

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

ACÚMULO DE ÁCIDO OXÁLICO E CRISTAIS DE CÁLCIO EM ECTOMICORRIZAS DE EUCALIPTO. I - PRODUÇÃO DE ÁCIDO OXÁLICO E CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES EM RAÍZES LATERAIS FINAS COLONIZADAS POR FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS⁽¹⁾

Jhon Alexander Zambrano Gonzalez⁽²⁾, Maurício Dutra Costa⁽³⁾, Ivo
Ribeiro Silva⁽⁴⁾, Júlio César Lima Neves⁽⁴⁾, Nairam Félix de
Barros⁽⁵⁾ & Arnaldo Chaer Borges⁽⁶⁾.

RESUMO

O eucalipto apresenta ótimo crescimento em solo com baixa fertilidade, mas pouco se sabe sobre a participação das ectomicorrizas e de ácidos orgânicos na aquisição e no acúmulo de nutrientes pela planta em campo. A produção de ácido oxálico e sua relação com as concentrações de P, Ca, Mg e K foram avaliadas em ectomicorrizas e raízes laterais finas de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, de 2,5 anos de idade, na região de Viçosa, MG. A área de estudo apresenta topografia típica em meia laranja, de vertente côncavo-convexa. Foram também avaliadas as concentrações desse composto no solo rizosférico, não rizosférico e ectomicorrizosférico. As maiores percentagens de colonização micorrízica foram observadas na área de encosta, onde havia limitada disponibilidade de nutrientes e alta saturação de Al. As concentrações de ácido oxálico + oxalato corresponderam, em mg kg⁻¹: folhas, 324,6; ectomicorrizas, 208,3; raízes laterais finas não colonizadas, 183,1. Já no solo, as concentrações foram maiores no solo ectomicorrizosférico, com 183,7 mg kg⁻¹, seguido pelo solo rizosférico, com 134,3 mg kg⁻¹, e pelo solo não rizosférico, com 76,0 mg kg⁻¹. As maiores concentrações de ácido oxálico e P (p < 0,05) nas ectomicorrizas da área do topo, 117,3 mg kg⁻¹ e 6,3 g kg⁻¹, respectivamente, sugerem que as populações de fungos ectomicorrízicos nesta

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Recebido para publicação em abril de 2008 e aprovado em março de 2009.

⁽²⁾ Estudante de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Av. PH Rolfs s/n, CEP 36570-000 Viçosa (MG). E-mail: alexfungi@yahoo.com.mx

⁽³⁾ Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia, UFV. E-mail: mdcosta@ufv.br

⁽⁴⁾ Professor Adjunto do Departamento de Solos, UFV. E-mails: ivosilva@ufv.br; julio_n2003@yahoo.com.br

⁽⁵⁾ Professor Titular do Departamento de Solos, UFV. E-mail: nfbarros@ufv.br

⁽⁶⁾ Professor Titular do Departamento de Microbiologia, UFV. E-mail: chaer@ufv.br

área têm papel importante na solubilização e disponibilização de nutrientes para o hospedeiro. Não foram observadas correlações positivas significativas entre a produção de ácido oxálico e as concentrações de Ca nas raízes laterais finas e nas ectomicorrizas de eucalipto.

Termos de indexação: rizosfera, exsudatos radiculares, potássio, fósforo, magnésio.

SUMMARY: ACCUMULATION OF OXALIC ACID AND CALCIUM CRYSTALS IN EUCALYPT ECTOMYCORRHIZAS. I – OXALIC ACID PRODUCTION AND NUTRIENT CONCENTRATION IN FINE LATERAL ROOTS COLONIZED WITH ECTOMICORRHIZAL FUNGI

