solo (ARDANOV, *et al.* 2012). Por fim, existem poucos relatos de doenças em seres humanos causadas por espécies de *Methylobacterium*, sugerindo uma baixa patogenicidade para os humanos (TRUANT, *et al.* 1998).

4.2.3 Diversidade alfa de bactérias

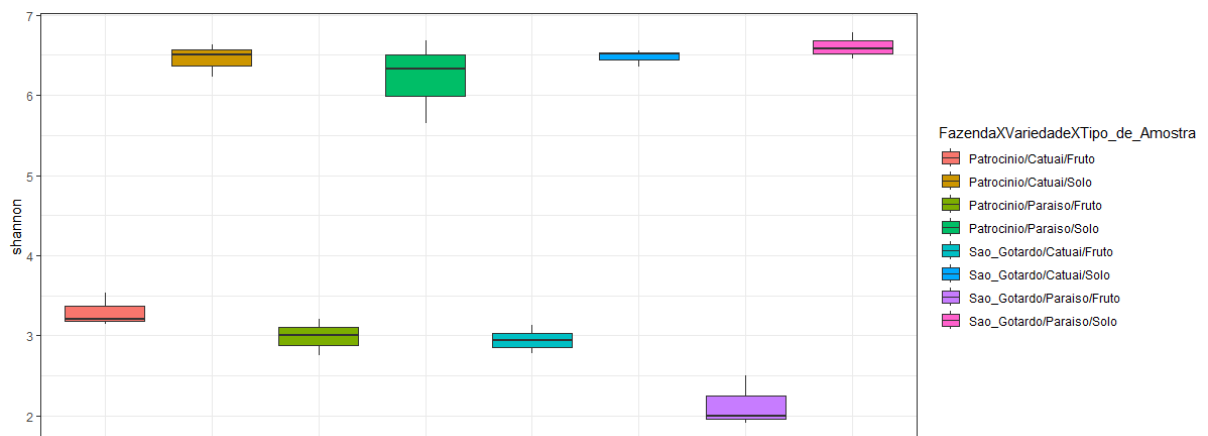
Figura 13 - Índice de *Richness* para bactérias, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra



Fonte: Elaborado pelo autor

Como esperado, a análise taxonômica revelou um número significativamente maior de ASVs associadas ao solo, conforme ilustrado na Figura 13. Conforme destacado por BARUCH, *et al.* (2021), as bactérias assumem um papel central no microbioma do solo, influenciando uma variedade de parâmetros, como diversidade de espécies, interações ecológicas etc. Enquanto as amostras de solo exibiram mais de 1400 ASVs identificadas, as amostras de fruto apresentaram menos de 250 ASVs por amostra. Essa discrepância evidencia a predominância das bactérias no solo em termos de riqueza.

Figura 14 - Índice de Shannon para bactérias, classificado por Fazenda, Variedade de Café e Tipo de Amostra



