

PAULO PRATES JÚNIOR

**COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM  
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P912c Prates Júnior, Paulo, 1986-  
2014 Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares em  
diferentes sistemas de manejo do cafeeiro / Paulo Prates Júnior.  
– Viçosa, MG, 2014.  
xi, 34f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Eduardo de Sá Mendonça.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.28-34.

1. Fungos micorrízicos. 2. Interações ecológicas.  
3. Cafeeiro. 4. Sustentabilidade. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Solos. Programa de Pós-graduação em  
Agroecologia. II. Título.

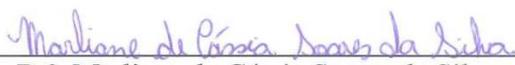
CDD 22. ed. 631.46

PAULO PRATES JÚNIOR

**COMUNIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM  
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO DO CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do grau de *Magister Scientiae*.

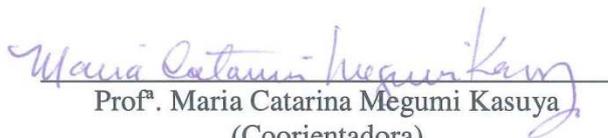
APROVADA: 26 de fevereiro de 2014.



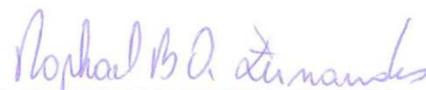
Dr.<sup>a</sup>. Marliane de Cássia Soares da Silva



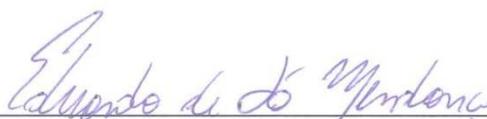
Prof.<sup>a</sup>. Tatiana Pires Barrella



Prof.<sup>a</sup>. Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Coorientadora)



Prof. Raphael Bragança Alves Fernandes  
(Coorientador)



Prof. Eduardo de Sá Mendonça  
(Orientador)

Aos meus sobrinhos, Lyvia,  
Victória, Marcelinho, Alyez e  
aos meus irmãos Mara e  
Marcelo.

Aos meus avós, Roga,  
Senhorinha, Terzinha, Vavá e aos  
meus pais, pelo legado, amor e  
sabedoria.

Peço a bênção!

DEDICO

“Ajudai-me, oh Manitu, a não julgar  
meu semelhante antes que eu tenha  
andado sete dias com suas  
sandálias.”

Provérbio dos Índios Sioux

“O saber a gente aprende com os  
mestres e com os livros. A sabedoria  
se aprende é com a vida e com os  
humildes”.

Cora Coralina

## AGRADECIMENTOS

A Antônio e João, Santos queridos. A todos os Encantados, guardiões das folhas e das matas, modelos de determinação e serenidade.

Aos meus pais e avós por todo o apoio, amor e dedicação. Aos meus irmãos e tios, com todo carinho à dos Anjos, Carmelito, Norma e Silvinha. Aos demais familiares pelos incentivos e momentos de alegrias.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e seus Departamentos constituintes: Solos, Fitotecnia, Nutrição e Zootecnia.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, muitos dos quais fez os dias mais interessantes e divertidos, de forma especial à Bianca que me levou até os agricultores e que muito contribuiu com as amostragens em campo. Sandro, Filipe e Estênio pela contribuição nas amostragens, permitindo a realização deste trabalho com eficiência e brevidade. Natália, Aldo e Thiago pelo carinho e ricas discussões em assuntos diversos.

À Rosângela, secretária do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela disponibilidade e colaborações nos registros e emissão de documentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

Ao professor Eduardo, meu orientador, que mesmo à distância acompanhou cada atividade, demonstrando compromisso, flexibilidade e compreensão.

Ao professor Raphael, meu coorientador, pelo auxílio durante os primeiros passos na UFV, permanecendo sempre disposto a mediar, colaborar e enriquecer o trabalho.

À professora Catarina, minha coorientadora, que com muita delicadeza e carinho me acolheu no Laboratório de Associações Micorrízicas, demonstrando entusiasmo com o trabalho e confiança, apesar do meu perfil tímido e reservado.

À professora Tatiana que aceitou o convite para compor a banca, assumindo o compromisso de colaborar para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Ao Bioagro, em especial ao Departamento de Microbiologia Agrícola que permitiu a realização de grande parte das atividades, com destaque para o Laboratório de Associações Micorrízicas e de Genética Molecular de Microrganismos.

À professora Denise Bazzolli e a professora Cynthia Silva pelas sugestões relacionadas à Genética e Ecologia de Microrganismos.

Agradecimento mais que especial a Bruno que se tornou excelente amigo e conselheiro, pois juntamente comigo conduziu todas as etapas do trabalho laboratorial com dedicação, empenho e maestria. Registro, também, os meus agradecimentos à Marliane por todo apoio, aconselhamentos, incentivos e por aceitar o convite para compor a banca, reassumindo o compromisso de colaborar com o trabalho. Aos demais companheiros do Laboratório de Associações Micorrízicas, em especial a Igor, Tiago, Arielly, Conrado, Tomás e Camila.

Aos mestres Irene, Ricardo, Maurício, Gilberto, Sílvia e Liovando, por fazer a diferença em meu processo de formação na UFV.

Aos mestres e amigos da UFBA, onde iniciei as minhas atividades acadêmicas, sobretudo aos companheiros do Labpor, Leni e Ecopol.

Aos amigos do grupo Organismo por me apresentarem à Agroecologia e ao grupo Raízes do Semiárido por permitir a minha continuidade na militância agroecológica, em sonhos e ações por um mundo mais feliz, justo e plural.

Aos amigos da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) que aguçaram em mim o senso de alegria e amizade, em especial à Zélia que despertou a minha atenção para o maravilhoso mundo dos fungos.

À minha namorada, Cleide, que tem me apoiado a cada dia, comemorado comigo cada vitória, cada parte concluída... Aconchego, sorrisos, felicidade, amor.

Agradecimento sincero aos agricultores familiares de Araçuaia que com muita humildade e esperança permitiram a execução deste trabalho ao nos receber em suas casas, depositando votos de confiança e afeto. A Zé Martins, Cinira e seus filhos, Argel, Artur, Andrei, Taciana e Tainá; Nivaldo, Dona Ana e Sr. Dé; Romualdo e família; Sr. Ílio José e família; Sr. Lécio Teixeira e família.

Ao Centro de Tecnologias Alternativas – Zona da Mata (CTA-ZM) pelo belíssimo trabalho junto aos agricultores, espalhando a agroecologia, *lato sensu*, a mais de 25 anos na região, bem como por favorecer o contato com os agricultores, facilitando a realização do presente trabalho.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

PAULO PRATES JÚNIOR, filho de Paulo Prates e Maria Sirlei Alves Prates, nasceu em 07 de março de 1986 em Caculé – Bahia.

Em Caculé, no ano 2000, concluiu o ensino fundamental no Colégio Estadual Norberto Fernandes. Fez o curso secundário (2001 a 2003), concomitante com o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal Antônio José Teixeira, Guanambi - BA.

Em agosto de 2005 iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador – BA, com iniciação científica no Laboratório de Ecologia Nutricional de Insetos e Laboratório de Ecologia da Polinização, concluindo o curso em julho de 2010.

Em 2010 iniciou atividades de pesquisa no Laboratório de Fitopatologia da EBDA (Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola), enquanto bolsista de Gestão de Ciência e Tecnologia da FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia), permanecendo até julho de 2012.

Em novembro de 2012 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa em fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| RESUMO .....  | viii |
| ABSTRACT.....   | x    |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1    |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 5    |
| 2.1. Área de estudo.....  | 5    |
| 2.2. Delineamento amostral .....  | 6    |
| 2.4. Colonização micorrízica .....  | 10   |
| 2.5. Extração e quantificação de esporos de FMA.....                      | 10   |
| 2.6. Análises moleculares.....  | 10   |
| 2.7. Análises estatísticas .....  | 13   |
| 3. RESULTADOS .....   | 14   |
| 3.1. Percentagem de colonização micorrízica e abundância de esporos ..... | 14   |
| 3.2. Análises moleculares e multivariada .....                            | 15   |
| 4. DISCUSSÃO .....  | 21   |
| 5. CONCLUSÕES .....   | 28   |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                       | 29   |
| APÊNDICES   |      |

## RESUMO

PRATES JÚNIOR., Paulo, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Comunidade de fungos micorrízicos arbusculares em diferentes sistemas de manejo do cafeeiro.** Orientador: Eduardo de Sá Mendonça. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Raphael Bragança Alves Fernandes.

A agroecologia busca reduzir o impacto dos sistemas de cultivo, a dependência da agricultura ao setor financeiro, bem como aumentar os serviços ecossistêmicos, ao melhorar o manejo de nutrientes e favorecer o uso do potencial biológico nos campos de cultivo. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam simbiose mutualística com as raízes e desempenham um importante papel na sanidade e eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas, além de melhorar a qualidade dos solos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das práticas de manejo e da variação temporal sobre a comunidade de FMA em sistema de manejo agroecológico e convencional de cafeeiro e fragmentos de mata, na zona rural de Araponga, Minas Gerais, Brasil. Amostras de solo e sistema radicular foram coletadas em três localidades distintas em três diferentes períodos do ciclo anual do cafeeiro (floração, granação e colheita), na camada de 0-20 cm. Os sistemas radiculares foram diafanizados, corados e avaliados quanto à percentagem de colonização micorrízica. Os esporos foram extraídos pela técnica de peneiramento úmido e quantificados, bem como avaliados em nível molecular pela técnica de PCR-DGGE. Os resultados observados indicaram diferenças em nível de percentagem de colonização entre os fragmentos de mata (36,33%) quando comparados aos sistemas agroecológico (25,47%) e convencional (25,04%), existindo variação temporal relacionada ao estágio fenológico do cafeeiro. Os fragmentos de mata apresentaram percentagem de colonização micorrízica com pouca variação ao longo do tempo, possivelmente, devido a maior disponibilidade de hospedeiros em estágios fenológicos distintos. Por outro lado, não houve diferença para a abundância de esporos entre os sistemas agroecológico (544,33), convencional (575,04) e fragmentos de mata (468,59), existindo variação temporal relacionada ao término do período chuvoso. Os sistemas de manejo e o período fenológico da planta afetam a diversidade e distribuição de FMA. Os sistemas agroecológicos do cafeeiro, baseados em Sistemas Agroflorestais e a adubação verde, favorecem a comunidade de FMA no solo. As análises de

componentes principais explicaram aproximadamente 45% da variabilidade dos dados de DGGE e revelaram que a influência dos sistemas de cultivo sobre a comunidade de FMA pode estar relacionado à adição de fertilizantes minerais e calagem. Os estudos destes organismos em função de variáveis microclimáticas, propriedades físico-químicas do solo, tipos e doses de agroquímicos devem ser investigados.

## ABSTRACT

PRATES JÚNIOR., Paulo, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Community of arbuscular mycorrhizal fungi in different management systems of the coffee crop.** Adviser: Eduardo de Sá Mendonça. Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Raphael Bragança Alves Fernandes.

Agroecology aim to reduce the impact of farming systems, the dependence of agriculture to the financial sector as well as the augment ecosystem services, by improving nutrient management and promoting the use of biological potential in cultivated fields. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form mutualistic symbiosis with the roots and play an important role in the health and efficiency of nutrient uptake by plants, they also improve soil quality. The aim of this study was to evaluate the effects of management practices and temporal variation on the community of AMF in agroecological and conventional management of coffee culture system and forest fragments in the rural Araponga, Minas Gerais, Brazil. Samples of soil and roots were collected at three different locations in three different periods of the annual cycle of the coffee (flowering, grain filling and harvest) in the 0-20 cm layer. The root systems were diaphanous, stained and evaluated for percentage of mycorrhizal colonization. Spores were extracted by the technique of wet sieving and quantified and evaluated by PCR - DGGE. The results indicated differences in percentage level of colonization between forest fragments (36.33%) and agroecological (25.47%) and conventional (25.04%) systems and absence of temporal variation related to the phenological stage of coffee crop. The forest fragments showed levels of mycorrhizal colonization with little variation over time, possibly due to greater availability of hosts at different phenological stages. Moreover, there was no difference for the abundance of spores among agroecological (544.33) and conventional systems (575.04) and forest fragments (468.59), existing temporal variation related to the termination of the rainy season. Management systems and the phenological period of the plant affect the diversity and distribution of AMF. In coffee agroecosystems, based on Agroforestry and green manure, benefit the community of AMF in the soil. The analysis of principal components explained approximately 45% of data variability and DGGE revealed that the influence of cropping systems on the AMF community may be related to the

addition of chemical fertilizers and by the liming. The study of these organisms related to microclimatic variables, physico-chemical properties of soil, types and rates of agrochemicals should be investigated.