Eucalypt is highly efficient at growing in nutrient-poor soils, but little is known about the role of ectomycorrhizas and organic acids in nutrient uptake and storage under field conditions. Oxalic acid production and its relationships with Ca, P, K, and Mg concentrations were evaluated in the ectomycorrhizas and fine lateral roots of a 2.5 year-old Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla hybrid grown in a mountainous area at Viçosa, MG, Brazil. Oxalic acid concentrations were also evaluated in rhizospheric, non-rhizospheric, and ectomycorrhizospheric soil. Mycorrhizal colonization was highest in a slope area with limited nutrient availability and high Al saturation. The oxalic acid concentration was 324.6 mg kg⁻¹ in the leaves; 208.3 mg kg⁻¹ in ectomycorrhizas; and 183.1 mg kg⁻¹ in non-mycorrhizal fine lateral roots. The concentrations in the soil were highest in the ectomycorrhizospheric soil, 183.7 mg kg⁻¹, followed by the rhizospheric soil, 134.3 mg kg⁻¹, and finally, by the non-rhizospheric soil, 76.0 mg kg⁻¹. The highest oxalic acid and P concentrations in the ectomycorrhizas found in the hilltop area, 117.3 mg kg⁻¹ and 6.3 mg kg⁻¹, respectively, suggest that the population of ectomycorrhizal fungi in this area plays an important role in nutrient solubilization and supply to the host plant. No significant positive correlations were observed between oxalic acid production and Ca concentrations in the fine lateral roots and ectomycorrhizas of the eucalypt trees.

Index terms: rhizosphere, root exudates, potassium, phosphorus, magnesium.

INTRODUÇÃO

A área ocupada por plantações florestais no Brasil é de, aproximadamente, 5,7 milhões de ha, sendo 3,5 milhões reflorestados com *Eucalyptus* spp. (SBS, 2008), concentrados principalmente nas Regiões Sul e Sudeste, com mais de 56 % das florestas plantadas no país. O Estado de Minas Gerais destaca-se neste contexto com área plantada de aproximadamente 1,2 milhão de ha (SBS, 2008). O valor total da produção do setor florestal em 2006 foi de US\$ 37,3 bilhões, ou seja, 3,5 % do PIB nacional, incluindo os processos industriais de produção de celulose, papel, móveis, a siderurgia, o carvão vegetal, a madeira industrializada e produtos florestais não madeireiros. Estima-se que o setor de base florestal emprega direta e indiretamente cerca de 6,9 milhões de pessoas (SBS, 2008). Com relação à exportação, o setor tem participação com cerca de 7,3 % do valor total, contribuindo com 10 bilhões de dólares por ano (SBS, 2008). Considerando-se o saldo inexpressivo de importações do setor, a economia florestal tem sido historicamente responsável por um dos cinco maiores saldos comerciais positivos do país.

O grande sucesso dos empreendimentos florestais com base no eucalipto deve-se à elevada produtividade nas condições favoráveis de clima no Brasil. Os plantios de eucalipto apresentam elevada absorção de nutrientes como consequência da grande biomassa produzida (Barros & Comerford, 2002). O acúmulo de nutrientes na fitomassa de plantas de eucalipto é maior durante os períodos iniciais de crescimento, diminuindo consideravelmente com sua maturação (Barros & Novais, 1996). As demandas por Ca, N, K, Mg e P atingem os níveis máximos na fase juvenil, sendo utilizados principalmente para a formação da copa (Schumacher & Caldeira, 2001). A absorção e a distribuição de nutrientes para os diferentes componentes da planta de eucalipto dependem, entre outros fatores, da espécie e da disponibilidade de nutrientes no solo (Barros & Novais, 1996; Leite, 2001).

O acúmulo de nutrientes em plantas de eucalipto varia em função da idade e das características do solo. As faixas de acúmulo de nutrientes nas plantas de *Eucalyptus* spp. no Brasil são, em kg ha⁻¹: Ca, 280 a 795; K, 250 a 730; Mg, 90 a 200; e P, 23 a 74 (Foelket,

2006). Alguns trabalhos demonstram elevado acúmulo de Ca na casca de eucalipto (Bargali et al., 1993; Neves, 2000; Leite, 2001).

No Brasil, os solos utilizados para a cultura de eucalipto, na sua maioria, apresentam reação ácida com valores de pH inferiores a 5,5, saturações de Al de até 90 %, baixos teores de matéria orgânica e teores limitantes de P, N e Ca (Vale et al., 1996). O Ca, por exemplo, encontra-se, frequentemente, em concentrações baixas e insuficientes para atender a demanda das plantações (Ritchey et al., 1982).