Fonte: Elaborado pelo autor

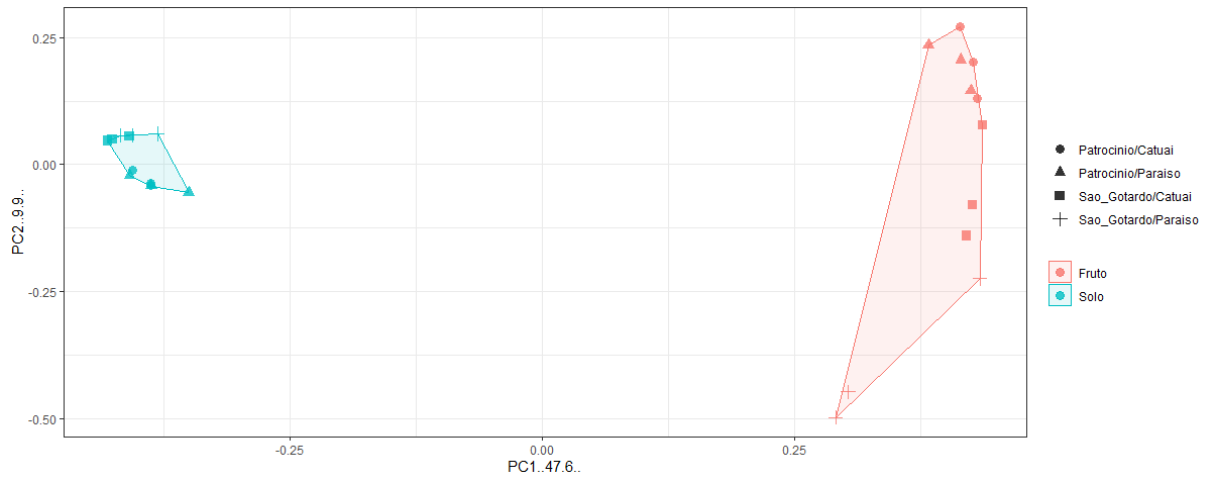
O índice de Shannon (Figura 14) reitera os resultados observados na Figura 13, destacando a complexidade da microbiota bacteriana no solo para ambas as variedades em ambas as fazendas. Todas as amostras de solo analisadas apresentaram um índice de Shannon acima de 6, indicando uma diversidade considerável de espécies. Apesar de conterem menos ASVs em comparação com as amostras de solo, tanto as amostras de fruto de Patrocínio quanto a amostra de fruto da variedade Catuaí de São Gotardo registraram um índice de Shannon acima de 2,5. A amostra da variedade Catuaí de Patrocínio, em particular, registrou o maior índice de Shannon (3,19), enquanto a amostra da variedade Paraíso de São Gotardo apresentou a menor complexidade (2,24), sugerindo uma menor diversidade de espécies. Esse resultado é corroborado pelo mapa de calor de gêneros para bactérias (Figura 12), que revelou apenas dois gêneros representando mais de 80% da população total para essa amostra, indicando uma baixa diversidade e uma alta dominância.

É interessante observar que o mapa de calor (Figura 12), também valida nossos resultados para o solo, onde uma parcela significativa da população é agrupada como "Other", representando diversos gêneros distintos com uma presença inferior a 1% da população, sugerindo a presença de espécies raras nas amostras de solo.

4.2.4 Diversidade beta de bactérias

Assim como observado para os fungos, a ANOVA revelou um valor de $p > 0,05$ para os parâmetros fazenda e variedade. No entanto, para o tipo de amostra, o valor de p observado foi de $1,12 \times 10^{-13}$, indicando uma diferença estatisticamente significativa entre os tipos de amostra para as bactérias. Isso sugere que as populações bacterianas em amostras de solo e fruto são distintas entre si, conforme evidenciado pela análise estatística.

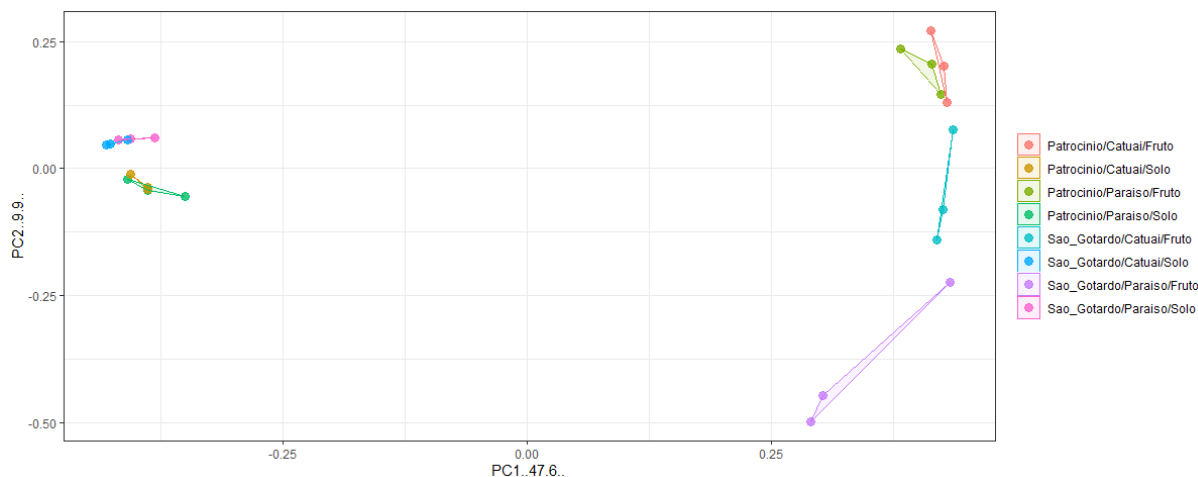
Figura 15 - Gráfico de PCoA (Análise de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para bactérias: Comparação entre Solo e Fruto por Fazenda/Variedade de Café