## 1. INTRODUÇÃO

A artificialização dos sistemas naturais baseada nos fundamentos e técnicas da Revolução Verde tem sido levada a níveis extremos em escala global, criando práticas de manejo agrícola pouco flexíveis que induzem a dependência econômica da agricultura ao setor econômico e financeiro (PETERSEN *et al.*, 2009). Contudo, a Agroecologia enquanto prática, ciência e/ou movimento (WEZEL *et al.*, 2009) tem ganhado destaque (ALTIERI, 1999; GLIESSMAN, 2007), visto a necessidade de delinear sistemas agroalimentares mais sustentáveis, os quais devem equilibrar a produção de alimentos com a conservação dos recursos naturais, juntamente com a ampliação da inclusão social, segurança alimentar e autonomia dos agricultores. Deve, ainda, reduzir os impactos do excesso de fertilizantes e agrotóxicos (SMITH e SMITH, 2011), melhorar o manejo dos nutrientes e aumentar o papel de agentes biológicos do solo, tal como permitir uma grande diversidade e abundância de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (CARDOSO e KUYPER, 2006).

Os FMA (Glomeromycota) são fungos biotróficos obrigatórios que se associam com as raízes da grande maioria de plantas vasculares e outros vegetais basais, estabelecendo uma relação simbiótica denominada de micorriza arbuscular (SOUZA *et al.*, 2010). A origem da associação é estimada em cerca de 400 milhões de anos e sua importância é relacionada à produtividade dos ecossistemas, notadamente por favorecer a aquisição de nutrientes (PARNISKE, 2008). Os FMA desempenham papel ecológico fundamental no manejo de sistemas agrícolas com baixo uso de insumos externos (MA *et al.*, 2005), que buscam reduzir os riscos de alterações onerosas/irreversíveis por meio da manutenção da resiliência dos serviços ecossistêmicos e atividades nutricionais relacionadas às plantas (GIANINAZZI *et al.*, 2010).

Em maior ou menor grau, a grande maioria das plantas formam micorrizas arbusculares que têm reconhecido papel na fertilidade dos solos tropicais e na nutrição mineral de plantas, pois apresentam efeitos significativos na absorção de nutrientes de baixa mobilidade no solo, a exemplo de fósforo (P) e zinco (Zn) (CARDOSO e KUYPER, 2006; CARDOSO *et al.*, 2010), pois a rede de hifas acessa íons localizados longe da superfície das raízes (SCHWEIGER e JAKOBSEN, 2000). Além disso, os FMA contribuem para um melhor aproveitamento de fontes de nitrogênio (N) (ATUL-NAYYAR *et al.*, 2009),

interferindo positivamente na relação rizóbio-leguminosa, tornando-se importante em termos econômicos, uma vez que a dupla colonização aumenta a fixação de N e traz economia com os custos de aplicação de um nutriente limitante (REIS *et al.*, 2010).

A associação micorrízica arbuscular aumenta a área de exploração do solo e, conseqüentemente, aumenta a absorção de água e nutrientes pela planta (SMITH e READ, 1997). Essa característica contribui para a promoção da saúde humana por meio da melhoria nutricional dos alimentos (SMITH e SMITH, 2011). Por exemplo, a ocorrência de dietas deficientes em micronutrientes nos países em desenvolvimento, especialmente o Zn, cria problemas de saúde, devido à baixa disponibilidade em solos tropicais e em plantas (CARDOSO e KUYPER, 2006), com evidências de maior absorção e disponibilidade deste nutriente em plantas micorrizadas (LEHMANN *et al.*, 2014). Cabe destacar, ainda, aumento na tolerância a estresse abiótico como seca, salinidade, tolerância a metais pesados e também proteção contra estresses de natureza biótica, diminuindo o uso de agrotóxicos que prejudicam a saúde humana e a qualidade ambiental (GIANINAZZI *et al.*, 2010).

Embora tenha múltipla funcionalidade nos sistemas agrícolas, a simbiose micorrízica sofre influência de fatores, tais como: a) características genéticas da planta, especialmente a arquitetura da raiz; b) o genoma fúngico, p.ex. a habilidade para absorver P eficientemente e a perda para a planta sem comprometer o seu crescimento; c) a química do solo, especialmente relacionada à disponibilidade de nutrientes imóveis como P e Zn; d) outros fatores que direta ou indiretamente influenciam o crescimento da planta e do fungo, como temperatura, água, pH do solo, agregação das partículas do solo, etc (SMITH e SMITH, 2011). Portanto, a ocorrência e funcionalidade dos FMA inclui muitos fatores relacionados às práticas de manejo das culturas (CARDOSO e KUYPER, 2006) como a calagem, consórcio com leguminosas, manejo orgânico, monocultivo, dentre outros, que podem alterar as características físico-químicas e biológicas do solo (ANDRADE *et al.*, 2009).

O conhecimento da complexidade de fatores tais como o preparo do solo, tratos culturais e uso de agroquímicos que afetam as associações micorrízicas é fundamental para desenhar estratégias de manejo que focalizem uma agricultura sustentável (CARRENHO *et al.*, 2010). Neste contexto, ganha destaque os sistemas agroecológicos com baixos distúrbios,

que mantenham plantas perenes e que favoreçam a rede de micélio por meio do cultivo mínimo (CARDOSO *et al.*, 2010).

As informações sobre o papel das micorrizas em cafeeiros são escassas, com esforços realizados basicamente para a produção de mudas nos anos de 1970 e 1980 (BHATTACHARYA e BAGYARAJ, 2002; TRINDADE *et al.*, 2010), sendo necessários estudos que esclareçam os benefícios da micorrização (ANDRADE *et al.*, 2009) e a incidência micorrízica em diferentes sistemas de manejo ao longo do tempo. Cabe destacar que o cafeeiro apresenta elevada dependência micorrízica, sobretudo, em solos muito intemperizados e com baixa fertilidade (SIQUEIRA *et al.*, 1998), sendo estes fungos encontradas em plantas adultas no campo (CARDOSO *et al.*, 2003; MULETA *et al.*, 2008; ARIAS *et al.*, 2012 ), com grande incidência e riqueza (TRINDADE *et al.*, 2010).

O cafeeiro (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre) é cultivado em países da África, Ásia e América Latina e tem grande importância econômica, visto que é uma valiosa *commodity*, sobreposto apenas pelo petróleo (ANDRADE *et al.*, 2009), configurando-se como uma significativa fonte de renda para uma população em rápido crescimento nos trópicos (SIQUEIRA *et al.*, 1998; BHATTACHARYA e BAGYARAJ, 2002). O Brasil destaca-se como o maior produtor e exportador e segundo maior consumidor mundial de café, no qual Minas Gerais ocupa 54,25% da área cultivada no país (CONAB, 2014).

Reconhecer e entender a estrutura e dinâmica da comunidade de FMA é um pré-requisito necessário para identificar efeitos benéficos (CARDOSO e KUYPER 2006), no que diz respeito ao manejo, em uma melhor compreensão em nível de diversidade e sua relação com a quantidade e qualidade de produção (TCHABI *et al.*, 2008; GIANINAZZI *et al.*, 2010) e do ecossistema como um todo (CARRENHO *et al.*, 2010). Portanto, justifica-se a realização de pesquisas sobre a diversidade e composição de FMA em sistemas diversificados comparados a sistemas convencionais de monocultura, visto que muitos trabalhos são inconclusivos (BAINARD *et al.*, 2011).

A comunidade de FMA tem sido descrita, essencialmente, por meio de avaliações de abundância total de esporos, hifas intrarradiculares e comparações morfológicas de esporos para identificação de espécies. Entretanto, as ferramentas moleculares tem melhorado consideravelmente a possibilidade de identificar e monitorar os FMA em ecossistemas

(GIANINAZZI *et al.*, 2010), o que pode contribuir significativamente para o entendimento dos efeitos de práticas agrícolas na diversidade e função destes organismos (IPSILANTIS, *et al.*, 2012). Portanto, cria-se flexibilidade para avaliar respostas que não são evidenciadas pela utilização de técnicas clássicas (CARRENHO *et al.*, 2010).

Diante do exposto e dado o valor de sistemas diversificados para a sustentabilidade agrícola, associado ao papel funcional dos FMA para a qualidade dos solos e nutrição mineral de plantas, os objetivos do presente trabalho foram: a) avaliar os efeitos dos sistemas de manejo convencional e agroecológico do cafeeiro, em comparação com fragmentos de mata, sobre a diversidade, ocorrência e distribuição de FMA; b) avaliar o efeito temporal sobre a diversidade, ocorrência e distribuição de FMA em cafeeiro em sistemas convencionais e agroecológicos em comparação com fragmentos de mata.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

O estudo foi conduzido na zona rural do município de Araponga, Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil, em áreas originalmente recobertas por Mata Atlântica. A região é de clima tropical, com temperatura média de 18 °C, precipitação média anual de 1.500 mm, período seco de dois a quatro meses (maio a agosto), topografia com alta declividade de 20-45% e elevação variando de 200 a 1.800 m (CARDOSO *et al.*, 2003) e o município de Araponga com altitude média de 1.040m (IBGE, 2010). Os Latossolos Vermelho-Amarelo são os solos predominantes, são profundos, intemperizados e bem drenados, ácidos e com baixa fertilidade natural (KER, 1995; SOUZA *et al.*, 2012), embora, existam manchas de Cambissolos latossólicos (CARVALHO, 2011).

A região em estudo é uma das principais produtoras de café do estado de Minas Gerais, sendo que o processo historicamente ocorreu pelo sistema de monocultivo com fragmentação da densa cobertura vegetal (NUNES *et al.* 2009) e, conseqüente degradação do solo. Entretanto, alguns agricultores implementaram sistemas agroflorestais em suas lavouras de café, a partir da introdução de diferentes espécies arbóreas (DUARTE *et al.*, 2008), visto o processo de experimentação participativa, conduzido em parceria dos agricultores com o Centro de Tecnologia Alternativas da Zona da Mata (CTA-ZM) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em Araponga, a grande maioria das propriedades são minifúndios, onde o solo é pouco revolvido e ferramentas manuais são amplamente utilizadas, nas quais, frequentemente, observa-se o cultivo do café consorciado com milho e/ou feijão, além do cultivo de pastagem, arroz, mandioca e cana-de-açúcar (CARDOSO *et al.*, 2001).

No presente estudo os sistemas de manejo do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) avaliados foram: a) dois sistemas agroflorestais sem uso de agrotóxico e com adubação mineral; b) um plantio a pleno sol com adubação verde, uso de adubação mineral e sem uso de agrotóxico; c) um plantio a pleno sol com uso de adubação mineral e sem uso de agrotóxico; d) dois plantios a pleno sol com adubação mineral e uso de agrotóxico. As características e o histórico das áreas amostradas são apresentadas na TABELA 1.

## 2.2. Delineamento amostral

Foram utilizadas três unidades amostrais (S1, S2 e S3) para análises comparativas em três sistemas: (1) fragmento de mata, (2) manejo convencional e (3) manejo agroecológico. Em cada uma dos sistemas foram selecionados três pontos amostrais em três diferentes períodos do ciclo anual do cafeeiro: a) floração, novembro de 2012; b) granação, março de 2013 e c) colheita, julho de 2013; totalizando 81 amostras, conforme o desenho amostral apresentado na FIGURA 1.

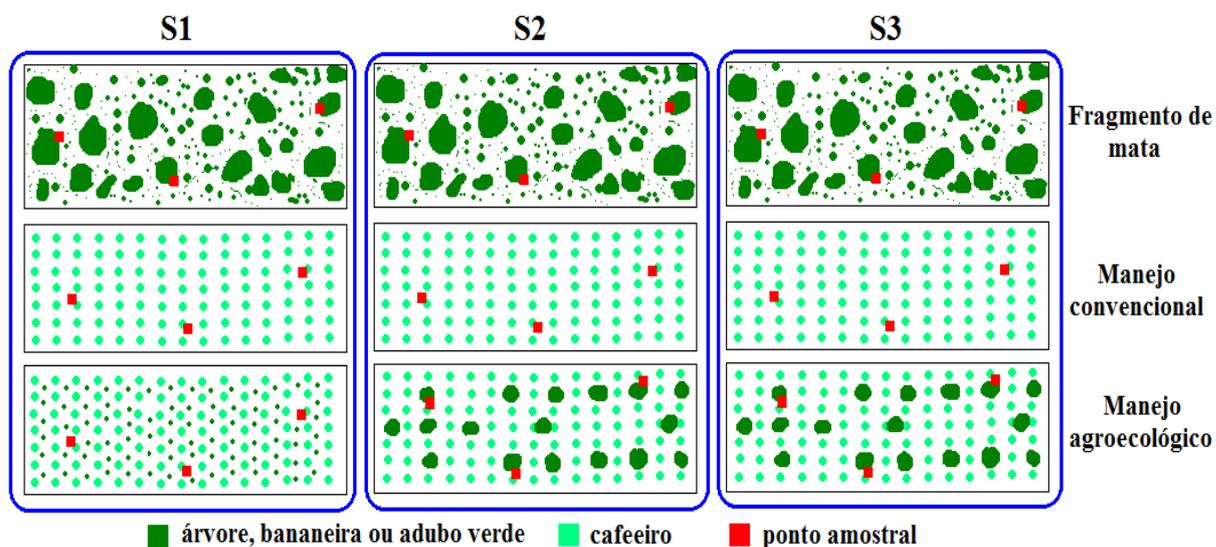


Figura 1: Esquema do desenho amostral para os sistemas agroecológico e convencional de cafeeiro e fragmentos de mata nas três localidades amostradas, de acordo com as características sumarizadas na TABELA 1.

