

EFEITOS DE PLANTAS DE COBERTURA NAS ASSOCIAÇÕES DO MILHO (*Zea Mays* L.) COM FUNGOS BENÉFICOS DO SOLO

Régis Josué de Andrade Reis¹, Silvane de Almeida Campos¹, Gustavo Sampaio de Lima Martins¹, Eli Lino de Jesus², Marcos Luiz Rebouças Bastiani², André Narvaes da Rocha Campos^{2,3}

RESUMO – Dentre os desafios dos sistemas agroecológicos de produção, destaca-se o estudo de métodos de cultivo que estimulem a microbiota benéfica do solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das plantas de cobertura nas associações ocorridas entre os fungos micorrízicos e as plantas de milho no plantio subsequente. Realizou-se o plantio do milho AG 1051 (híbrido duplo) sobre a palhada das seguintes plantas de cobertura: mucuna preta (*Mucuna aterrima*), crotalária (*Crotalaria juncea*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e os consórcios entre a gramínea e as leguminosas. Para cada um dos tratamentos foram quantificados os esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo rizosférico, a presença de estruturas fúngicas de FMAs e de fungos endofíticos do tipo *Dark Septated* nas raízes do milho. Observou-se que as plantas de cobertura interferiram na multiplicação dos esporos de FMAs, sendo a utilização do consórcio entre gramíneas e leguminosas mais eficientes. As estruturas fúngicas: hifas, vesículas, arbúsculos e esporos estavam presentes nas raízes do milho cultivado sobre a palha das diferentes plantas de cobertura. Foram destacados os tratamentos sorgo/crotalária e sorgo/mucuna-preta por apresentarem maiores percentagens das estruturas citadas. Os fungos endofíticos do tipo *Dark Septated* estavam presentes nas raízes do milho cultivado sobre a palha dos tratamentos sorgo/crotalária, sorgo/mucuna-preta e crotalária. Este trabalho poderá subsidiar o desenvolvimento de metodologias agroecológicas de cultivo, utilizando as plantas de cobertura para favorecer a interação das plantas com fungos benéficos do solo.

Palavras-chave: Consórcio, *dark septated*, fungos micorrízicos arbusculares, leguminosas.

EFFECT OF COVER CROPS ON MAIZE (*ZEA MAYS* L.) ASSOCIATIONS WITH BENEFICIAL FUNGI OF SOIL

ABSTRACT – One of the most challenging issues of agroecological productions systems is the development of cropping methods that stimulate soil beneficial microorganism. The objective of this work was to evaluate the effect of cover crops in the mycorrhizal associations of maize as a subsequent crop. Maize, double hybrid AG 1051, was cultivated in the straw dead of the following cover crops: velvet bean (*Mucuna pruriens*), sunn (*Crotalaria juncea*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and consortia between grasses and legumes. For each treatment were quantified spores of mycorrhizal fungi (AMF) in rhizosphere soil, the presence of fungal structures AMF and endophytic fungi like *Dark Septated* in the roots of maize. It was observed that cover plants interfere in the multiplication of FMA spores, being the consortia between grasses and legumes more efficient in spore multiplication. Fungal structures, such as: Hyphae, vesicles, arbuscules and spores were present in roots of maize planted on the straw of all cover crops. Treatments sorghum/sunn and sorghum/velvet bean were those with higher percentages. The endophytes *Dark Septated* types are present in roots of maize grown on sorghum/crotalaria and sorghum/velvet bean straw. This work will subsidize the development of agro-ecological farming methods with the use of cover crops to improve the interactions between plants and beneficial fungi of soil.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, consortia, *dark septated*, legumes.

¹ Bacharel em Agroecologia, IF Sudeste MG - Campus Rio Pomba.

² Professor efetivo. Departamento de Agricultura e Ambiente - IF Sudeste MG - Campus Rio Pomba, Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Rio Pomba/MG.

³ Orientador; andre.campos@ifsudestemg.edu.br.



1. INTRODUÇÃO

O estudo de sistemas agroecológicos de produção envolve o desenvolvimento de diversas estratégias de manejo visando o aumento da eficiência na utilização dos recursos naturais e a redução do impacto ambiental (Andreola & Fernandes, 2007). De forma geral, estes sistemas privilegiam práticas que favorecem a cobertura do solo, a utilização de compostos orgânicos, a adubação verde, a rotação de cultura, o incremento no teor de matéria orgânica no solo, o estímulo à macro e microfauna, o policultivo e sistemas integrados de produção (Andreola & Fernandes, 2007).