Fonte: Elaborado pelo autor

Assim como para fungos, o teste de PERMANOVA aplicado à nossa matriz de distâncias revelou um valor de $p > 0,05$ ao compararmos as categorias de Fazenda/Variedade, indicando que não há diferença estatisticamente significativa esses dois parâmetros. No entanto, ao considerarmos o tipo de amostra (solo e fruto), obtivemos um valor de $p = 0,001$, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa em ambos os ambientes, é possível observar essa distinção entre o tipo de amostra na Figura 15. Esses resultados destacam que a maior disparidade entre os parâmetros testados está relacionada ao tipo de amostra, sugerindo uma distinção estatística na composição do microbioma para bactérias entre os diferentes tipos de amostra analisados.

Figura 16 - Gráfico de PCoA (Análises de Coordenadas Principais) da Diversidade Beta para bactérias: Análise Abrangente com comparação entre todos os parâmetros: Tipos de Amostra, Fazenda e Variedade de Café



Fonte: Elaborado pelo autor

Na análise da nossa matriz de distância, que compara todas as variáveis testadas (Figura 8), examinamos a significância estatística das diferenças entre as amostras em relação a uma série de parâmetros por PERMANOVA. Observou-se que o valor de p foi consistentemente maior que 0,05 em todas as comparações possíveis, resultado similar ao encontrado na nossa matriz de distância para fungos. Esse resultado sugere que assim como em fungos, não há diferença estatisticamente significativa entre amostras específicas quando consideramos todos os parâmetros avaliados.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, empregamos marcadores genéticos específicos (16S e ITS) para caracterizar o microbioma presente em amostras de solo e frutos de *C. arabica*, das variedades Paraíso e Catuaí, coletadas em fazendas nas regiões de Patrocínio e São Gotardo, ambas na região do Alto Paranaíba. A utilização de técnicas avançadas de sequenciamento de DNA e ferramentas de bioinformática permitiu-nos explorar microrganismos que não seriam detectáveis por métodos tradicionais de cultivo. Contudo, a falta de taxonomia para a maioria das linhagens não cultivadas limita nossa capacidade de estudar os organismos em níveis taxonômicos mais baixos (PETRIGLIERI, *et al.* 2023). Esta limitação torna-se um desafio ao tentar realizar a identificação em diferentes níveis taxonômicos, especialmente a nível de espécie, devido à escassez de identificadores em bancos de dados atualizados, resultando na

classificação de muitas leituras como "*Incertae sedis*" ou "NA", principalmente para bactérias, onde apenas um gênero foi identificado em grande parte da população.

No que diz respeito ao gene ITS, identificamos nove gêneros fúngicos distintos. Dentre os diversos gêneros, destacam-se aqueles reconhecidos por sua capacidade de produzir uma ampla variedade de compostos metabólicos, tais como micotoxinas e enzimas essenciais para interações mutualísticas e parasíticas. *Aspergillus* e *Fusarium* são exemplos notáveis, os quais são foram identificados predominantemente no solo. A presença de *Fusarium* e *Aspergillus* pode representar uma preocupação, pois as micotoxinas que esses gêneros produzem, podem representar possíveis fontes de contaminação durante processamento e assim comprometer a qualidade final do café. Porém, diferentes espécies dentro desses gêneros podem estabelecer relações benéficas na rizosfera, parasitando insetos, produzindo compostos metabólicos benéficos para as plantas e competindo com diferentes microrganismos no solo. Com isso, não é possível determinar o tipo de relação estabelecida na rizosfera, já que não é possível determinar as espécies presentes nas amostras.