A associação micorrízica permite o melhor estabelecimento e desenvolvimento das espécies florestais em campo sob diversas condições ambientais (Smith & Read, 1997). As micorrizas arbusculares e ectomicorrizas promovem incrementos significativos da área radicular de absorção das plantas colonizadas, maximizando o aproveitamento de água e nutrientes, como o Ca, P, N e K (Smith & Read, 1997; Souza et al, 2004; Silva et al., 2007). A absorção de Ca, Mg e K em plantas de *E. urophylla* e *E. grandis*, inoculadas com fungos ectomicorrízicos (FEM), é significativamente maior do que a de plantas não inoculadas (Soares et al., 1989; Silva et al., 2007).

A produção de ácidos orgânicos, de enzimas extracelulares, a exemplo das fosfatases, e a maior exploração do solo pelas hifas são mecanismos pelos quais os FEM aceleram a liberação de nutrientes para a solução do solo e transportam nutrientes para o hospedeiro, favorecendo seu crescimento (Olsson et al., 2002). Entre os diversos ácidos orgânicos produzidos em quantidades significativas por microrganismos do solo e encontrados na solução de solos florestais, os mais comumente identificados são o oxálico, o cítrico e o acético (Fox & Comerford, 1990).

O crescimento do micélio de FEM em solos florestais acelera o processo de intemperismo mineral, aumentando a liberação de importantes nutrientes e sua absorção pelas plantas (Arocena & Glowa, 2000; Landeweert et al., 2001). A produção de ácido oxálico, produto do metabolismo fúngico, resulta geralmente na abundante produção de cristais de oxalato de Ca (CaOX) na superfície das hifas e rizomorfos de FEM (Cromack et. al., 1979; Arocena et al., 2001; Wallander et al., 2002). A acumulação de Ca em forma de CaOx em solo florestal colonizado pelo fungos ectomicorrízicos é alta, sendo os teores de Ca ligado ao oxalato, resultante do crescimento fúngico, maior do que o presente no solo como Ca trocável (Cromack et al., 1979).

Em florestas plantadas, a diversidade e especificidade de fungos micorrízicos é resultante da interação de vários fatores bióticos e abióticos (Smith & Read, 1997). Em algumas monoculturas florestais, a exemplo do eucalipto, é descrita a ocorrência de sucessão micorrízica do tipo micorriza arbuscular-ectomicorriza no transcurso dos primeiros anos do plantio (Bellei et al., 1992; Santos et al., 2001). No

Estado de Minas Gerais, foram descritas porcentagens de colonização micorrízica de até 30 % para FEM e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em raízes de *Eucalyptus* sp. de 3 anos de idade (Campos, 2004). Em Santa Catarina, 49 diferentes morfotipos de ectomicorrizas foram descritos em plantações de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* spp. (Giachini et al., 2000). Embora alguns estudos sobre a diversidade de FEM e a sucessão micorrízica tenham sido feitos no Brasil (Bellei et al., 1992; Giachini et al., 2000; Santos et al., 2001; Campos, 2004), pouco se sabe sobre a função das diferentes populações fúngicas no suprimento de nutrientes, a exemplo do Ca, para a planta hospedeira em campo.

A elucidação da relação entre a produção de ácidos orgânicos e o acúmulo de nutrientes efetuado por fungos ectomicorrízicos em associação com o eucalipto irá contribuir para o melhor entendimento do papel da associação ectomicorrízica na sustentabilidade dos plantios florestais em regiões com solos pobres em nutrientes, comuns no Brasil. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a produção de ácidos orgânicos e o acúmulo de nutrientes em raízes laterais finas de *Eucalyptus* sp., colonizadas ou não por FEM, em campo da região de Viçosa, MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área e caracterização física e química do solo

O estudo foi conduzido em junho de 2006, em área de plantio de híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*, com 2,5 anos de idade e espaçamento de 3 x 3 m, localizado no Município de Viçosa, Minas Gerais. A área utilizada apresenta topografia típica em meia laranja, de vertente côncavo-convexa, resultando em três posições topográficas distintas: topo (S, 20 ° 48 ' 10 " e W, 42 ° 54 ' 08,4 "), encosta (S, 20 ° 48 ' 07,0 " e W, 42 ° 54 ' 0,57 ") e baixada (S, 20 ° 48 ' 03,2 " e W, 42 ° 54 ' 05,7 ").