Neste contexto, surgiram novas alternativas de sustentabilidade como o cultivo de plantas de cobertura sem o preparo físico do solo, mantendo a palha para cultivos posteriores (Gassen & Gassen, 1996). Ainda, o manejo ecológico do solo compreende um conjunto de técnicas integradas que visam melhorar as condições ambientais (água-solo-clima) aproveitando o potencial genético das culturas para a produção (Primavesi, 1990).

As plantas de cobertura podem apresentar benefícios aos agroecossistemas como: acúmulo de matéria orgânica na superfície do solo, reciclagem de nutrientes e aporte de nitrogênio (N) por meio da fixação biológica em leguminosas, melhoria dos atributos químicos, físicos e biológicos do solo, maior retenção e capacidade de infiltração de água, aumento da biodiversidade, controle dos efeitos da temperatura no solo, diminuição das perdas de solo por erosão e retenção de carbono (Dabney et al., 2001; Snap et al., 2005; Wutke et al., 2009).

As plantas de cobertura, ao se associarem aos fungos micorrízicos, podem influenciar nas associações de cultivos subsequentes, auxiliar nas práticas de cultivo, maximizar a atividade microbiana e as interações biológicas favorecendo a utilização racional dos nutrientes do solo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das plantas de cobertura nas associações micorrízicas estabelecidas pelo milho em cultivo subsequente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Estes experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Solo/Departamento

de Agricultura e Ambiente do Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pombo. Os cultivos foram realizados em Cambissolo Vermelho-Amarelo, argiloso. As análises de solo foram realizadas no Laboratório de Solos do Campus Rio Pombo, sendo os procedimentos analíticos realizados conforme o recomendado para estado de Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999), e os principais resultados foram: pH= 6,6; Fósforo (P)= 39,6 mg/dm³; fósforo remanescente (P_{rem})= 38,5 mg/L; potássio (K)= 138,0 mg/dm³ e matéria orgânica (MO)= 3,46 dag/Kg.

O trabalho foi executado em duas etapas: 1. produção de biomassa de plantas de cobertura de verão; e 2. produção de milho para silagem sob sistema de plantio direto. O delineamento estatístico adotado foi em blocos casualizados com seis tratamentos e quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Os tratamentos constaram das seguintes espécies de plantas de cobertura: sorgo (*Sorghum bicolor*); crotalária (*Crotalaria juncea* L.); mucuna preta (*Mucuna aterrima*) e os consórcios: sorgo+crotalária; sorgo+mucuna preta e o tratamento controle (formado pela vegetação espontânea).

As plantas de cobertura foram semeadas em parcelas de 6,0 m² (2,0 x 3,0 m), com espaçamento de 50 cm entre linhas (para crotalária foi utilizado espaçamento de 25 cm entre linhas) e densidade de sementes conforme recomendação técnica para cada espécie. Nos consórcios entre as espécies, foi utilizado o espaçamento de 25 cm entre linhas, alternando as espécies (linha de leguminosa seguida de linha de gramínea). No tratamento com vegetação espontânea (controle) foram mantidas as plantas do banco de sementes da área. Sobre a palhada destas espécies foi conduzida a cultura do milho para silagem, em sucessão às plantas de cobertura. Foi utilizado o cultivar “AG 1051” (híbrido duplo), semeado em abril de 2011, pelo método manual, com espaçamento de 70 cm entre linhas e densidade de plantio de 12 sementes m⁻¹. As parcelas de 6,0 m² (2,0 x 3,0 m) foram as mesmas, onde anteriormente foram cultivadas as espécies de cobertura; sendo conduzidas três linhas de plantio, utilizando-se para coleta de material experimental apenas a linha central, evitando o efeito de bordadura. Não houve adubação de plantio em função dos resultados da análise do solo. Foi feita uma adubação de cobertura com 8,0 t ha⁻¹ de esterco

de galinha (seco e curtido), aos 28 dias após a emergência. A irrigação visou atender às necessidades hídricas da cultura, utilizando-se para isso o sistema de irrigação por aspersão convencional. Também houve a necessidade de uma capina manual, aos 21 dias após a emergência.

No ponto de corte do milho para silagem, foram coletadas três amostras de 500 g solo rizoférico em cada uma das parcelas, considerando a camada de 0-20 cm do solo. De cada uma destas amostras, retirou-se 100 g de solo para contagem dos esporos dos fungos de micorrizas arbusculares (FMA). Os esporos de FMAs foram extraídos pelo peneiramento úmido e em seguida centrifugados em água e sacarose a 50%, o sobrenadante foi lavado na peneira e recolhido em béqueres (Gerdemann & Nicolsen, 1993), e os esporos eram colocados em placa canelada para contagens em lupa estereoscópica.