Além disso, identificamos o gênero *Scedosporium* em amostras de solo de Patrocínio, associado historicamente a solos contaminados por atividades humanas, sugerindo uma possível baixa qualidade do solo nessa região. Também encontramos o gênero *Colletotrichum*, causador de diversas doenças em plantas. Embora não haja relatos estabelecendo sua interação com *C. arabica*, sua ampla variedade de espécies e complexidade na interação parasita-hospedeiro sugerem a possibilidade de atividade prejudicial à planta. Por outro lado, identificamos gêneros fúngicos benéficos, como *Trichoderma*, *Geastrum*, *Cladosporium* e *Humicola*, conhecidos por promover o desenvolvimento saudável das plantas, competindo por nutrientes com patógenos e exercendo controle biológico sobre doenças. A fazenda de Patrocínio é um conhecido campo experimental da EPAMIG, então podemos supor que a discrepância observada nos resultados para fungos observados nessa fazenda possa ser atribuído a algum experimento que estava sendo realizado à época em que foi coletada as amostras.

Para o gene 16S, identificamos três filos bacterianos diferentes, com destaque para o gênero *Methylobacterium*, associado ao desenvolvimento vegetal saudável, predominante em amostras de frutos. No entanto, a análise das ASVs em amostras de solo revelou uma predominância de leituras classificadas como "NA", especialmente nos filos *Actinobacteria* e *Chloroflexi*. Por fim, através da análise estatística concluímos que o tipo de amostra foi o parâmetro que apresentou a maior diferença estatística entre as amostras, tanto para bactérias

quanto para fungos, indicando uma clara distinção na composição microbiana entre o solo e os frutos.

REFERÊNCIAS

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Brasília, DF, v.11, n. 1 primeiro levantamento, janeiro 2024

LUCACIU, R., PELIKAN, C., GERNER, S. M., ZIOUTIS, C., KÖSTLBACHER, S., MARX, H., ... RATTEI, T. **A Bioinformatics Guide to Plant Microbiome Analysis**. *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01313>

SCHLOSS, P.D., LARGET, B.R., & HANDELSMAN, J. **Integration of Microbial Ecology and Statistics: a Test To Compare Gene Libraries**. *Applied Environmental Microbiology*, v. p. 70, 5485-5492, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5485-5492.2004>

TORSVIK, V., ØVREÅS, L., and THINGSTAD, T.F. **Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors**. *Science*, v. 296, p. 1064-1066, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1071698>.

SCZYRBA, A., HOFMANN, P., BELMANN, P. *et al.* **Critical Assessment of Metagenome Interpretation—a benchmark of metagenomics software**. *Nat Methods* 14, 1063–1071, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4458>.

BARBOSA J.; MEIRA, F., BORÉM, F., CIRILO, M., MALTA, M., ALVARENGA, A., MARIA, H., ALVES, H. **Coffee Quality and Its Interactions with Environmental Factors in Minas Gerais**. *Journal of Agricultural Science*, 4, 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n5p181>.

SILVEIRA, A. DE S. *et al.* **'Sensory analysis of specialty coffee from different environmental conditions in the region of Matas de Minas, Minas Gerais, Brazil**. *Revista Ceres*, v. 63, n. 4, p. 436–443, jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0034-737X201663040002>

FIGUEIREDO, L. P., BORÉM, F. M., CIRILLO, M. Â., RIBEIRO, F. C., GIOMO, G. S., & Salva, T. D. J. G. **The Potential for High Quality Bourbon Coffees From Different Environments**. *Journal of Agricultural Science*, 5(10), 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5539/jas.v5n10p87>

BEHJATI, Sam; TARPEY, Patrick S. **What is next generation sequencing?**. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, v. 98, n. 6, p. 236-238, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>

NELSON, David L.; LEHNINGER, Albert L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.

OP DE BEECK, Michiel *et al.* Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e97629, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>

BOKULICH, Nicholas A. *et al.* **Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing.** *Nature methods*, v. 10, n. 1, p. 57-59, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>

WEI, Feng; PASSEY, Thomas; XU, Xiangming. **Amplicon-based metabarcoding reveals temporal response of soil microbial community to fumigation-derived products.** *Applied Soil Ecology*, v. 103, p. 83-92, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.009>

CHAKRAVORTY, Soumitesh *et al.* **A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.** *Journal of microbiological methods*, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>

MARTIN, Kendall J.; RYGIEWICZ, Paul T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC microbiology**, v. 5, p. 1-11, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>