O critério para enquadramento do plantio de café na categoria sistema de manejo agroecológico reconheceu o processo de transição agroecológica e ocorreu quando o agricultor adotou práticas como adubação verde e manejo das plantas espontâneas ou a implantação de sistema agroflorestal e a redução do uso de agroquímicos, principalmente, agrotóxicos.

Tabela 1: Características dos sistemas agroecológico, convencional e fragmento de mata em três localidades (S1, S2 e S3) estudadas em Araponga, Minas Gerais, Brasil.

| Características das áreas            | Sistemas e Localidades                            |   |  |   |   |                       |  |   |                       |
|--------------------------------------|---|---|--|---|---|-----------------------|--|---|-----------------------|
|                                      | S1 agroecológico*                                 | S1 convencional*                                  | S1 fragmento de mata*                  | S2 agroecológico <sup>1</sup>   | S2 convencional*  | S2 fragmento de mata* | S3 agroecológico <sup>2</sup>  | S3 convencional*                                  | S3 fragmento de mata* |
| Uso anterior                         | Pastagem  | Área a mais de 40 cultivada com cafeeiro          | Pastagem                               | Pastagem  | Pastagem  | S/I                   | Mata, pastagem, milho, feijão, arroz de sequeiro.                                  | Pastagem  | S/I                   |
| Idade do sistema                     | Aprox. 11 anos                                    | Aprox. 40 anos                                    | Em recuperação natural aprox. 13 anos. | Parcela maior com 14 anos e a menor com 7 anos. Recepa realizada em 2006  | Aprox. 8 anos   | Aprox. 30 anos        | Parcela 1 e 2 com 20 anos de idade e a parcela 3 com 17 anos de idade              | Aprox. 30 anos                                    | Aprox. 30             |
| Espécie e variedade                  | Catuai Vermelho                                   | Catuai Vermelho                                   | N/A                                    | Catuai Vermelho, Catuai Amarelo e Oeiras  | Catuai Vermelho   | N/A                   | Catuai Vermelho e Amarelo  | Catuai Vermelho                                   | N/A                   |
| Espaçamento entre as plantas de café | 1,2 X 1,5 m                                       | 1,4 X 3 e 1 X 2                                   | N/A                                    | 0,62 ha   | Aprox. 1,3 ha   | N/A                   | Parcela 01 e 02 o espaçamento é de 2,5 X 1 m. Parcela 03 3 X 1 m.                  | 3,5 X 1,5   | N/A                   |
| Área total (ha)                      | Aprox. 0,1 ha                                     | Aprox. 0,56 ha                                    | Aprox. 0,6 ha                          | 0,62 ha   | Aprox. 1,3 ha   | S/I                   | Parcela 01 com 0,75 ha; parcela 02 com 0,25 ha e parcela 03 com 0,23 ha.           | Aprox. 4 ha                                       | S/I                   |
| Adubação                             | 150 g/planta de NPK 20-5-20 ou 20-0-20 3X por ano | 150 g/planta de NPK 20-5-20 ou 20-0-20 3X por ano | N/A                                    | 80 g/planta de NPK 20-5-2 + 1-2X por ano + 2,5 kg de cama de frango + adubação foliar (sulfato de zinco, cloreto de potássio e ácido bórico). | 150 g/planta de NPK 20-5-20 ou 20-0-20 3x por ano + adubação foliar (sulfato de zinco, cloreto de potássio e ácido bórico). | N/A                   | 50g/planta de NPK 20-5-20, esterco bovino e calagem a cada três anos (100 g/cova). | 150 g/planta de NPK 20-5-20 ou 20-0-20 3X por ano | N/A                   |

|                                       |  |  |     |   |   |     |  |   |     |
|---------------------------------------|--|--|-----|---|---|-----|--|---|-----|
| <b>Consórcio</b>                      | Adubo verde: lablabe ( <i>Dolichos lablab</i> L.) por 3 anos, seguido por 2 anos de plantio de feijão. | Não  | N/A | Bananeira, feijão de porco ( <i>Canavalia ensiformis</i> ) e 12 espécies arbóreas, com destaque para <i>Solanum macropus</i> Dunal (54%), dentre outras como <i>Annona crassiflora</i> Mart., <i>Sparattos permavermicosum</i> , <i>Cecropia pachystachy</i> , <i>Senna occidentalis</i> , <i>Cajanus cajan</i> , <i>Machaerium stipitataum</i> . | Não   | N/A | Parcela 01, principais espécies: <i>Rollinia silvatica</i> , <i>Nectandra rigida</i> , <i>Jacaranda macrantha</i> , <i>Eucalyptus</i> sp. Parcela 02, principal espécie: bananeira ( <i>Musa</i> sp.). Parcela 03, principais espécies: <i>Inga uruguensis</i> e <i>Colubrina grandulosa</i> . | Não, mas, havia consórcio com milho e feijão nas entrelinhas. | N/A |
| <b>Agrotóxicos</b>                    | Não  | Não  | N/A | Não   | Herbicida; fungicida para controle de <i>Phoma</i> ; inseticida para controle da mosca-das-raízes e cigarrinha-do-cafeeiro, aplicados anualmente. | N/A | Não  | Herbicida   | N/A |
| <b>Manejo da vegetação espontânea</b> | Capina manual e/ou roçadeira, entre as linhas de café, quatro vezes por ano.                           | Capina manual e/ou roçadeira, entre as linhas de café, quatro vezes por ano. | N/A | Capina manual 2-3 vezes por ano.  | Aplicação de herbicida e capina manual 2-3 vezes por ano.   | N/A | Capina manual uma vez por ano. Adota a prática de manejo da vegetação espontânea.  | Aplicação de herbicida e capina manual duas vezes por ano.    | N/A |

<sup>1</sup>Fonte: Alves (2013) e informações levantadas junto à família do agricultor.

<sup>2</sup>Fonte: Oliveira (2013) e informações levantadas junto à família do agricultor.

\* Informações levantadas junto à família do agricultor.

N/A = Não se aplica.

S/I = Sem informação

Tabela 2: Características químicas e granulométricas da camada de 0-20 cm das amostras de solos para o período de floração e colheita.

| Unidade Amostral                   | pH               | P                             | K      | Ca <sup>+2</sup> | Mg <sup>+2</sup> | Al <sup>+3</sup> | H + Al | SB   | t    | T     | V     | m     | MO                   | P-rem              | Classe Textural |
|------------------------------------|------------------|-------------------------------|--------|------------------|------------------|------------------|--------|------|------|-------|-------|-------|----------------------|--------------------|-----------------|
|                                    | H <sub>2</sub> O | -----mg.dm <sup>-3</sup> ---- |        |                  |                  |                  |        |      |      |       |       |       | dag.kg <sup>-1</sup> | mg.L <sup>-1</sup> |                 |
| <b>Floração – novembro de 2012</b> |                  |                               |        |                  |                  |                  |        |      |      |       |       |       |                      |                    |                 |
| <b>Agroecológico S1</b>            | 4,94             | 1,60                          | 88,67  | 0,78             | 0,23             | 0,91             | 10,77  | 1,23 | 2,14 | 12,00 | 10,30 | 42,30 | 5,07                 | 14,70              | Argila          |
| <b>Convencional S1</b>             | 5,47             | 0,53                          | 96,00  | 2,09             | 0,53             | 0,36             | 8,37   | 2,86 | 3,22 | 11,23 | 26,23 | 9,70  | 5,70                 | 19,23              | Argila          |
| <b>Mata S1</b>                     | 4,44             | 1,63                          | 36,67  | 0,18             | 0,09             | 1,30             | 8,93   | 0,36 | 1,66 | 9,29  | 3,83  | 78,50 | 4,31                 | 18,13              | Argila          |
| <b>Agroecológico S2</b>            | 5,19             | 15,60                         | 71,00  | 2,56             | 0,65             | 0,23             | 6,70   | 3,39 | 3,62 | 10,09 | 33,57 | 6,87  | 4,10                 | 30,87              | Argila          |
| <b>Convencional S2</b>             | 4,96             | 1,83                          | 77,67  | 0,82             | 0,24             | 1,04             | 7,67   | 1,27 | 2,31 | 8,93  | 13,87 | 48,33 | 3,38                 | 21,53              | Argilo-arenosa  |
| <b>Mata S2</b>                     | 4,62             | 1,30                          | 26,67  | 0,14             | 0,05             | 1,37             | 12,47  | 0,26 | 1,62 | 12,72 | 2,03  | 83,67 | 7,44                 | 11,90              | Argila          |
| <b>Agroecológico S3</b>            | 4,99             | 2,33                          | 176,00 | 1,66             | 0,37             | 0,33             | 8,97   | 2,48 | 2,81 | 11,45 | 21,33 | 12,53 | 5,45                 | 15,90              | Argila          |
| <b>Convencional S3</b>             | 5,55             | 1,23                          | 95,33  | 1,01             | 0,33             | 0,23             | 6,57   | 1,59 | 1,82 | 8,15  | 19,70 | 12,00 | 3,93                 | 17,43              | Argila          |
| <b>Mata S3</b>                     | 4,65             | 2,77                          | 28,00  | 0,16             | 0,09             | 1,62             | 15,33  | 0,32 | 1,95 | 15,66 | 2,10  | 83,33 | 9,67                 | 9,57               | Argila          |
| <b>Colheita – julho de 2013</b>    |                  |                               |        |                  |                  |                  |        |      |      |       |       |       |                      |                    |                 |
| <b>Agroecológico S1</b>            | 5,03             | 7,90                          | 139,00 | 1,20             | 0,33             | 1,04             | 10,57  | 1,89 | 2,93 | 12,45 | 15,57 | 36,47 | 5,43                 | 7,53               | Argila          |
| <b>Convencional S1</b>             | 5,25             | 6,47                          | 104,67 | 2,08             | 0,60             | 0,88             | 9,73   | 2,94 | 3,82 | 12,68 | 25,07 | 25,73 | 5,42                 | 8,57               | Argila          |
| <b>Mata S1</b>                     | 4,60             | 1,33                          | 27,33  | 0,19             | 0,15             | 1,47             | 9,00   | 0,40 | 1,87 | 9,40  | 4,23  | 78,87 | 4,52                 | 6,50               | Argila          |
| <b>Agroecológico S2</b>            | 5,27             | 11,30                         | 45,67  | 2,13             | 0,59             | 0,36             | 6,70   | 2,84 | 3,20 | 9,54  | 28,87 | 14,23 | 3,53                 | 15,67              | Argila          |
| <b>Convencional S2</b>             | 4,76             | 5,00                          | 75,67  | 0,54             | 0,19             | 1,63             | 8,77   | 0,93 | 2,55 | 9,69  | 9,57  | 63,50 | 3,36                 | 9,40               | Argilo-arenosa  |
| <b>Mata S2</b>                     | 4,45             | 1,57                          | 20,67  | 0,10             | 0,11             | 1,76             | 12,43  | 0,26 | 2,02 | 12,70 | 2,03  | 87,10 | 7,32                 | 6,33               | Argila          |
| <b>Agroecológico S3</b>            | 5,09             | 4,23                          | 158,67 | 1,43             | 0,37             | 0,75             | 9,40   | 2,21 | 2,95 | 14,32 | 18,57 | 26,93 | 5,08                 | 6,80               | Argila          |
| <b>Convencional S3</b>             | 5,06             | 5,57                          | 95,33  | 1,34             | 0,38             | 1,20             | 10,37  | 1,96 | 3,17 | 12,33 | 15,97 | 40,37 | 5,90                 | 5,93               | Argila          |
| <b>Mata S3</b>                     | 4,59             | 1,83                          | 29,33  | 0,14             | 0,14             | 1,53             | 12,87  | 0,35 | 1,88 | 13,46 | 2,63  | 81,43 | 7,62                 | 5,27               | Argila          |

Extratores utilizados:

P, K, Zn, Cu = Extrator Mehlich 1

Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> = Extrator KCl 1 mol.L<sup>-1</sup>

H+Al = Extrator Acetato de Ca 0,5 mol. L<sup>-1</sup>

pH 7,0 pH em água, relação 1:2,5

SB= soma de bases trocáveis

CTC (t) = Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) = Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V = índice de saturação de bases

m = índice de saturação de alumínio

## **2.4. Colonização micorrízica**

As raízes armazenadas e conservadas em solução de formol, álcool e ácido acético foram lavadas, diafanizadas com KOH 10% (p:v) por 6-10 dias, lavadas em água corrente e, posteriormente, tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (5 minutos), seguida por imersão em HCl 1% (v:v) por 5 minutos, coradas com azul de tripano 0,05% em lactoglicerol (v:v) por 12h a temperatura ambiente (PHILLIPS e HAYMAN 1970). Realizada a coloração, as raízes foram armazenadas em lactoglicerol (p:v) (BRUNDRETT *et al.*, 1996) até a quantificação da colonização. Esta avaliação ocorreu com o auxílio de lâminas com marcações quadriculadas, observando 100 pontos de interseção entre os fragmentos de raízes e as linhas (presença = sim, ausência = não) em três repetições para cada amostra, conforme a presença de estruturas fúngicas (arbúsculos, hifas e vesículas) observada sob o microscópio óptico (GIOVANNETTI e MOSSE, 1980).