As estruturas fúngicas presentes no sistema radicular foram coletadas nos fragmentos das raízes finas, quando o milho estava no ponto de corte para silagem. Estes fragmentos foram lavados para retirada do solo e dos restos de matéria orgânica, acondicionados em álcool 60% e armazenados a 5°C até o momento das análises (Brundrett et al., 1996).

Para a descoloração, as raízes foram submetidas ao tratamento com KOH 10% (m/v) a 75°C por 15-20 min (Vierheilig et al., 1998). Após a descoloração, as cápsulas foram transferidas para o béquer contendo solução de ácido acético 1% e agitadas por 3 a 5 min (Vierheilig et al., 1998). Em seguida, foi retirado o ácido acético 1% e adicionado o corante (Hero INK BLUE-BLACK, SHANGHAI, CHINA N° 62). O material foi aquecido em “banho maria” (60-70°C) por 15 min seguido da lavagem em ácido acético 1% (Vierheilig et al., 1998). Os fragmentos de raízes corados foram transferidos para lâminas de microscopia para verificação das estruturas fúngicas típicas. A verificação da micorrização foi realizada por meio da presença de estruturas fúngicas e os resultados foram expressos em percentagem (Brundrett et al., 1996).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as variáveis avaliadas apresentaram diferença significativa para os tratamentos testados (Tabela 1). Este resultado indica que a utilização de plantas de cobertura pode efetivamente influenciar nas interações

entre o milho e os fungos do solo. O efeito de bloco foi observado apenas para as variáveis hifas fúngicas e arbúsculos (Tabela 1).

Observou-se um aumento significativo na contagem dos esporos de FMA no solo dos tratamentos onde foram cultivadas as plantas de cobertura em comparação à testemunha, destacando-se os consórcios mucuna/sorgo e crotalária/sorgo que apresentaram maior quantidade de esporos (Figura 1).

Nossos resultados destacaram a interação sinérgica entre gramíneas e leguminosas na multiplicação de esporos de FMAs. As leguminosas se decompõem com maior velocidade que as gramíneas e afetaram positivamente a interação entre as micorrizas e as plantas de milho. Embora o efeito das gramíneas na multiplicação dos esporos de FMAs seja bem documentado, têm-se observado que o cultivo de leguminosas também favorece a esporulação e a diversidade de espécies de micorrizas (Collozzi-Filho & Balota, 1994).

As preparações microscópicas possibilitaram a observação de estruturas típicas de FMAs no interior das raízes de milho, a saber: hifas, arbúsculos, vesículas e esporos. Adicionalmente, observou-se a presença de fungos endofíticos do tipo *Dark Septated*. Foi observada a presença de hifas fúngicas penetrando no córtex radicular em todos os tratamentos, destacando-se as parcelas onde haviam os consórcios, onde ocorreram as maiores percentagens de hifas no sistema radicular (Figura 2A).

Os tratamentos contendo plantas de cobertura consorciadas aumentaram a diversidade biológica, o que poderia explicar a maior presença de hifas nas raízes provenientes destes tratamentos. A presença ubíqua de hifas fúngicas nas raízes de milho (superiores a 75%) pode ser explicada pela extensa proliferação no sistema radicular do milho ao longo do cultivo e, além disto, trata-se de estruturas que não são efêmeras como os arbúsculos (Bonfante-Fasolo, 1984). Adicionalmente, a presença destas hifas pode ser o resultado da associação de fungos endofíticos no sistema radicular do milho (Paula et al., 1991).

Observou-se que os arbúsculos foram mais abundantes nos tratamentos do consórcio quando comparados aos demais tratamentos (Figura 2B). Este resultado pode estar relacionado ao fato dos arbúsculos



Tabela 1 - Tabela de análise de variância contendo o quadrado médio e o coeficiente de variação, CV (%), para tratamentos e blocos relativos aos efeitos de plantas de cobertura em parâmetros relacionados às associações fúngicas em raízes do cultivo subsequente de milho

Variável	Grau de liberdade	Esporos em 100 g de solo	Hifas fúngicas (%)	Arbúsculos (%)	Esporos em microscopia (%)	Endofíticos <i>Dark Septated</i> (%)
Tratamentos	5	84,30 **	0,623 **	6,37 **	11,18 **	17,98 **
Blocos	3	1,93 ns	0,323 **	8,70 **	0,64 ns	1,53 ns
CV (%)	-	1,81	2,24	34,43	8,95	60,89

ns - não significativo; ** significativo à 1% de probabilidade pelo teste F.