CHIARELLO, Marlène *et al.* **Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold.** *PLoS One*, v. 17, n. 2, p. e0264443, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>

CALLAHAN, Benjamin J. *et al.* **DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nature methods*, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

LIU, Yong-Xin *et al.* **A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data.** *Protein & cell*, v. 12, n. 5, p. 315-330, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>

QUAST, Christian *et al.* **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.** *Nucleic acids research*, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

BECKERS, Bram *et al.* **Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees.** *Microbiome*, v. 5, p. 1-17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0241-2>

NARAYAN, Nicole R. *et al.* **Piphillin predicts metagenomic composition and dynamics from DADA2-corrected 16S rDNA sequences.** *BMC genomics*, v. 21, p. 1-12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6427-1>

MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. **phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data**. PloS one, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

ABARENKOV, Kessy; ZIRK, Allan; PIIRMANN, Timo; PÖHÖNEN, Raivo; IVANOV, Filipp; NILSSON, R. Henrik; KÖLJALG, Urmas. **UNITE general FASTA release for Fungi 2**. Version 18.07.2023. UNITE Community, 2023

MCLAREN, Michael R.; CALLAHAN, Benjamin J. **Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2**. Zenodo, 2021.

REDELINGS, Benjamin D.; HOLDER, Mark T. **Taxonomic supertree construction with incertae sedis taxa**. Bioinformatics and Phylogenetics: Seminal Contributions of Bernard Moret, p. 151-173, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-10837-3_7

ROSWELL, Michael; DUSHOFF, Jonathan; WINFREE, Rachael. **A conceptual guide to measuring species diversity**. Oikos, v. 130, n. 3, p. 321-338, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/oik.07202>

CLARKE, K. Robert; WARWICK, R. M. **Change in marine communities**. An approach to statistical analysis and interpretation, v. 2, p. 1-168, 2001.

MAHARACHCHIKUMBURA, Sajeewa SN *et al.* **Integrative approaches for species delimitation in Ascomycota**. Fungal Diversity, v. 109, n. 1, p. 155-179, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00486-6>

PRIETO, Maria *et al.* **Mazaedium evolution in the Ascomycota (Fungi) and the classification of mazaediate groups of formerly unclear relationship**. Cladistics, v. 29, n. 3, p. 296-308, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2012.00429.x>

NARANJO-ORTIZ, Miguel A.; GABALDÓN, Toni. **Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions**. Biological Reviews, v. 94, n. 4, p. 1443-1476, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/brv.12510>

NARANJO-ORTIZ, Miguel A.; GABALDÓN, Toni. **Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi**. Biological Reviews, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/brv.12550>

HE, Mao-Qiang *et al.* **Species diversity of Basidiomycota**. Fungal diversity, v. 114, n. 1, p. 281-325, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00497-3>

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R. DE .; ABREU, M. S. DE .. **Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (Coffea arabica L.)**. Acta Botanica Brasilica, v. 23, n. 4, p. 1129–1132, dez. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000400022>

RAMPERSAD, Sephra N. **Pathogenomics and management of Fusarium diseases in plants**. Pathogens, v. 9, n. 5, p. 340, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050340>

MOUHAJIR, Abdelmounaim *et al.* **Scedosporium species in soils from various biomes in Northwestern Morocco.** Plos one, v. 15, n. 2, p. e0228897, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228897>

ROLLIN-PINHEIRO, Rodrigo *et al.* **Scedosporium cell wall: From carbohydrate-containing structures to host–pathogen interactions.** Mycopathologia, v. 185, n. 6, p. 931-946, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00480-7>

CORTEZ, Karoll J. *et al.* **Infections caused by Scedosporium spp.** Clinical microbiology reviews, v. 21, n. 1, p. 157-197, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.00039-07>

ROUGERON, Amandine *et al.* **Ecology of Scedosporium species: present knowledge and future research.** Mycopathologia, v. 183, p. 185-200, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0200-2>

HARMAN, Gary E. *et al.* **Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts.** Nature reviews microbiology, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>

DRUZHININA, Irina S.; KOPCHINSKIY, Alex G.; KUBICEK, Christian P. **The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data.** Mycoscience, v. 47, n. 2, p. 55-64, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0279-7>