## **2.5. Extração e quantificação de esporos de FMA**

Para a quantificação dos esporos (abundância total) foram utilizados 100 cm<sup>3</sup> de solo. Os esporos foram separados pelo método de peneiramento úmido (GERDEMANN e NICHOLSON, 1963) em peneiras de malha 0,42 e 0,044 mm, seguido por centrifugação em água e solução de sacarose 50%. A contagem de esporos foi realizada em placas de Petri com canaletas, sob um estereomicroscópio, com aumento de até 40 vezes.

## **2.6. Análises moleculares**

A partir dos esporos obtidos de 50 cm<sup>3</sup> de solo, pela técnica de peneiramento úmido, o DNA total da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares foi extraído com o *kit Power Soil DNA, MoBio (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)* de acordo com as orientações do fabricante e pequenas adaptações nas seguintes etapas do protocolo: (1) utilização de alíquota de 600 µL da suspensão de esporos; (7) transferência de 700 µL do sobrenadante para o tubo de coleta; (10) transferência de 750 µL do sobrenadante para o tubo de coleta.

Realizada a extração, as soluções de DNA foram aquecidas a 60 °C por 10 minutos, agitadas em vórtex por 5 segundos e centrifugas por 5 segundos, visando a melhor homogeneização. Em seguida, obteve-se uma amostra composta (45 µL) pela mistura de 15 µL da solução de DNA obtida para cada um dos três pontos amostrais em cada uma dos sistemas (fragmento de mata, manejo convencional e manejo agroecológico) das três áreas (S3, S1 e S2), nos três diferentes períodos de tempo, totalizando 27 amostras. Em seguida, foram adicionados 90 µL de água MilliQ® estéril a solução de DNA (45 µL) com novo ciclo de aquecimento, 60 °C por 10 minutos, agitação em vórtex por 5 segundos e microcentrifugação de 5 segundos.

Retirou-se uma alíquota de 3 µL em três repetições para efetuar a reação em cadeia da polimerase (PCR), com utilização da enzima GoTaq® Flex DNA Polimerase (Promega, Madison, USA) em 50 µL de tampão (20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; pH 8,4), conforme as recomendações do fabricante. As amostras consistiam em 3 µL do DNA extraído dos esporos juntamente com 200 µM dos quatro desoxinucleosídeos trifosfatados; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada *primer*; 1,25 U da enzima GoTaq Flex DNA polimerase e 0,8 µL (0,8 µg µL<sup>-1</sup>) de albumina bovina acetilada (BSA, Promega) para otimizar a ação da polimerase. A primeira amplificação da fração de DNA correspondeu ao rDNA 18S dos fungos micorrízicos arbusculares, com os *primers* AM1(5'- GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA - 3') (HELGASON *et al.*, 1998) combinado com o *primer* universal para eucariotos NS31 (5'- TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC - 3') com obtenção de fragmentos de 580 pb (SIMON *et al.*, 1992).

As amplificações dos fragmentos de DNA por meio da técnica de PCR ocorreram em um termociclador (Mastercycle egradient, Eppendorf), mediante as seguintes etapas: a) um primeiro ciclo de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 66 °C e 1,5 min. a 72 °C; b) 30 ciclos de 30s a 94 °C, 1 min. a 66 °C e 30s a 72 °C e c) extensão final de 10 min. a 72 °C. A confirmação do produto amplificado foi efetuada com alíquotas de 5 µL dos produtos das reações de PCR, submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p:v), corados com brometo de etídio e visualizado sob luz UV no fotodocumentação *Molecular Imaging* (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi) para a verificação da presença de bandas indicativas do DNA genômico dos esporos.

A segunda amplificação, *Nested* PCR, buscou a obtenção de fragmentos menores de DNA para a realização da técnica de eletroforese em gel com gradiente

desnaturante (DGGE), utilizando-se uma alíquota de 1 µL do produto da reação do primeiro PCR previamente diluída em 9 µL de água MilliQ<sup>®</sup> estéril. Neste caso, foram utilizados os *primers* NS31-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGGCAA G TCTGGTGCC-3') (KOWALCHUK *et al.*, 2002) e Glo1 (5'-GCCTGCTTTAAACTCTA-3') (CORNEJO *et al.*, 2004), mediante a utilização da mesma mistura descrita para a primeira reação de PCR. As amplificações ocorreram em termociclador nas seguintes etapas: a) desnaturação inicial do DNA por 5 min. a 94 °C; b) seguido por 35 ciclos com desnaturação por 45s a 94 °C; c) pareamento por 45s a 52 °C e extensão por 1 min. a 72 °C. Os produtos foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1,5% p:v) corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta no fotodocumentador *Molecular Imaging* (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

Os produtos obtidos da segunda amplificação foram utilizados para a análise de DGGE (Modelo DCode<sup>™</sup> System – BIO-Rad California USA), conforme a metodologia descrita por Liang *et al.* (2008), com pequenas modificações. Utilizaram-se gel de poliacrilamida (37,5:1 acrilamida: bisacrilamida) a 8% (p:v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris/ácido acético/EDTA, pH 8,0), o gradiente foi obtido com o Formador de Gradiente Hoefer SG50 (Armstrong Biosciences) e pela mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida, sendo a condição de 100% de desnaturação composta de ureia 7 mol L<sup>-1</sup> (Sigma, Cat#U5378) e formamida a 40% (v/v) (Sigma, Cat#F9037) e a de 0% de desnaturação sem estes reagentes. O gradiente final do gel obtido pela mistura das soluções variou de 35 a 50%.

A eletroforese ocorreu com uso do tampão TAE 1X a temperatura constante de 60 °C a 80 V por um período de 10 min., seguidos de 60 V por 20 horas. Os géis foram corados após o término da eletroforese por 30 min. em solução 1X de SYBR GOLD<sup>®</sup> (Sigma Aldrich), conforme as recomendações do fabricante. As imagens obtidas dos géis foram observadas sob luz ultra-violeta, capturadas e digitalizadas pelo sistema de fotodocumentação *Molecular Imaging* (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

As imagens foram analisadas com o programa Bionumerics<sup>®</sup>, que permitiu a construção de dendrogramas para avaliar a similaridade entre as comunidades de FMA, referentes à distância e o padrão de bandas correspondentes ao gene 18S rDNA de FMA, conforme a presença/ausência de regiões amplificadas.

## **2.7. Análises estatísticas**

Para avaliar a abundância total de esporos (dados transformados para  $\log(X)$ ) e a porcentagem de colonização micorrízica foi realizado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), seguido pela análise para experimentos em parcelas subdivididas (sistemas, períodos e localidades, respectivamente) e médias comparadas pelo teste de Tukey, com a utilização do programa estatístico Assistat 7.7.

O padrão de similaridade e intensidade das bandas presentes nos géis de DGGE foi avaliado pelo índice de Sorensen-Dice, seguido pela análise de agrupamento utilizando o método da variância mínima (Ward) para a construção de dendrogramas, com auxílio do programa Bionumerics 5.1. A matriz de similaridade obtida foi utilizada juntamente com as variáveis, característica química do solo, na análise de componentes principais (PCA) por distância euclidiana e transformação logarítmica dos dados ( $\log(X+1)$ ) pelo programa Canoco (Canoco 4.5., Biometris, Wageningen, Holanda).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Percentagem de colonização micorrízica e abundância de esporos

A percentagem de colonização micorrízica nos sistemas de manejo convencional e agroecológico não diferiram entre si e mostraram-se distintos dos fragmentos de mata, os quais tiveram maior percentagem de colonização (FIGURA 2). Houve variação temporal para a percentagem de colonização, pois no período de floração e colheita a percentagem de colonização foi maior que no período de granação. As localidades S1, S2 e S3 não apresentaram diferença para a percentagem de colonização micorrízica, visto que os sistemas de manejo agroecológico e convencional e fragmentos de mata tiveram padrão semelhante nas três localidades. A localidade S1 apresentou a maior média de percentagem de colonização durante a floração, tanto para o sistema de manejo convencional e agroecológico quanto para o fragmento de mata.

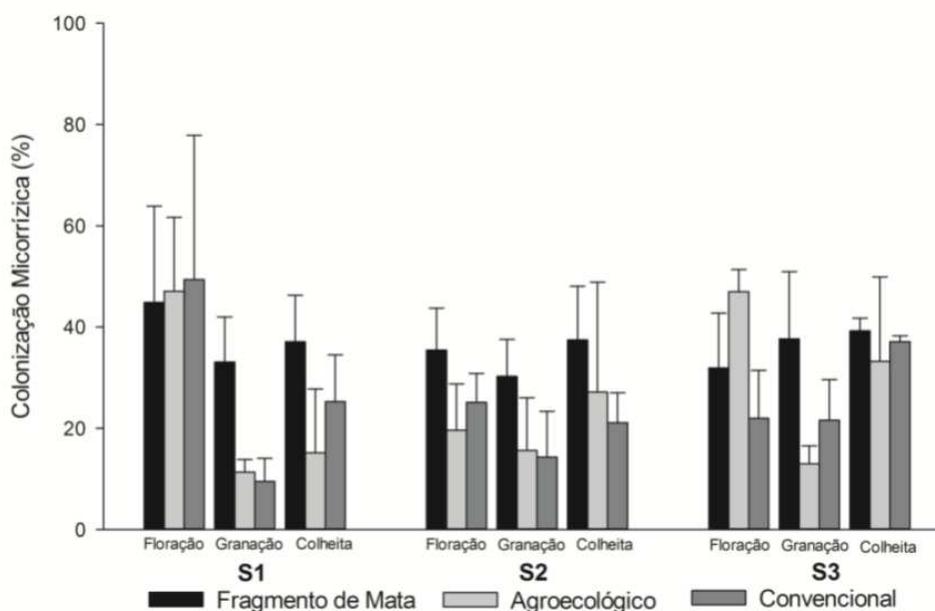


Figura 2: Percentagem de colonização do sistema radicular de cafeeiro agroecológico e convencional e espécies de fragmento de mata, em três períodos e três localidades.

Os sistemas agroecológico, convencional e fragmento de mata não apresentaram diferenças para a abundância de esporos (FIGURA 3). Entretanto, houve diferença sazonal, com menor número de esporos observados no período floração quando

comparado ao período de granação e colheita. A diferença entre período de floração comparado ao período de granação e colheita foi maior nos sistemas de cultivo agroecológico e convencional, contrastando com os fragmentos de mata, os quais apresentaram menor variação. As localidades S1 e S2 (geograficamente mais próximas entre si) apresentaram padrão semelhante para o número de esporos e se distinguiram de S3. Cabe destacar que as localidades S1 e S2 nos sistemas agroecológico e convencional apresentaram maior média para a abundância de esporos diferindo de S3. Por outro lado, o fragmento de mata S2 apresentou a menor média para a abundância de esporos, diferindo apenas de S3.

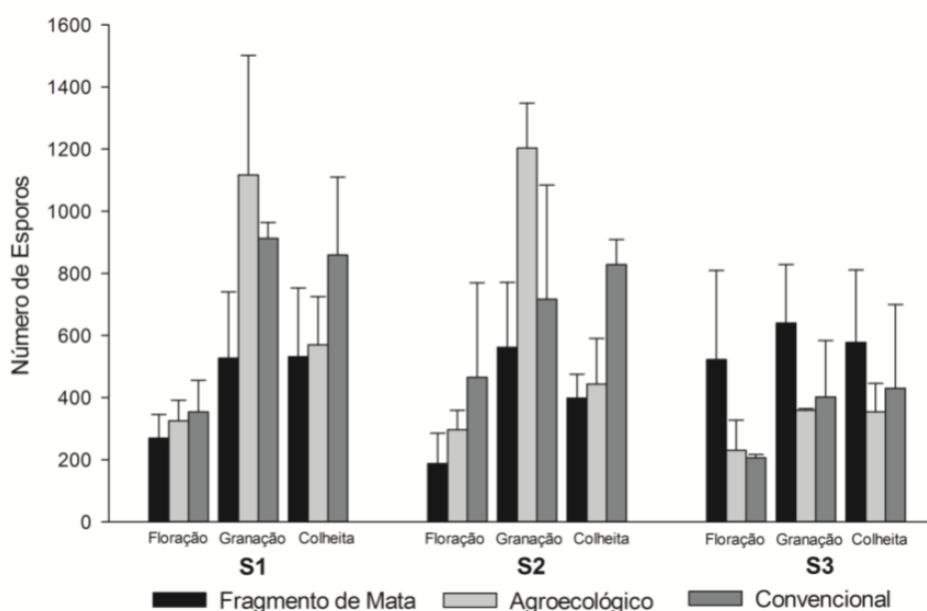


Figura 3: Número de esporos nas amostras de solo em cultivo de cafeeiro agroecológico e convencional e fragmento de mata em três períodos e três localidades.

### 3.2. Análises moleculares e multivariada

A análise da comunidade de FMA por meio da técnica de PCR-DGGE permitiu a obtenção e comparação entre os perfis de migração das bandas, com utilização do índice de Sorensen-Dice e análise de agrupamento pelo método da variância mínima (Ward). Os agrupamentos foram separados por períodos, buscando avaliar o efeito da

temporalidade e foram representados graficamente por meio de dendrogramas (FIGURAS 4, 5 e 6).