Em cada posição topográfica foi delimitada uma parcela de 900 m², sendo cada uma caracterizada por apresentar diferenças marcantes no crescimento das árvores e no depósito de serapilheira, a saber: topo = área com árvores de diâmetro médio de 9,7 cm, contendo 2.460 kg ha⁻¹ de serapilheira; encosta = área com árvores de diâmetro médio de 7,8 cm, contendo 1.239 kg ha⁻¹ de serapilheira; baixada = área com árvores de diâmetro médio de 11,7 cm e contendo 1.730 kg ha⁻¹ de serapilheira. O diâmetro médio representa a média de diâmetro à altura do peito (DAP) das 100 árvores constituintes da parcela em cada posição topográfica. As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. No topo, as árvores de classe inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe média,

entre 9 e 10 cm; e as de classe superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na área de encosta, as árvores da classe inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe média, entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe superior, DAP > 10,5 cm. Finalmente na área de baixada, as árvores de classe inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe média, DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e as de classe superior com DAP > 14,7 cm.

Em cada posição topográfica, foram selecionadas, aleatoriamente, três árvores de cada classe de diâmetro, considerando-as como três repetições. Amostras de solo, raízes e ectomicorrizas foram coletadas na linha e nas entrelinhas da parcela em diferentes distâncias do tronco de cada árvore, procurando-se amostrar a região do solo que continha maior quantidade de raízes absorptivas. A distância de amostragem foi estabelecida em estudo prévio, determinando-se a região de maior concentração de raízes em relação ao tronco das árvores. No topo, as amostras da linha foram coletadas a 50 cm do tronco nas classes inferior e média, e a 100 cm na classe superior. As amostras das entrelinhas foram coletadas a 50 cm nas três classes de árvore. Na área de encosta, as amostras da linha foram coletadas a 100 cm do tronco, nas três classes de diâmetro, e as amostras das entrelinhas, a 100 cm, nas classes média e superior, e a 50 cm, na classe inferior. Finalmente, na área de baixada, as amostras da linha foram coletadas a 100 cm do tronco na classe de diâmetro inferior e a 150 cm nas classes média e superior. As amostras da entrelinha foram coletadas a 50 cm na classe inferior e média e a 100 cm na classe superior.

Para a caracterização físico-química do solo, cinco amostras simples foram coletadas aleatoriamente na profundidade de 0–20 cm e misturadas para constituir uma amostra composta de cada parcela. As amostras foram secas ao ar, passadas em peneira com malha de 2 mm e submetidas às análises de fertilidade e granulometria (Quadro 1).

Determinação da colonização micorrízica

Para a determinação da colonização por FMA, amostras de raízes finas de cada classe de árvore, nas três posições topográficas, foram submetidas a técnicas de clareamento e coloração segundo Phillips & Hayman (1970) com as modificações de Koske & Gemma (1989). Fragmentos de raiz corados, com cerca de 2 cm de comprimento, foram montados em lâminas permanentes em quantidade equivalente a 100–150 cm de raiz, sendo, posteriormente, observados segundo a metodologia de Sieverding (1991). A determinação da percentagem de comprimento de raiz colonizada por FEM foi avaliada em amostras sem os tratamentos prévios de clareamento e coloração. A percentagem de colonização ectomicorrízica foi determinada pelo método de interseção em placa quadriculada, sob lupa binocular, com aumento de 40 vezes (Giovannetti & Mosse, 1980).

Determinação da concentração de ácidos orgânicos e minerais em ectomicorrizas, raízes laterais finas não colonizadas e folhas

Dois amostras de raízes finas não colonizadas e ectomicorrizas de *Eucalyptus* sp., com massa entre 0,04 e 0,06 g, foram coletadas até a profundidade de 10 cm, a partir do sistema radicular de três árvores de cada classe de diâmetro. Amostras de folhas foram também coletadas no terço médio dos ramos inferiores das árvores. As amostras de raízes e ectomicorrizas foram secas em estufa de ventilação forçada, a 75 °C por 72 h, e, a seguir, submetidas à digestão nítrico-perclórica (Silva, 1999). Ca, Mg e P foram quantificados por espectrofotometria de emissão de plasma (Perkin Elmer, Modelo Optima 3300 TV), e o K por fotometria de emissão de chama (Silva, 1999).