GUZMÁN-GUZMÁN, Paulina *et al.* **Trichoderma species: versatile plant symbionts.** Phytopathology, v. 109, n. 1, p. 6-16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>

ALFIKY, Alsayed; WEISSKOPF, Laure. **Deciphering Trichoderma–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications.** Journal of Fungi, v. 7, n. 1, p. 61, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7010061>

WANG, X. W. *et al.* **Redefining Humicola sensu stricto and related genera in the Chaetomiaceae.** Studies in mycology, v. 93, p. 65-153, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.07.001>

JIANG, YuLan *et al.* **Four new Humicola species from soil in China.** Mycotaxon, v. 131, n. 2, p. 269-275, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5248/131.269>

IBRAHIM, Sabrin RM *et al.* **Natural products of the fungal genus Humicola: Diversity, biological activity, and industrial importance.** Current microbiology, v. 78, n. 7, p. 2488-2509, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02533-6>

ZHANG, Rong *et al.* **Strelitziana africana newly recorded from China.** Mycotaxon, v. 113, n. 1, p. 485-492, 2010.

RANA, Shiwali; SINGH, Sanjay Kumar; SINGH, Paras Nath. **Strelitziana sarbhoyi sp. nov.(Strelitzianaceae, Chaetothyriales), from North-Western Himalayas, India,**

described based on morphology and molecular phylogeny. Phytotaxa, v. 427, n. 1, p. 51–59–51–59, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.427.1.6>

PERFECT, Sarah E. *et al.* **Colletotrichum: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions.** Fungal genetics and Biology, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>

DA SILVA, Leandro Lopes *et al.* **Colletotrichum: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability.** Applied microbiology and biotechnology, v. 104, p. 1891-1904, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>

Jl, Ying *et al.* **Colletotrichum species pathogenic to strawberry: Discovery history, global diversity, prevalence in China, and the host range of top two species.** Phytopathology Research, v. 4, n. 1, p. 42, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00147-9>

WANG, Xin; BAU, Tolgor. **Seven new species of the genus Geastrum (Gastrales, Geastraceae) in China.** Journal of Fungi, v. 9, n. 2, p. 251, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof9020251>

SANTANA, M. D. F. *et al.* **Obtaining monokaryotic and dikaryotic mycelial cultures of two Amazonian strains of Geastrum (Gastraceae, Basidiomycota).** Acta Amazonica, v. 50, n. 1, p. 61–67, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201901341>

KARUN, Namera C.; SRIDHAR, Kandikere R. **Geasters in the Western Ghats and west coast of India.** Acta Mycologica, v. 49, n. 2, 2014.

TRIERVEILER-PEREIRA, Larissa; SANTOS, Paulo JP; BASEIA, Iuri G. **Ecological aspects of epigeous gasteromycetes (Agaricomycetes, Basidiomycota) in four remnants of the Brazilian Atlantic Forest.** fungal ecology, v. 6, n. 6, p. 471-478, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.09.002>

BENSCH, Konstanze *et al.* **The genus cladosporium.** Studies in mycology, v. 72, p. 1-401, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3114/sim0003>

PEREIRA, C. M. *et al.* **Mycodiversity in a micro-habitat: twelve Cladosporium species, including four new taxa, isolated from uredinia of coffee leaf rust, Hemileia vastatrix.** Fungal Systematics and Evolution, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3114/fuse.2024.14.02>

VIEGAS, Carla *et al.* **Fungal contamination in green coffee beans samples: A public health concern.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, v. 80, n. 13-15, p. 719-728, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1286927>

NJI, Queenta Ngum; BABALOLA, Olubukola Oluranti; MWANZA, Mulunda. **Soil Aspergillus Species, Pathogenicity and Control Perspectives.** Journal of Fungi, v. 9, n. 7, p. 766, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof9070766>