No período de floração (chuvoso, novembro de 2012), os sistemas (agroecológico, convencional e fragmento de mata) formaram três grupos (FIGURA 4), com maior proximidade entre os fragmentos de mata e os sistemas de manejo agroecológico. Dentro dos sistemas fragmento de mata e manejo convencional as localidades S3 e S1 mostraram-se mais relacionadas, contrastando com o agroecológico, na qual as duas áreas com sistemas agroflorestais (S3 e S2) mostraram-se mais relacionadas, com aproximadamente 50% de similaridade.

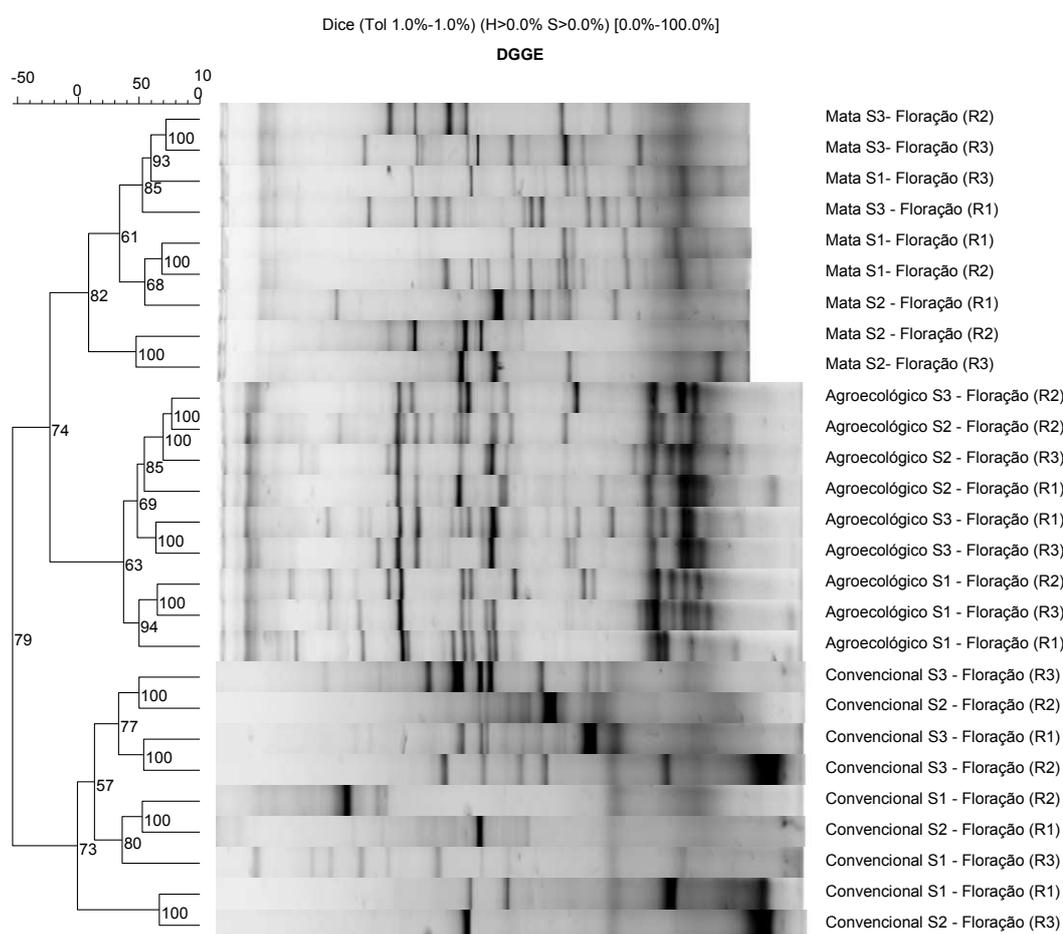


Figura 4: Dendrograma demonstrando a similaridade existente entre fragmentos de mata e sistemas de manejo agroecológico e convencional do cafeeiro durante a fase de floração, novembro de 2012, por meio do índice de Sorensen-Dice, calculado pelo padrão de bandas obtidas pela técnica de PCR-DGGE.

No período de granação (final do período chuvoso), a análise resultou em um grupo composto por todas as áreas de mata juntamente com o sistema de manejo agroecológico S2 (FIGURA 5); outro grupo composto pelos sistemas de manejo convencional S1 e S2 e um terceiro grupo formado pelos sistemas de manejo agroecológico S1 e S3 juntamente com o convencional S3. Os fragmentos de mata S1 e S3 apresentam maior semelhança entre si quando comparado com S2. Entretanto, S1 e S2 nos sistemas de manejo agroecológico e convencional apresentaram maior similaridade.

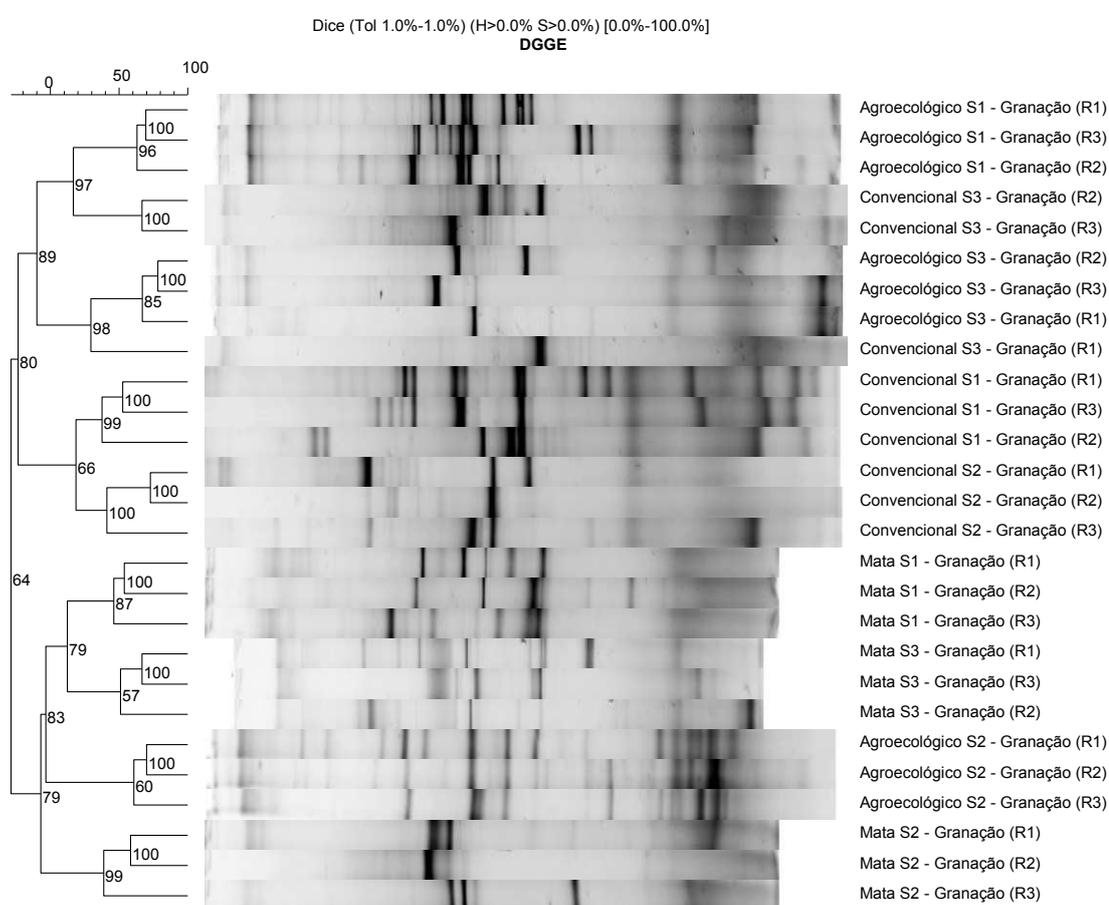


Figura 5: Dendrograma demonstrando a similaridade existente entre fragmentos de mata e sistemas de manejo agroecológico e convencional do cafeeiro durante a fase de granação, março de 2013, por meio do índice de Sorensen-Dice, calculado pelo padrão de bandas obtidas pela técnica de PCR-DGGE.

No período de colheita (período seco, julho de 2013) manteve-se o padrão de maior proximidade entre S1 e S3 nos fragmentos de mata (FIGURA 6). Os sistemas de

manejo convencional se agruparam com uma repetição do agroecológico S3 e, sendo outro grupo composto pelas demais amostras dos sistemas agroecológicos. Dentro do sistema de manejo agroecológico, o S2 formou um grupo distinto e S3 e S1 se agruparam. No sistema de manejo convencional S1 e S3 formaram um subgrupo.

A análise de agrupamento mostrou que os grupos formados variaram entre períodos, indicando a dinâmica da comunidade de FMA. De modo geral, os sistemas agroecológicos apresentaram padrão intermediário de similaridade entre os fragmentos de mata e os sistemas de manejo convencional.

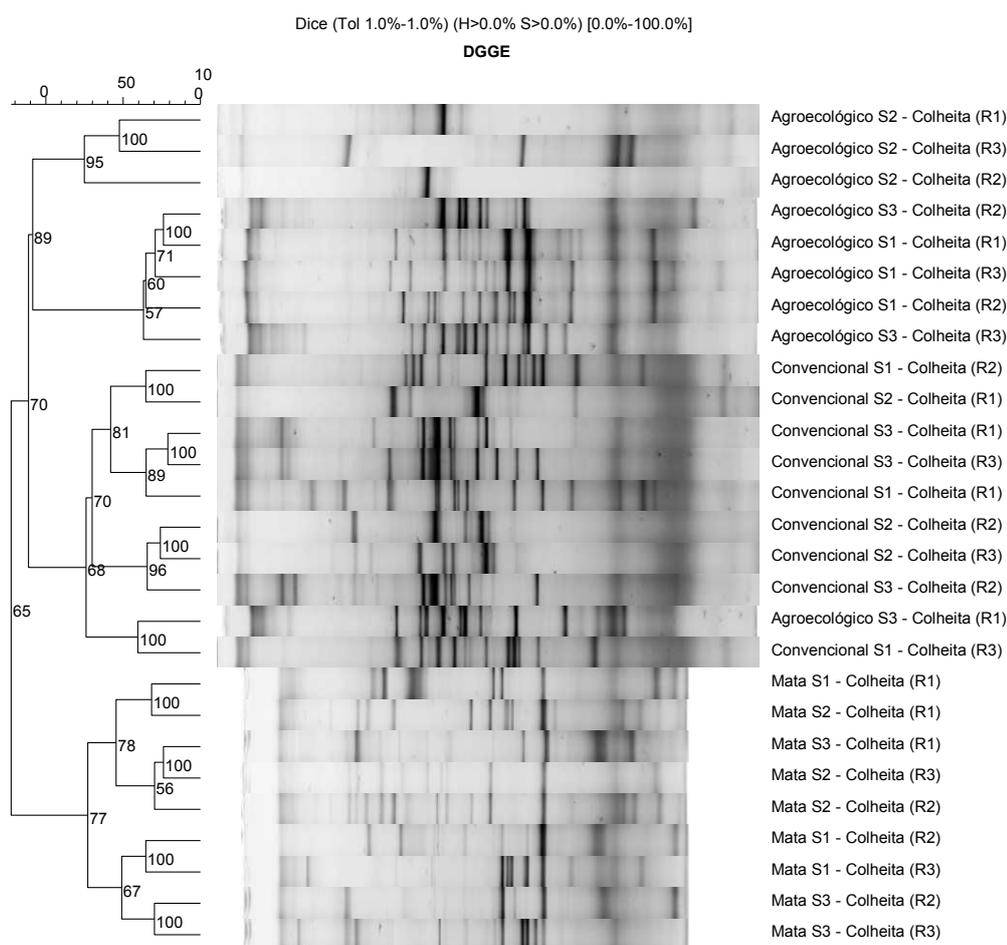


Figura 6: Dendrograma demonstrando a similaridade existente entre fragmentos de mata e sistemas de manejo agroecológico e convencional do cafeeiro durante a fase de colheita, julho de 2013, por meio do índice de Sorensen-Dice, calculado pelo padrão de bandas obtidas pela técnica de PCR-DGGE.

A análise de componentes principais foi realizada separadamente para o período de floração (chuvoso, novembro de 2012 – FIGURA 7) e colheita (período seco, julho

de 2013 – FIGURA 8) e complementou os resultados da análise de agrupamento. Nota-se a formação de três grupos distintos, no qual os fragmentos de mata formaram um grupo mais coeso em ambos os períodos, enquanto os sistemas agroecológico e convencional mostraram-se mais dispersos. Neste caso, os fragmentos de mata em ambos os períodos, distinguiu-se dos sistemas de cultivo do cafeeiro, principalmente pelas variáveis matéria orgânica (MO), teores de  $Al^{3+}$  e  $H+Al$  e índice de saturação de alumínio (m). De outro modo, a soma de bases trocáveis (SB), o fósforo remanescente (P-rem), K, índice de saturação de bases (V),  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , capacidade de troca catiônica efetiva (t) contribuiu para distinguir a comunidade de FMA dos sistemas de cultivo dos fragmentos de mata.