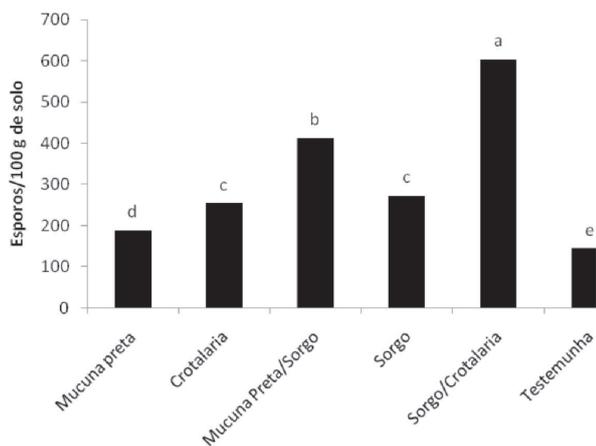


Figura 1 - Efeito das plantas de cobertura no número de esporos de FMAs por 100 g de solo cultivado subsequentemente com milho. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

serem estruturas efêmeras e da coleta das raízes ter sido realizada no final do ciclo do milho.

Constatou-se que as vesículas, assim como as hifas, estavam presentes em altas percentagens nos fragmentos de raízes analisados e os tratamentos onde foram utilizados o consórcio entre plantas de cobertura apresentaram as maiores percentagens (Figura 2C). As vesículas são estruturas de armazenamento e eventualmente atuam como propágulos dos FMAs e, desta forma, apresentam a função de sustentar o crescimento das hifas e formar esporos quando a planta não é mais capaz de suprir o fungo com carbono e energia (Saggin-Junior & Silva, 2005).

Observou-se que os esporos associados aos fragmentos de hifas estavam presentes em maior número no consórcio sorgo/crotalaria, seguido pelos tratamentos sorgo/mucuna-preta e sorgo (Figura 2D). A maior presença

dos esporos pode ser justificada tanto pela maior capacidade de multiplicação dos esporos nestes tratamentos, quanto pelo maior estabelecimento de novas associações, uma vez que nestes tratamentos foi verificado o maior número de esporos no solo.

Nas raízes de milho provenientes dos tratamentos sorgo/mucuna-preta, sorgo/crotalaria e crotalaria foram observadas estruturas típicas dos fungos endofíticos classificados como *Dark Septated*, não sendo observadas estas estruturas nos demais tratamentos e, além disto, nos consórcios, estas apresentaram percentagens significativas em relação à crotalaria (Figura 3).

Fungos endofíticos penetram nas plantas por aberturas naturais e feridas, podendo se alojar na parte aérea, caule e raízes das plantas, mas a principal porta de entrada são as raízes o que leva a ligação com fungos micorrízicos (Paula et al., 1991). Estes fungos são capazes de produzir metabólitos úteis às plantas, contribuindo para a tolerância a estresses abióticos e controle de outros microrganismos (Pereira, 1993; Rodrigues & Dias Filho, 1996). Pelos resultados apresentados anteriormente, estes fungos podem ter uma inter-relação com fungos micorrízicos, pois a partir da penetração de suas hifas no córtex das raízes das plantas, permanecem as feridas e aberturas favorecendo a entrada dos endofíticos tipo *Dark septated* (Paula et al., 1991).

4. CONCLUSÕES

A utilização de consórcios entre gramíneas e leguminosas como plantas de cobertura favorecem a associação da cultura subsequente do milho com fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo *Dark Septated*.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