- ABDEL-AZEEM, Ahmed M. *et al.* **Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats.** In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Elsevier, 2016. p. 3-28. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00001-4>
- FRISVAD, Jens C.; LARSEN, Thomas O. **Chemodiversity in the genus *Aspergillus*.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, p. 7859-7877, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6839-z>
- VARGA, János *et al.* **Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update.** Acta Biologica Szegediensis, v. 59, n. 2, p. 151-167, 2015. Disponível em: <https://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2878/2870>
- PAULUSSEN, Caroline *et al.* **Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species.** Microbial biotechnology, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>
- MANDEEL, Qaher A. **Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats.** Journal of Basic Microbiology, v. 46, n. 6, p. 480-494, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.200510128>
- SILVA, Cristina F. *et al.* **Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil.** International journal of food microbiology, v. 60, n. 2-3, p. 251-260, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9)
- SERANI, S.; TALIGOOLA, H. K.; HAKIZA, G. J. **An investigation into *Fusarium* spp. associated with coffee and banana plants as potential pathogens of robusta coffee.** African Journal of Ecology, v. 45, p. 91-95, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.2007.00744.x>
- NIKITIN, Dmitry A. *et al.* **Diversity, ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil: a review.** Diversity, v. 15, n. 1, p. 49, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/d15010049>
- CALDWELL, Maylin Y. *et al.* **Coffee fruit rot in Puerto Rico: distribution, ecology and associated fungi.** European Journal of Plant Pathology, p. 1-14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02781-1>
- RAMPERSAD, Sephra N. **Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants.** Pathogens, v. 9, n. 5, p. 340, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050340>
- MUNKVOLD, Gary P.; PROCTOR, Robert H.; MORETTI, Antonio. **Mycotoxin production in *Fusarium* according to contemporary species concepts.** Annual Review of Phytopathology, v. 59, p. 373-402, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-102825>

HAILE, Mesfin *et al.* **The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality**. Journal of Food Quality, v. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>

STACKEBRANDT, Erko; MURRAY, R. G. E.; TRÜPER, H. G. **Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 38, n. 3, p. 321-325, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-38-3-321>

GUPTA, Radhey S. **The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes**. FEMS microbiology reviews, v. 24, n. 4, p. 367-402, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00547.x>

RIZZATTI, G. *et al.* **Proteobacteria: a common factor in human diseases**. BioMed research international, v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>

LEÃO, Inês *et al.* **Pseudomonadota in the oral cavity: a glimpse into the environment-human nexus**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 107, n. 2, p. 517-534, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12333-y>

LAWSON, Paul A. **The phylum actinobacteria**. In: **The Bifidobacteria and Related Organisms**. Academic Press, 2018. p. 1-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00001-6>

VERMA, Mansi *et al.* **Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences**. Research in microbiology, v. 164, n. 7, p. 718-728, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.04.002>

QIN, Sheng *et al.* **Actinobacteria in special and extreme habitats: diversity, function roles and environmental adaptations**. Frontiers in microbiology, v. 10, p. 451595, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00944>

LEWIN, Gina R. *et al.* **Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications**. Annual review of microbiology, v. 70, p. 235-254, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>

GOHAIN, Anwesha *et al.* **Actinobacteria: diversity and biotechnological applications**. Recent advancements in microbial diversity, p. 217-231, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821265-3.00009-8>

PETRIGLIERI, Francesca *et al.* **A comprehensive overview of the Chloroflexota community in wastewater treatment plants worldwide**. Msystems, v. 8, n. 6, p. e00667-23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msystems.00667-23>

WARD, L. M. *et al.* **Genomic Evidence for Phototrophic Oxidation of Small Alkanes in a Member of the Chloroflexi Phylum**. bioRxiv. 2019.

YAMADA, Takeshi; SEKIGUCHI, Yuji. **Cultivation of uncultured chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured chloroflexi subphylum i' with natural and biotechnological relevance.** *Microbes and Environments*, v. 24, n. 3, p. 205-216, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09151S>

SPEIRS, Lachlan BM *et al.* **The phylogeny, biodiversity, and ecology of the Chloroflexi in activated sludge.** *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2015, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02015>

SUTCLIFFE, Iain C. **A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture.** *Trends in microbiology*, v. 18, n. 10, p. 464-470, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.005>

ISLAM, Zahra F. *et al.* **Two Chloroflexi classes independently evolved the ability to persist on atmospheric hydrogen and carbon monoxide.** *The ISME journal*, v. 13, n. 7, p. 1801-1813, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0393-0>