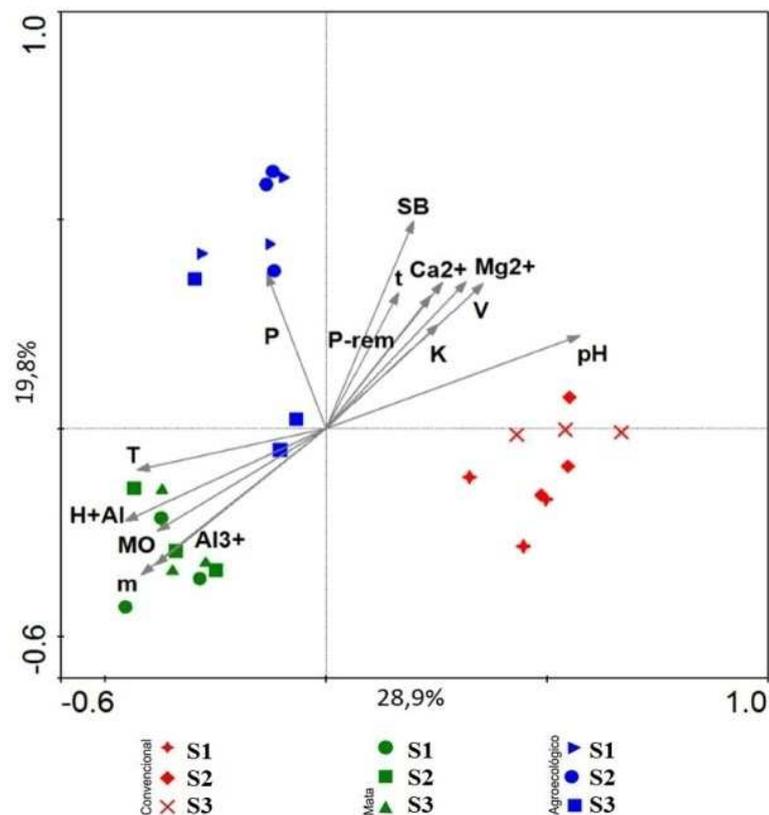


Figura 7: Análise de componentes principais com base nos perfis de PCR-DGGE para a comunidade de FMA e atributos químicos dos solos em cultivo de cafeeiro agroecológico e convencional e fragmentos de mata, durante o período de floração da cultura.

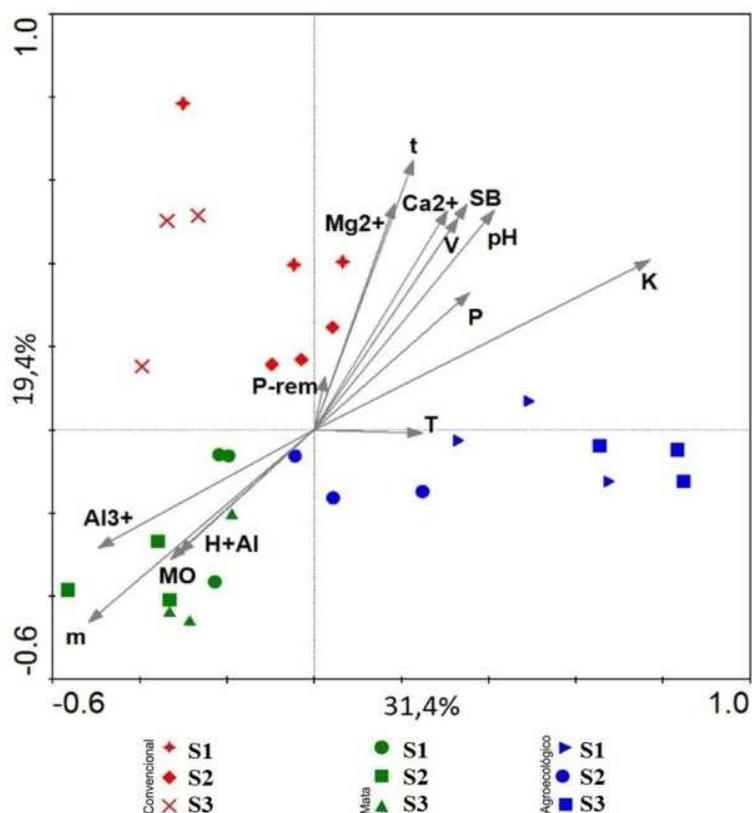


Figura 8: Análise de componentes principais com base nos perfis de PCR-DGGE para a comunidade de FMA e atributos químicos dos solos em cultivo de cafeeiro agroecológico e convencional e fragmentos de mata, durante o período de colheita da cultura.

No período de floração a análise para as variáveis ambientais explicou 45,9% da variabilidade dos dados do DGGE, sendo que o primeiro eixo explicou 28,9% e o segundo 19,8%, no qual a diferenciação da comunidade de FMA nos sistemas agroecológicos ocorreu, principalmente, pela quantidade de fósforo disponível (P), enquanto o sistema convencional sofreu maior influência do pH.

No período de colheita a análise explicou 44,1% da variabilidade dos dados do DGGE, sendo que o primeiro eixo explicou 31,4% e o segundo 19,4%, no qual os sistemas de manejo agroecológico sofreram maior influência da capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (T). De outro modo, os sistemas de manejo convencional sofreram influência do  $Mg^{2+}$ , capacidade de troca catiônica efetiva (t) e do fósforo remanescente (P-rem).

#### 4. DISCUSSÃO

A diferença na percentagem de colonização micorrízica entre os sistemas agroecológico e convencional em comparação aos fragmentos de mata pode se relacionar ao menor efeito da variação temporal, possivelmente, pela maior diversidade e abundância de plantas hospedeiras em estágios fenológicos distintos. A percentagem de colonização micorrízica foi afetada pelo período de amostragem, diferenciando-se do estudo realizado em cafeeiro arborizado e a pleno sol em Vitória da Conquista, Bahia, Brasil (BONFIM *et al.*, 2010) e cafeeiro orgânico e convencional em Santo Antônio do Amparo, Minas Gerais, Brasil (THEODORO *et al.*, 2003), no qual ambos avaliaram apenas o período seco e chuvoso. Durante o período de floração e colheita, nos sistemas de manejo agroecológico e convencional, a percentagem de colonização foi maior quando comparada ao período de granação, indicando o efeito do estágio fenológico do cafeeiro sobre a simbiose (FIGURA 2). Espera-se que durante o período de granação do cafeeiro ocorra alteração na colonização micorrízica (SILVE, 2011), devido o maior consumo de fotossintatos que são transportados das folhas para os frutos, ocasionando menores alíquotas para as raízes (BONFIM *et al.*, 2010), desfavorecendo a colonização radicular.

A menor percentagem de colonização micorrízica durante a granação (março de 2013) foi percebida nos sistemas de manejo agroecológico e convencional, porém os fragmentos de mata apresentaram percentagem de micorrização relativamente estável ao longo dos três períodos. Esse resultado difere do encontrado por ZANGARO *et al.* (2013), que demonstraram a existência de maior colonização radicular durante a primavera e verão e menor durante o outono e inverno, em florestas do bioma Mata Atlântica no Sudeste do Brasil, porém, no referido trabalho a amostragem foi realizada na camada de solo de 0 a 5 cm. Existem evidências que as camadas mais profundas do solo, abaixo de 35 cm, possam estocar mais que 50% da biomassa de FMA (HIGO *et al.*, 2013), permitindo grande colonização de raízes nestas profundidades. Assim, as diferenças na percentagem de colonização podem ocorrer, também, pela utilização de diferentes profundidades de amostragem, com avaliação de camadas de solo com dinâmica distinta, seja pelos atributos físico-químicos ou microbiológicos

A ausência de diferença na percentagem de colonização entre as localidades (S1, S2 e S3) e padrão semelhante dentro de cada sistema durante os três períodos, reforça o

argumento do papel do estágio fenológico das plantas sobre a dinâmica da simbiose. Por outro lado, a maior média de percentagem de colonização para a localidade S1 nos sistemas agroecológico, convencional e fragmento de mata evidencia que características locais como eventos de dispersão e atributos ambientais como as características do solo são relevantes em nível de colonização. Existem indicações que com a remoção do efeito das práticas agrícolas, a distância geográfica e a heterogeneidade ambiental tenham considerável influência sobre a comunidade de FMA (van der GAST *et al.*, 2011).

De qualquer modo, a maior colonização micorrízica nem sempre corresponde a benefícios para a planta hospedeira (SMITH *et al.*, 2011), visto que existe um *continuum* de relações que vai desde o mutualismo até o parasitismo (JOHNSON *et al.*, 1997). Além disso, ocorrem diferenças quanto ao hábito simbiótico destes fungos, por exemplo, enquanto Glomeraceae é reconhecida pela grande percentagem de colonização de raízes o que favorece a proteção contra patógenos, Gigasporaceae apresenta grande quantidade de hifas extrarradiculares que favorece a absorção de nutrientes (MAHERALI e KLIRONOMOS, 2007), tendo, ainda, variações funcionais em nível de espécie (ÖPIK *et al.*, 2006). Portanto, em termos de benefícios nutricionais para as plantas, a biomassa destes organismos e a sua distribuição no solo podem ser mais importantes que a percentagem de colonização das raízes, por conseguinte, trabalhos futuros devem considerar estas questões.

A avaliação da abundância de esporos não indicou diferenças entre os sistemas agroecológico, convencional e fragmento de mata na camada de solo de 0-20 cm (FIGURA 3), entretanto, pode existir diferenças significativas em camadas mais profundas, sobretudo em sistemas agrofloretais de café (CARDOSO *et al.* 2003; MULETA *et al.*, 2008), nos quais a zona rizosférica das árvores atingem maiores profundidades no perfil do solo. Destaca-se também considerável diversidade de espécies de FMA nas camadas de solo de 20-70 cm, nas quais determinadas espécies podem esporular preferencialmente (OEHL *et al.*, 2005). Neste caso, estudos futuros sobre a dinâmica de FMA precisam considerar a amostragem de solo em camadas mais profundas (ARIAS *et al.*, 2012), bem como na serapilheira.

Ressalta-se que em todos os sistemas de cultivos de cafeeiro avaliados, a presença de plantas espontâneas foi consideravelmente alta, visto que o controle

(capina, roçada ou uso de herbicidas) é oneroso. Além disso, o uso de agrotóxicos é uma prática pouco difundida entre os cafeicultores da região e o solo é pouco revolvido, evitando o rompimento da rede de hifas que são importante fonte de inóculos. A incidência de plantas espontâneas pode favorecer a abundância e composição da comunidade de FMA nas áreas de cultivo de café (ARIAS *et al.*, 2012), pois determinada planta pode associar-se com fungos de diferentes táxons devido o baixo grau de especificidade (PARNISK, 2008; SMITH *et al.*, 2011), garantindo a permanência destes fungos no ambiente. Estudos sobre o papel de FMA em plantas espontâneas são escassos (MASSENSINI *et al.*, 2014) e precisam ser considerados, sobretudo, em trabalhos realizados em condições naturais como este em questão.

Os resultados evidenciaram o efeito temporal sobre a abundância de esporos, visto a menor esporulação durante o período chuvoso e aumento com o início da estação seca, corroborando com resultados sobre variações sazonais na abundância de esporos (GUADARRAMA e ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, 1999; ARIAS *et al.*, 2012; ZANGARO *et al.*, 2013), com indícios de que ocorre maior crescimento vegetativo do fungo no período chuvoso, enquanto o número de esporos diminui devido a germinação (MULETA *et al.*, 2007). É possível que o estresse hídrico durante a estação seca possa favorecer a esporulação (BONFIM *et al.*, 2010), uma vez que os esporos são estruturas de resistência, que possibilitam a manutenção destes organismos no ambiente.

Em sistema agroflorestal de café e área de mata no México, ARIAS *et al.* (2012) discutiram a respeito do papel da fenologia das plantas e de fisiologia das raízes sobre a grande abundância de esporos durante a estação seca. Entretanto, no presente estudo evidenciou-se que embora o estágio fenológico da planta exerça influência sobre a abundância de esporos, fatores ambientais como menor umidade do solo durante o período seco, que induzem ao estresse hídrico, pode se sobrepor ao referido efeito. Desta forma, para a abundância de esporos a fenologia da planta parece ser menos importante (ZANGARO *et al.*, 2013), pois soma-se a outros fatores ambientais.

Destaca-se que S1 e S2 não apresentaram diferença para a abundância de esporos, entretanto, são localidades espacialmente próximas, levantando a possibilidade dos efeitos edafoclimáticos locais exercerem papel relevante em nível de abundância de esporos e ciclos populacionais de FMA. De qualquer modo, aspectos relacionados à distribuição e biogeografia destes organismos ainda é pouco entendido, porém, aspectos

como manejo do solo, heterogeneidade ambiental e distância geográfica parecem determinar a distribuição espacial da comunidade de FMA (van der GAST *et al.*, 2011).