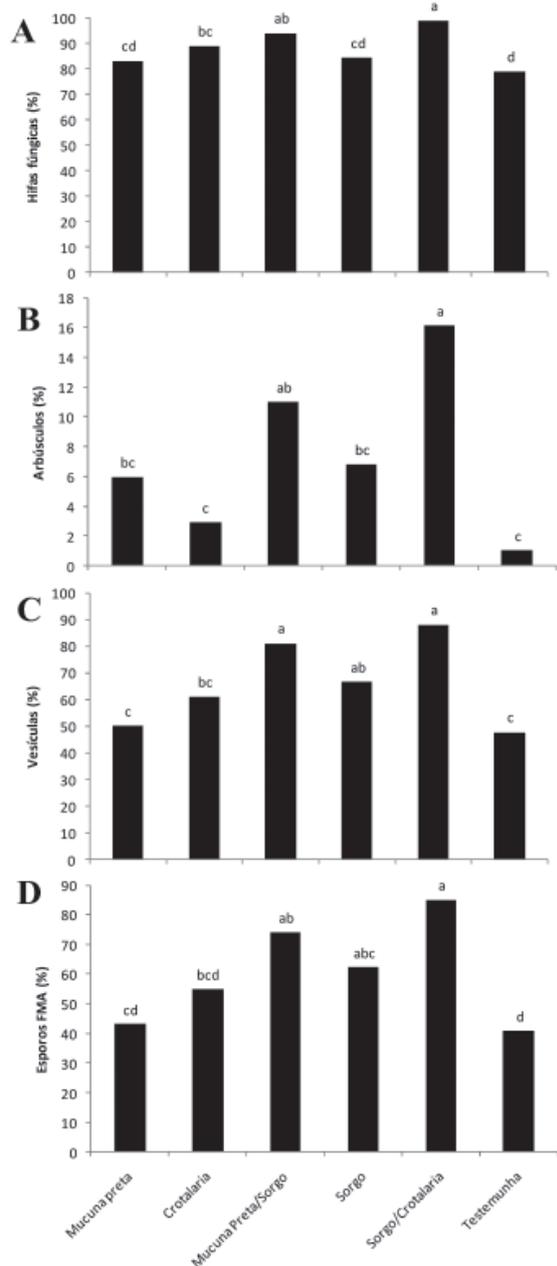


Figura 2 - Efeito das plantas de cobertura nas associações do milho com fungos benéficos do solo. (A) Percentagens de hifas fúngicas em fragmentos de raízes de milho (B) Percentagens de arbúsculos em fragmentos de raízes de milho. (C) Percentagens de vesículas em fragmentos de raízes de milho. (D) Percentagens de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em fragmentos de raízes de milho. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

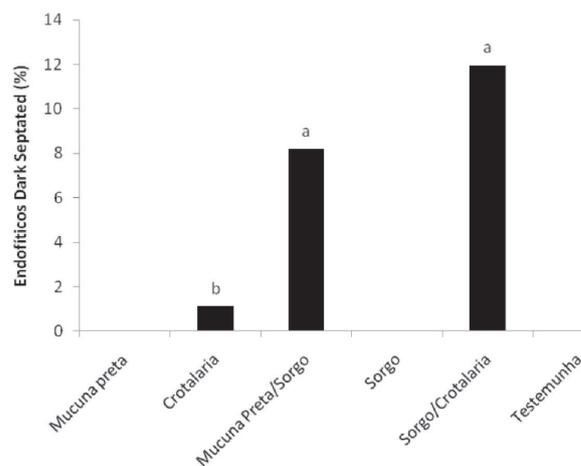


Figura 3 - Percentagens de fungos endofíticos do tipo *Dark septated* em fragmentos de raízes de milho. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6. LITERATURA CITADA

ANDREOLA, F.E.; FERNANDES, S.A.P.A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In: Silveira, A.P.D. e Freitas, S.S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agrônomo de Campinas – On line, p.21-38, 2007.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Eds) **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press. 1984. p.5-33.

BRUNDRETT M.; BOUGHER, N.; DELL, B. et al. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture** - ACIAR Monograph 32. Canberra: Pirie Printers, 1996. 374p.

COLLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em solo cultivado com cafeeiro e leguminosas de verão. In: Reunião brasileira sobre micorrizas, 1994. **Anais...** Florianópolis: REBRAN, 1994. p.17.

DABNEY, S.M.; DELGADO, J.A.; REEVES, D.W. Using winter cover crops to improve soil and water quality. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.32, p.7-8, 2001.



GASSEN, D.; GASSEN, F. **Plantio direto caminho para o futuro**. Passo Fundo: Aldeia sul. 1996. 207p.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infections of sweet potato (*Ipomea batata*), sugar cane (*Sorgum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p.111-115, 1991.

PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Piracicaba, São Paulo: ESALQ, 1993. 135p.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. 9.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 549p.

RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.905-909, 1996.

SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Micorriza Arbuscular: Papel, funcionamento e aplicação da simbiose. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Eds) **Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação e Tecnológica, 2005. p.101-149.

SNAPP, S.S.; SWINTON, S.M.; LABARTA, R. et al. Evaluating cover crops for benefits, costs and performance within cropping system niches. **Agronomy Journal**, v.97, p.322-332, 2005.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U. et al. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.5004-5007, 1998.

WUTKE, E.B.; TRANI, P.E.; AMBROSANO, E.J. et al. **Adubação verde no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2009. 89p. (Boletim Técnico, 249).

Recebido para publicação em 30/09/2012 e aprovado em 04/12/2012.