WEST-ROBERTS, Jacob A. *et al.* **The Chloroflexi supergroup is metabolically diverse and representatives have novel genes for non-photosynthesis based CO₂ fixation.** *BioRxiv*, p. 2021.08.23.457424, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.08.23.457424>

PATT, T. E.; COLE, G. C.; HANSON, R. S. **Methylobacterium, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 26, n. 2, p. 226-229, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-26-2-226>

ZHANG, Cong *et al.* **Potentials, utilization, and bioengineering of plant growth-promoting Methylobacterium for sustainable agriculture.** *Sustainability*, v. 13, n. 7, p. 3941, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su13073941>

TRUANT, Allan L. *et al.* **Methylobacterium species: an increasingly important opportunistic pathogen.** *Laboratory Medicine*, v. 29, n. 11, p. 704-710, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/labmed/29.11.704>

WELLNER, S.; LODDERS, N.; KÄMPFER, P. **Diversity and biogeography of selected phyllosphere bacteria with special emphasis on Methylobacterium spp.** *Systematic and applied microbiology*, v. 34, n. 8, p. 621-630, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.08.005>

KUMAR, Manish *et al.* **Methylotrophic bacteria in sustainable agriculture.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2074-8>

ARDANOV, Pavlo *et al.* **Methylobacterium-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack.** *PLOS ONE* 7(10): e46802. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046802>

TABERLET, Pierre *et al.* **Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding.** *Molecular ecology*, v. 21, n. 8, p. 2045-2050, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05470.x>

FAJARNINGSIH, Nurrahmi Dewi. **Internal Transcribed Spacer (ITS) as DNA barcoding to identify fungal species: a review.** *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, v. 11, n. 2, p. 37-44, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.15578/squalen.213>

TRINGE, Susannah G.; HUGENHOLTZ, Philip. **A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene.** *Current opinion in microbiology*, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>

PATEL, Jean Baldus. **16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory.** *Molecular diagnosis*, v. 6, p. 313-321, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03262067>

MCCOMBIE, W. Richard; MCPHERSON, John D.; MARDIS, Elaine R. **Next-generation sequencing technologies.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 9, n. 11, p. a036798, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>

THOMAS, Torsten; GILBERT, Jack; MEYER, Folker. **Metagenomics-a guide from sampling to data analysis.** *Microbial informatics and experimentation*, v. 2, p. 1-12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>

COCK, Peter JA *et al.* **The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants.** *Nucleic acids research*, v. 38, n. 6, p. 1767-1771, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>

FADIJI, Ayomide Emmanuel; BABALOLA, Olubukola Oluranti. **Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: a review.** *Journal of microbiological methods*, v. 170, p. 105860, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860>

ORTIZ-BURGOS, S. **Shannon-Weaver Diversity Index.** In: Kennish, M.J. (eds) *Encyclopedia of Estuaries. Encyclopedia of Earth Sciences Series.* Springer, Dordrecht, 2016. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4_233

BURDEN, David W. **Guide to the disruption of biological samples-2012.** *Random Primers*, v. 12, n. 1, p. 1-25, 2012.

JAYAWARDENA, R. S. *et al.* **Notes on currently accepted species of Colletotrichum.** *Mycosphere*, v. 7, n. 8, p. 1192-1260, 2016.

CANNON, P. F. *et al.* **Colletotrichum: current status and future directions.** *Studies in mycology*, v. 73, n. 1, p. 181-213, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3114%2Fsim0014>

BARUCH, Zdravko *et al.* **Increased plant species richness associates with greater soil bacterial diversity in urban green spaces.** Environmental Research, v. 196, p. 110425, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110425>

SCA. **Protocols & Best Practices.** Specialty Coffee Association, c2024. Disponível em: <https://sca.coffee/research/protocols-best-practices>

POWELL, Keith A.; RENWICK, Annabel; PEBERDY, John F. (Ed.). **The genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application.** Springer Science & Business Media, 2013.

VADLAPUDI, Varahalarao *et al.* **Aspergillus secondary metabolite database, a resource to understand the secondary metabolome of Aspergillus genus.** Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 7325, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07436-w>

SOLTANI, J. **Secondary metabolite diversity of the genus Aspergillus: recent advances.** New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, p. 275-292, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00035-X>