Embora a abundância de esporos seja uma importante fonte de inóculo e represente aspectos do histórico da comunidade de FMA isto nem sempre representa ganhos em termos funcionais para os agroecossistemas. Neste caso, é preciso reconhecer que em ecossistemas mais equilibrados o fungo pode investir mais em energia para o crescimento vegetativo do que para a produção de esporos (STÜMER e SIQUEIRA, 2011, HIGO *et al.*, 2013), ou ainda apresentar abundância de esporos e ter colonização, distribuição de hifas no solo ou mesmo biomassa relativa reduzida (DOUDS JR. e MILLNER, 1999).

A técnica de PCR-DGGE indicou diferenças na distribuição dos FMA em função do sistema de manejo do cafeeiro, com os sistemas agroecológicos exibindo nível intermediário de similaridade entre os fragmentos de mata e os sistemas convencionais, que podem relacionar-se a benefícios de práticas como a implantação de sistemas agroflorestais e uso da adubação verde na manutenção da biodiversidade de FMA. Salienta-se a existência de experiências exitosas com estas práticas na Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, principalmente, em termos de redução de insumos e melhoria na qualidade dos solos (DUARTE *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012), minimizando os impactos negativos da agricultura (BAINARD *et al.*, 2011). Sabe-se, ainda, que espécies de adubo verde favorecem o aumento do potencial de inóculo destes fungos, configurando-se como prática importante em áreas de monocultivo permanente, a exemplo de café (COLLOZI FILHO e CARDOSO, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2009), com implicações importantes em nível de microclima, efeito rizosférico e disponibilização de nutrientes para a cultura de interesse.

Existem evidências que técnicas de manejo convencional baseado no monocultivo e menor cobertura do solo são responsáveis por selecionar espécies menos eficientes e diminuir a diversidade (DOUDS JR. e MILLNER, 1999; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), interferindo negativamente na estrutura da comunidade de FMA, sem necessariamente reduzir a abundância de esporos ou a colonização micorrízica, conforme indicações de PCR-DGGE observadas neste trabalho. É preciso reconhecer, ainda, que os efeitos deletérios dos sistemas convencionais podem ser maiores em cultivos anuais (HELGASON *et al.*, 1998; TCHABI *et al.*, 2008; SCHNEIDER *et al.*,

2011) devido a práticas como o constante revolvimento do solo que rompe a rede de hifas e expõe estruturas fúngicas a radiação, variações de umidade e predadores (CARRENHO *et al.*, 2010).

O fator temporal afetou a comunidade de FMA, possivelmente pela alteração de variáveis como temperatura e umidade do solo. Neste caso, o agrupamento do sistema agroecológico S2 (Sistema Agroflorestal) com os fragmentos de mata durante o período de granação pode estar associado a características microclimáticas (p.ex. luz, temperatura e umidade do solo) (GUADARRAMA e ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, 1999; HELGASON e FITTER, 2009) devido ao sombreamento, que pode influenciar a fenologia da planta hospedeira e biota associada, e, conseqüentemente, modular favoravelmente a composição e a diversidade da comunidade de FMA.

Cabe ressaltar que o aumento da diversidade de FMA nos campos de cultivo é um aspecto grandemente desejável para melhorar a sustentabilidade dos cultivos (MA *et al.*, 2005), com fortes indicações de que a presença de fungos filogeneticamente distintos evita a exclusão competitiva e favorece a coexistência, permitindo a complementaridade de funções, a exemplo da maior absorção de nutrientes e resistência a patógenos (MAHERALI e KLIRONOMOS, 2007). Sugere-se que a menor diversidade associada à fertilização dos solos pode selecionar espécies agressivas de FMA, capazes de drenar mais fotoassimilados das plantas hospedeiras (JOHNSON, 1993; DOUDS JR. e MILLNER, 1999), deslocando a relação para o lado do parasitismo. Deste modo, ganha destaque os sistemas agroecológicos de produção de café, com baixos distúrbios, que possam manter a cobertura do solo e favorecer a rede de micélio por meio do cultivo mínimo.

Não obstante, as análises de componentes principais revelaram que muito dos efeitos dos sistemas de cultivo sobre a comunidade de FMA podem relacionar-se a alterações nas características químicas do solo devido à adição de fertilizantes minerais e calagem. Os resultados observados reforçam o argumento que a mudança no padrão da comunidade de FMA pode não ser resultado da monocultura por si apenas, mas reflete a influência das práticas agrícolas intensivas baseadas em agroquímicos (HELGASON *et al.*, 1998), somado a fatores microclimáticos como o nível de cobertura do solo.

Dentre os efeitos das práticas agrícolas, merece destaque o excesso de fertilizantes solúveis aplicados em campo, principalmente P, visto que a sua disponibilidade pode afetar a relação simbiótica entre planta e FMA (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), conforme a quantidade de P utilizada, frequência de aplicação e nível original de P no solo (THEODORO *et al.*, 2003), além das espécies de planta e fungo envolvidos na simbiose (BHATTACHARYA e BAGYARAJ, 2002).

A influência do P nos sistemas agroecológicos de cafeeiro durante o período de floração pode estar associada à adubação organomineral e/ou adubação verde. Neste caso, é necessário reconhecer os efeitos, principalmente, de fertilizantes orgânicos quimicamente ricos, os quais podem inviabilizar o aproveitamento da simbiose, uma vez que a simples substituição de fertilizantes químicos por adubos orgânicos não garante a micorrização (TRINDADE *et al.*, 2010). Por outro lado, a matéria orgânica, sobretudo em camadas de solo mais profundas, pode ser importante para manter uma maior diversidade e abundância destes organismos nestas profundidades, uma vez que tem papel importante na aeração e umidade do solo, além da biomassa de raízes, (HIGO *et al.*, 2013), os quais afetam significativamente a fisiologia destes fungos.

A influência do pH nos sistemas convencionais de cafeeiro durante o período de floração pode estar relacionado a prática da calagem, frequentemente entendida como benéfica para a colonização, por eliminar fatores fungistáticos (SIQUEIRA e COLOZZI FILHO, 1986), além de favorecer a maior ocorrência de plantas espontâneas que estimulam diferentes espécies de FMA (ANDRADE *et al.*, 1995). Entretanto, embora seja reconhecida grande plasticidade fenotípica destes organismos com relação ao pH, uma vez que são encontrados em solos com pH variando de 3 a 10 (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), existem estudos que apontam modificações nas populações de FMA devido a calagem (SIQUEIRA *et al.*, 1990).

No período de colheita, a capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (T) e o K influenciaram os sistemas de manejo agroecológico e estes receberam significativas porções deste elemento via fertilizantes minerais. De qualquer modo, embora o K seja requerido em grandes quantidades pelo cafeeiro, informações relacionadas aos efeitos de sua disponibilidade sobre os FMA são escassas, principalmente, em condições de campo.

Os fatores químicos do solo como a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  têm sido reconhecidos como aspectos importantes para os FMA, em nível de germinação de esporos e colonização de plantas (SIQUEIRA *et al.*, 1990), sendo que estes influenciaram a comunidade destes organismos nos sistemas convencionais, principalmente no período de colheita.

Embora se perceba tendências de variação na diversidade de FMA em função de características químicas do solo, as correlações são complexas e podem sofrer influência de variáveis não levantadas, especialmente a umidade, aeração e temperatura do solo. Deste modo, o estudo destes organismos em função das propriedades físico-químicas do solo, tipos e doses de agroquímicos devem ser investigados.

## **5. CONCLUSÕES**

Os sistemas de manejo e o estágio fenológico da planta afetam a diversidade e distribuição de FMA.

Os sistemas agroecológicos do cafeeiro, baseados em sistemas agroflorestais e adubação verde são capazes de favorecer a comunidade de FMA no solo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIERI, M. A. Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável. Editorial Nordan-Comunidad. 1999, 338 p.
- ALVES, E. P. Análise agronômica e financeira de um sistema agroflorestal com cafeeiros e bananeiras em Araponga, MG. 2013. 44 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2013.
- ANDRADE, S. A. L.; MAZZAFERA, P.; SCHIAVINATO, M. A. e SILVEIRA, A. P. D. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *Journal of Agricultural Science*, 147: 105-115, 2009.
- ARIAS, R. M.; HEREDIA-ABARCA, G.; SOSA, V. J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores under different coffee production systems and in a tropical montane cloud forest patch in Veracruz Mexico. *Agroforestry Systems*. 85: 179-193, 2012.
- ATUL-NAYYAR, A.; HAMEL, C.; HANSON, K.; GERMIDA, J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*, 19: 239-246, 2009.
- BAINARD, L. D.; KLIRONOMOS, J. N.; GORDON, A. M. Arbuscular mycorrhizal fungi in tree-based intercropping systems: A review of their abundance and diversity. *Pedobiologia*, 54: 57-61, 2011.
- BHATTACHARYA, S.; BAGYARAJ, D. J. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal isolates on Arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Biological Agriculture & Horticulture*, 20: 125-131, 2002.
- BONFIM, J. A.; MATSUMOTO, S. N.; LIMA, J. M.; CÉSAR, F. R. C. F.; SANTOS, M. A. F. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e aspectos fisiológicos em cafeeiros cultivados em sistema agroflorestal e a pleno sol. *Bragantia*, 69: 201-206, 2010.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ANCIAR , Monograph, 347p. 1996.
- CARDOSO, E. J. B. N.; CARDOSO, I. M.; NOGUEIRA, M. A.; BARETA, C. R. D. M.; PAULA, A. M. de. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.(Ed) Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: UFLA, 2010, 716 p.
- CARDOSO, I. M.; BODDINGTON, C. JANSSEN, B. H.; OENEMA, O; KUYPER, T. Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. *Agroforestry Systems*, 58: 33-43, 2003.
- CARDOSO, I. M.; GUIJT, I; FRANCO, F. S.; CARVALHO, A. F.; FERREIRA NETO, P. S. Continual learning for agroforestry system design: University, NGO and farmer partnership in Minas Gerais, Brazil. *Agricultural Systems*. 69: 235-257, 2001.

- CARDOSO, I. M.; KUYPER, T. W. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 116: 72-84, 2006.
- CARRENHO, R.; GOMES-DA-COSTA, S. M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A. Fungos micorrízicos arbusculares em agrossistemas brasileiros. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. (Ed) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010, 716 p.
- CARVALHO, A. F. de. Água e radiação em Sistemas Agroflorestais com café, no território da Serra do Brigadeiro – MG. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2011.
- COLLOZI FILHO, A.; CARDOSO, E. J. B. N. Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 2033-2042, 2000.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café: safra 2014: Primeiro levantamento, janeiro de 2014. Brasília, 2014. Disponível em: <  
[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_01\\_17\\_09\\_29\\_46\\_boletim\\_cafe\\_-\\_original\\_normalizado.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_17_09_29_46_boletim_cafe_-_original_normalizado.pdf)>. Acesso em: 21 jan. 2014.
- CORNEJO, P.; AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J. M.; FERROL, N. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 241: 265-270, 2004.
- DOUDS JR., D. D.; MILLNER, P. D. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 77-93, 1999.
- DUARTE, E. M. G.; CARDOSO, I. M.; FÁVERO, C. Terra Forte. *Agriculturas*, 5: 11-15, 2008.
- GERDEMAN, J. W.; NICHOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46: 235-244, 1963.
- GIANINAZZI, S.; ARMELLE, G.; BINET, M.; TUINEN, D. VAN.; REDECKER, D.; WIPF, D. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20: 519–530, 2010.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. Na evaluation of the techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84:489-500, 1980.
- GLIESSMAN S.R. *Agroecology: the ecology of sustainable food systems*, CRC Press, Taylor e Francis, New York, USA, 2007, 384 p.
- GUADARRAMA, P.; ÁLVAREZ-SANCHEZ, J. F. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, México. *Mycorrhiza*, 8: 267-270, 1999.
- HELGASON, T.; TWITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394-431, 1998.