Quadro 1. Características químicas e físicas de camada de 0–20 cm de área plantada com o híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (topo, encosta, baixada) da região de Viçosa, MG

Característica	Posição topográfica		
	Topo	Encosta	Baixada
pH-H ₂ O (1:2,5)	4,95	4,44	4,77
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³) ⁽¹⁾	0,67	0,67	0,24
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³) ⁽¹⁾	0,23	0,00	0,87
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³) ⁽¹⁾	0,33	0,05	0,47
H+Al (cmol _c dm ⁻³) ⁽²⁾	9,5	8,0	6,8
K (mg dm ⁻³) ⁽³⁾	34	17	26
P (mg dm ⁻³) ⁽³⁾	4,5	1,8	1,0
P – remanescente (mg L ⁻¹) ⁽⁴⁾	17,3	18,8	24,0
MO (dag kg ⁻¹) ⁽⁵⁾	3,97	3,07	3,71
SB (cmol _c dm ⁻³)	0,65	0,09	1,41
t (cmol _c dm ⁻³)	1,32	0,76	1,65
T (cmol _c dm ⁻³)	10,15	8,09	8,21
m (%)	50,8	88,2	14,5
V (%)	6,4	1,1	17,2
Areia grossa (%) ⁽⁶⁾	29	24	37
Areia fina (%) ⁽⁶⁾	12	13	10
Silte (%) ⁽⁶⁾	5	9	5
Argila (%) ⁽⁶⁾	54	54	48
Umidade do solo (%)	20,46	17,96	22,23
Classe textural	Argila	Argila	Argilo-Arenosa

⁽¹⁾ Extrator KCl 1 mol L⁻¹ (Vettori, 1969). ⁽²⁾ Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 (Vettori, 1969). ⁽³⁾ Extrator Mehlich-1 (Defelipo & Ribeiro, 1997). ⁽⁴⁾ Concentração de P na solução de equilíbrio, após agitar por 1 h o solo com CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, contendo 60 mg L⁻¹ de P em relação solo:solução de 1:10 (Alvarez V. et al., 2000). ⁽⁵⁾ Método Walkey & Black (Jackson, 1958). ⁽⁶⁾ Método da pipeta (Embrapa, 1997). ⁽⁷⁾ Pelo método de Richards (-30 KPa) (Embrapa, 1997).

A extração de ácidos orgânicos foi feita a partir das amostras de raízes finas não colonizadas, ectomicorrizas e folhas frescas, segundo os métodos descritos por Walton (1952) e Silva et al. (2001). As amostras de material congeladas com N líquido foram maceradas em almofariz, sendo adicionado posteriormente 1,5 mL de etanol a 80 % (v/v). As amostras foram agitadas por 30 segundos e, após a decantação do resíduo, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C. Para a extração de oxalato (fração insolúvel em solução etanol-água), foi adicionado 1,5 mL de HCl 0,62 mol L⁻¹ ao resíduo resultante da moagem. O sobrenadante foi concentrado sob vácuo a 37 °C, durante 5 a 7 h, sob centrifugação. Após evaporação, o extrato concentrado foi dissolvido em 0,6 mL de água ultrapura (MilliQ®) e centrifugado a 13.000 g, durante 20 min. Posteriormente, os sobrenadantes das duas amostras de cada árvore foram misturados, de acordo com as soluções de extração (etanol 80 % e HCl 0,62 mol L⁻¹), e concentrados sob centrifugação a 37 °C, durante 3 a 5 h. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 0,75 mL de água ultrapura e filtradas em filtro de membrana com poro de 0,2 µm.