- HELGASON, T; FITTER, A. H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *Journal of Experimental Botany*, 60: 2465-2480, 2009.
- HIGO, M.; ISOBE, K.; YAMAGUCHI, M. RHAЕ, A.; DRIJBER; ELIZABETH, S. JESKE; ISHII, R. Diversity and vertical distribution on indigenous arbuscular mycorrhizal fungi under two soybean rotational systems. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 1085-1096, 2013.
- IPSILANTIS, I.; SAMOURELIS, C.; KARPOUZAS, D. G. The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 45: 147-155, 2012.
- JOHNSON, N. C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* 3: 749-757, 1993.
- JOHNSON, N. C.; GRAHAM, J. H.; SMITH, F. A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist.*, 135: 575-585, 1997.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censos Populacionais Agropecuários. 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em 28 de março de 2014.
- KER, J. C. Mineralogia, sorção e dessorção de fosfato, magnetização e elementos-traços de Latossolos do Brasil. 1995. 181 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 1995.
- KOWALCHUCK, G. A. De SOUZA, F. A.; VAN VEEN, J. A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*. 11: 571-581, 2002.
- LEHMANN, A.; VERESOGLOU, S. D.; LEIFHEIT, E. F.; RILLING, M. C. Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants – A meta-analysis. *Soil Biology e Biochemistry*, 69: 123-131, 2014.
- LIANG, Z.; DRIJBER, R. A.; LEE, D. J.; DWIETAK, I. M.; HARRIS, S. D.; WEDIN, D. A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology e Biochemistry*. 40:956-966, 2008.
- MA, W. K.; SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1589-1597, 2005.
- MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J. N. Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*. 316:1746-1748, 2007.
- MASSENSINI, A. M.; BONDUKI, V. H. A.; TÓTOLA, M. R.; FERREIRA, F. A.; COSTA, M. C. Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants. *Mycorrhiza*, 24: 153-159, 2014.
- MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*, Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

- MULETA, D., ASSEFA, F., NEMOMISSA, S.; GRANHALL, U. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern. *Forest Ecology and Management*, 241:145–154, 2007.
- MULETA, D.; ASSEFA, F.; NEMOMISSA, S.; GRANHALL, U. Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi spores in soil of southwestern Ethiopia. *Biology and Fertility of Soils*, 44:653–659, 2008.
- NUNES, L. A. P. L.; DIAS, L. E.; JUCKSCH, I.; BARROS, N. F.; KASUYA, M. C. M.; CORREIA, M. E. F. Impacto do monocultivo de café sobre os indicadores biológicos do solo na zona da mata mineira. *Ciência Rural*, v.39, n.9, p.2467-74, 2009.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E.; INEICHEN, K.; RIS, E. A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. C Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist*, 165: 273-283, 2005.
- OLIVEIRA, A. C. C. de. Serviços Ecológicos em Sistemas Agroflorestais com Café. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). 2011. 111 p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2013.
- ÖPIK, M.; MOORA, M.; LIIRA, J.; ZOBEL, M. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology*, 94: 778-790, 2006.
- PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature*, 6:763-75, 2008.
- PETERSEN, P. F.; WEID, J. M. von der.; FERNANDES, G. B. Agroecologia: reconciliando agricultura e natureza. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 30, n 252, 2009.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-161, 1970.
- REIS, V. M.; ANDRADE, G.; FARIA, S. M. de.; SILVEIRA, A. P. D. de. Interações de fungos micorrízicos arbusculares com outros microrganismos do solo. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.(Ed) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010, 716 p.
- SÁNCHEZ, C.; CABALLERO, D.; CUPULL, R.; GONZÁLES, C.; URQUIAGA, S.; RIVERA, R. Los abonos verdes y La inoculación micorrízica de plántulas de *Coffea arabica* sobre suelos cambisoles gléyicos. *Cultivos Tropicales*, 30: 25-30, 2009.
- SCHNEIDER, J.; KLAUBERG FILHO, O.; FONTOURA, S. M. V.; ALVES, M. V. Influence de diferentes sistemas de manejo e calagem em experimentos de longa duração sobre fungos micorrízicos arbusculares. *Ciência e Agrotecnologia*, 4: 701-709, 2011.

- SCHWEIGER, P.; JAKOBSEN, I. Laboratory and Field methods for measurement of hyphal uptake of nutrients in soil. *Plant and Soil*, 226: 237-244, 2000.
- SILVE, M. E. Ocorrência e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em um ecossistema de cafeeiro submetido a diferentes métodos de controle de plantas daninhas. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2011.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 291-295, 1992.
- SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; FLORES-AYLAS, W. W. e GUIMARÃES, P. T. G. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza*, 7: 293-300, 1998.
- SIQUEIRA, J. O.; ROCHA JÚNIOR, W. F.; OLIVEIRA, E.; COLOZZI-FILHO, A. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: Associated effects on the growth and nutrition of *Brachiaria* Grass (*Brachiaria decumbens*). *Biology and Fertility of Soils*, 10: 65-71, 1990.
- SIQUEIRA, J. O.; ROCHA JR., W. F.; OLIVEIRA, E.; COLLOZI FILHO, A. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: associated effects on the growth and nutrition of *brachiaria* Grass (*Brachiaria decumbens*). *Biology and fertility of Soils*, 10: 475-479, 1980.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 10: 207-211, 1986.
- SMITH, F. A.; SMITH, S. E. What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonisation of many economically important crop plants? *Plant Soil*, 348:63–79, 2011.
- SMITH, S. E.; JAKOBSEN, I.; GRONLUND, M. SMITH, A. F. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understating and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology*, 156: 1050-1077, 2011.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. *Mycorrhizal symbiosis*. Academy Press, Cambridge, MA. 1997, 605 p.
- SOUZA, F. A. de.; STÜRMER, S. L.; CARRENHO, R. e TRUFEM, S. F. B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A. de.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.(Ed) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010, 716 p.
- SOUZA, H. N. de.; CARDOSO, M. I.; MENDONÇA, E. S.; CARVALHO, A. F.; OLIVEIRA, G. B. de.; GJORUP, D. F.; BONFIM, V. R. Learning by doing: a

- participatory methodology for systematization of experiments with agroforestry systems, with a example of its application. *Agroforestry Systems*, 85: 247-62, 2012.
- STÜRMER, S.L; SIQUEIRA, J. O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza*, 21: 255-267, 2011.
- TCHABI, A.; COYNE, D.; HOUNTONDJI, F.; LAWOUIN, L.; WIEMKEN, A.; OEHL, F. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in sub-Saharan Savannas of Benin, West Africa, as affected by agricultural land use intensity and ecological zone. *Mycorrhiza*, 18: 181–195, 2008.
- THEODORO, V. C. A. DE; ALVARENGA, M. I. N.; GUIMARÃES, R. J & MOURÃO JÚNIOR, M. Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. *Acta Scientiarum Agronomy*, 25: 147-153, 2003.
- TRINDADE, A. V.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; DA SILVEIRA, A. P D. Micorrizas arbusculares na produção de mudas de plantas frutíferas e café. In: SIQUEIRA, J. O. SOUZA, F. A. de.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.(Ed) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010, 716 p.
- TRISTÃO, F. S. M.; ANDRADE, S. A. L. DE; SILVEIRA, A. P. D. DA. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. *Bragantia*, 65: 649-658, 2006.
- van der GAST, C. J.; GOSLING, P.; TIWARI, B.; BENDING, G. D. Spatial scaling of arbuscular mycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. *Environmental Microbiology*, 13: 241-249, 2011.
- WEZEL A, BELLON S, DORÉ T, FRANCIS C, VALLOD D, DAVID C. Agroecology as a science, a movement, and a practice. *Agronomy for Sustainable Development*., 29: 503-515, 2009.
- ZANGARO, W.; ROSTIROLA, L. V.; de SOUZA, P. B.; ALVES, R. A.; LESCANO, L. E. A. M.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A.; CARRENHO, R. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza*, 21: 221-233, 2013.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A – Análise estatística em parcelas subdivididas para a percentagem de colonização**

Tabela 1A: Análise em parcela subdividida para percentagem de colonização micorrízica do sistema radicular de cafeeiro agroecológico e convencional e fragmento de mata em três períodos e três localidades.

| <b>Fonte de Variação</b>                      | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Soma de Quadrado</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b>   |
|---|---------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|
| <b>Sistemas</b>                               | 2                         | 2211,40074              | 1105,70037            | 11,8111 ** |
| Resíduo                                       | 6                         | 561,69037               | 93,61506              |            |
| <b>Parcelas</b>                               | 8                         | 2773,09111              |                       |            |
| <b>Período</b>                                | 2                         | 3157,08667              | 1578,54333            | 10,8732 ** |
| Interação Categoria X Período                 | 4                         | 1067,93926              | 266,98481             | 1,8390 ns  |
| Resíduo                                       | 12                        | 1742,12296              | 145,17691             |            |
| <b>Subparcelas</b>                            | 26                        | 8740,24000              |                       |            |
| <b>Localidades</b>                            | 2                         | 610,20074               | 305,10037             | 2,2117 ns  |
| Interação Categorias X Localidades            | 4                         | 273,85185               | 68,46296              | 0,4963 ns  |
| Interação Períodos X Localidades              | 4                         | 2056,58815              | 514,14704             | 3,7272 *   |
| Interação Categorias X Períodos X Localidades | 8                         | 1448,53926              | 181,06741             | 1,3126 ns  |
| Resíduo                                       | 36                        | 4966,06000              | 137,94611             |            |
| <b>Total</b>                                  | 80                        | 18095,48000             |                       |            |

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 01$ ) pelo teste de Tukey

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $01 \leq p < 05$ ) pelo teste de Tukey

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Tabela 2A: Percentagem de colonização do sistema radicular de cafeeiro agroecológico e convencional e espécies de fragmento de mata, em três períodos e três localidades.

| Sistema                  | Período       |                 | Localidade    |           |               |
|--------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------|---------------|
|                          | Colonização % |                 | Colonização % |           | Colonização % |
| <b>Agroecológico</b>     | 25,47 b       | <b>Floração</b> | 35,82 a       | <b>S1</b> | 30,31 a       |
| <b>Convencional</b>      | 25,04 b       | <b>Granação</b> | 20,71 b       | <b>S2</b> | 25,11 a       |
| <b>Fragmento de Mata</b> | 36,33 a       | <b>Colheita</b> | 30,30 a       | <b>S3</b> | 31,41 a       |

As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3A: Percentagem de colonização do sistema radicular de cafeeiro agroecológico e convencional e espécies de fragmento de mata para a interação entre períodos e localidades.

| Período                     | Localidade*   |               |               |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                             | <b>S1</b>     | <b>S2</b>     | <b>S3</b>     |
|                             | Colonização % | Colonização % | Colonização % |
| <b>Floração (Nov. 2012)</b> | 47,12 aA      | 26,72 aB      | 33,62 Aab     |
| <b>Granação (Mar. 2013)</b> | 17,99 bA      | 20,07 aA      | 24,08 aA      |
| <b>Colheita (Jul. 2013)</b> | 25,82 bA      | 28,56 aA      | 36,52 aA      |

\*Ver detalhes na TABELA 01. As médias seguidas pela mesma letra minúscula (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

**APÊNDICE B – Análise estatística em parcelas subdivididas para o número de esporos**

Tabela 1B: Análise em parcela subdividida para abundância de esporos no solo em sistema agroecológico e convencional de cafeeiro e fragmento de mata em três períodos e três localidades.

| <b>Fonte de Variação</b>                    | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>Soma de Quadrado</b> | <b>Quadrado Médio</b> | <b>F</b>   |
|---|---------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|
| <b>Sistemas</b>                             | 2                         | 0,06927                 | 0,03464               | 1,2805 ns  |
| Resíduo                                     | 6                         | 0,16230                 | 0,02705               |            |
| <b>Parcelas</b>                             | 8                         | 0,23157                 |                       |            |
| <b>Período</b>                              | 2                         | 1,74938                 | 0,87469               | 38,2961 ** |
| Interação Sistema X Período                 | 4                         | 0,17861                 | 0,04465               | 19551 ns   |
| Resíduo                                     | 12                        | 0,27408                 | 0,02284               |            |
| <b>Subparcelas</b>                          | 26                        | 2,43365                 |                       |            |
| <b>Localidades</b>                          | 2                         | 0,34728                 | 0,17364               | 6,7431 **  |
| Interação Sistemas X Localidades            | 4                         | 0,86352                 | 0,21588               | 8,3834 **  |
| Interação Períodos X Localidades            | 4                         | 0,16206                 | 0,04051               | 1,5733 ns  |
| Interação Sistemas X Períodos X Localidades | 8                         | 0,19839                 | 0,02480               | 0,9630 ns  |
| Resíduo                                     | 36                        | 0,92703                 | 0,02575               |            |
| <b>Total</b>                                | 80                        | 4,93193                 |                       |            |

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 01$ ) pelo teste de Tukey

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $01 \leq p < 05$ ) pelo teste de Tukey

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Tabela 2B: Número de esporos nas amostras de solo em cultivo de cafeeiro agroecológico e convencional e fragmento de mata em três períodos e três localidades.

| Sistemas                 | Períodos      |                 | Localidades   |           |               |
|--------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------|---------------|
|                          | Nº de esporos |                 | Nº de esporos |           | Nº de esporos |
| <b>Agroecológico</b>     | 544,33a       | <b>Floração</b> | 317,48 b      | <b>S1</b> | 607,41 a      |
| <b>Convencional</b>      | 575,04 a      | <b>Granação</b> | 715,70 a      | <b>S2</b> | 566,93 a      |
| <b>Fragmento de Mata</b> | 468,59 a      | <b>Colheita</b> | 554,78 a      | <b>S3</b> | 413,63 b      |

As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para atender o pressuposto de normalidade os dados foram transformados para  $\log(x)$ .

Tabela 3B: Número de esporos das amostras de solo em cultivo de cafeeiro agroecológico e convencional e fragmento de mata para a interação entre sistemas e localidades.

| Sistema                  | Localidade*   |               |               |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|
|                          | <b>S1</b>     | <b>S2</b>     | <b>S3</b>     |
|                          | Nº de esporos | Nº de esporos | Nº de esporos |
| <b>Agroecológico</b>     | 575,44 abA    | 537,03 aA     | 302,00 bB     |
| <b>Convencional</b>      | 645,65 aA     | 602,56 aA     | 309,03 bB     |
| <b>Fragmento de mata</b> | 407,38 bAB    | 331,13 bB     | 549,54 aA     |

\*Ver detalhes na Tabela 01. As médias seguidas pela mesma letra minúscula (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.