Cento e vinte microlitros de cada amostra foram injetados no cromatógrafo iônico DX 600 (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA), utilizando-se amostrador automático. Como fase estacionária, utilizou-se a coluna analítica de troca aniônica AS-11 (Dionex). Os ácidos orgânicos foram eluídos em fase móvel composta de água ultrapura, NaOH 10 mmol L⁻¹, NaOH 100 mmol L⁻¹ e metanol. Os eluentes foram mantidos sob pressão constante de gás N para eliminar a interferência de carbonatos e evitar flutuações na linha de base. O fluxo de eluição foi de 1,3 mL min⁻¹. Os compostos foram detectados por condutividade elétrica suprimida, utilizando-se detector eletroquímico. Em algumas amostras selecionadas, foi usada a detecção em sequência com detector de arranjo. A identificação dos compostos foi feita comparando-se o tempo de retenção e espectro de 3D no UV-visível de cada composto com o das amostras-padrão já conhecidas. O sistema cromatográfico foi controlado por meio do software Chromeleon (Dionex) (Silva et al., 2001). O somatório da concentração de ácido oxálico e oxalato de cada amostra foi expresso como equivalente de ácido oxálico (EqAcOx), e o equivalente a oxalato (EqOx) foi determinado pela divisão da concentração de oxalato pela concentração de ácido oxálico.

Determinação da concentração de ácidos orgânicos no solo não-rizoférico, rizoférico e ectomicorrizoférico

Amostras de 15–20 g de solo fresco não rizoférico, rizoférico e ectomicorrizoférico foram coletadas na camada de 0–10 cm a partir de três árvores de cada classe de diâmetro, nas três posições topográficas avaliadas. Considerou-se como solo ectomicorrizoférico

aquele evidentemente associado a agrupamentos densos de ectomicorrizas, rizomorfos e hifas fúngicas; com solo rizoférico como aquele que permaneceu aderido às raízes após agitação forte; e como solo não rizoférico aquele não associado nem a ectomicorrizas nem a raízes. As amostras coletadas foram colocadas em sacos plásticos e trasladadas ao Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV, onde foram secas em temperatura ambiente durante 48 h. As determinações de ácido oxálico e oxalato foram feitas conforme Bazirakenga (1995), Ma & Miasaka (1998) e Silva et al. (2001).

Subamostras de 10 g de solo seco ao ar foram pesadas e misturadas com 20 mL de NaOH 100 mmol L⁻¹ e, então, agitadas durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, 18 mL do sobrenadante da mistura foram centrifugados a 15.000 g durante 15 min. Após a centrifugação, foram coletados 15 mL do sobrenadante aos quais adicionou-se HCl 1 mol L⁻¹ na proporção de 3:1. Essa mistura foi submetida à decantação durante 24 h. Após essa fase, realizou-se a centrifugação do sobrenadante a 15.000 g durante 5 min. A fim de reduzir a concentração de cloreto nas amostras, 12 mL do sobrenadante foram misturados com acetato de etila numa proporção 3:1, sendo agitados e, posteriormente, incubados por 5 min. A fase do acetato de etila foi extraída, sendo o procedimento repetido três vezes. Finalmente, o solvente coletado foi evaporado sob vácuo a 37 °C, sob centrifugação, durante 6–8 h.

Para a solubilização do oxalato (fração solúvel em ácido) e recuperação do ácido oxálico resultante, o solo remanescente usado na extração com solução de NaOH 100 mmol L⁻¹ foi misturado com 20 mL de HCl 0,62 mol L⁻¹ e incubado sob agitação a 4 °C por 16 h. Posteriormente, 18 mL do sobrenadante foram centrifugados a 15.000 g durante 15 min. Após este procedimento, foram coletados 12 mL do sobrenadante, e foi adicionado solvente orgânico de modo similar à extração com NaOH 100 mmol L⁻¹.

Após a concentração sob vácuo, as amostras foram reconstituídas em 0,7 mL de água MilliQ®. De acordo com a posição de amostragem e soluções de extração, as amostras reconstituídas foram combinadas, resultando num volume final de 1,4 mL, e submetidas à evaporação sob centrifugação a 37 °C, durante 3–5 h. Após a evaporação, as amostras foram ressuspensas em 0,9 mL de água ultrapura e passadas em filtro de membrana com poro de 0,2 µm. A quantificação de ácidos orgânicos nas amostras foi feita por cromatografia de íons (Silva et al., 2001). O equivalente de ácido oxálico (EqAcOx) e de oxalato (EqOx) foram expressos como descrito anteriormente.

Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados referentes às concentrações de ácido oxálico, de oxalato e de seus

equivalentes, fez-se uso de esquema experimental em parcelas subsubdivididas, em que as posições topográficas constituíram os tratamentos da parcela, as classes de diâmetro das árvores foram os da subparcela e as fontes de extração de ácido oxálico e oxalato os tratamentos da subsubparcela, estes com restrição à casualização. Já para as outras variáveis, adotou-se esquema de parcela subdividida, sendo as posições topográficas as parcelas e as classes de diâmetro das árvores as subparcelas. As comparações de médias, tanto para os efeitos principais, quanto para os de interação, foram feitas pelo teste de Duncan a 5 %. Correlações simples de Pearson foram estimadas entre as concentrações de nutrientes nas raízes não colonizadas e nas ectomicorrizas e os valores de ácido oxálico, oxalato, EqAcOx e EqOx.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Colonização micorrízica

A colonização ectomicorrízica foi predominante nas três posições topográficas avaliadas, assim como nas diferentes classes de diâmetro das árvores do povoamento (Quadro 2). A maior percentagem de colonização por FEM, considerando-se a reduzida idade das árvores, contrasta com os resultados apresentados por Campos (2004), que relatou maior colonização por FMA do que por FEM em plantios de eucalipto no Estado de Minas Gerais. De fato, vários estudos apontam a sucessão de FMA por FEM nas florestas durante os primeiros anos após o estabelecimento do plantio, sendo as micorrizas arbusculares predominantes nas fases iniciais, com posterior prevalência de ectomicorrizas (Bellei et al., 1992; Santos, 2001; Mello et al., 2006). A maior parte das plantas vasculares estabelece associação simbiótica com FEM ou FMA (Smith & Read, 1997). Em algumas plantas, a exemplo do eucalipto, é comum que esses diferentes tipos de fungos ocorram simultaneamente na mesma raiz, caracterizando a associação do tipo codominante (Molina et al., 1992).

Em relação às posições topográficas avaliadas, a média de colonização ectomicorrízica e micorrízica arbuscular foi maior na área de encosta ($p < 0,05$) (Quadro 2), coincidindo com a maior abundância de raízes neste local (dados não mostrados). Também, as concentrações de nutrientes foram mais baixas no solo desta área (Quadro 1), o que pode estar relacionado às perdas de nutrientes por lixiviação e erosão. As maiores colonizações micorrízicas na encosta, com características químicas de solo menos favoráveis ao crescimento vegetal (Quadro 1), sugerem maior dependência das plantas à associação micorrízica nessas condições.

Quadro 2. Colonização ectomicorrízica (ECTO) e micorrízica arbuscular (MA) do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (topo, encosta, baixada) na região de Viçosa, MG

Posição topográfica	Classe de DAP ⁽¹⁾	%	
		ECTO	MA
Topo	Inferior	21,45 a	0,62 a
	Medio	20,36 a	0,63 a
	Superior	16,66 a	1,27 a
Média		19,49 B	0,84 AB
Encosta	Inferior	38,82 a	0,63 b
	Médio	36,70 a	2,38 ab
	Superior	36,25 a	4,23 a
Média		37,26 A	2,41 A
Baixada	Inferior	11,76 a	0,34 a
	Médio	12,50 a	0,14 a
	Superior	13,00 a	0,21 a
Média		12,42 C	0,23 B
Média geral		23,05	1,16

⁽¹⁾ As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. No topo, as árvores de classe inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe média, DAP entre 9 e 10 cm, e as de classe superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na área encosta, as árvores da classe inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe média, DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe superior, DAP > 10,5 cm. Na área de baixada, as árvores de classe inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe média, com DAP entre 11,7 e 12,2 cm, e as de classe superior com DAP > 14,7 cm. Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Duncan a 5 %. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si, pelo teste Duncan a 5 %.

Ácidos orgânicos em ectomicorrizas, raízes laterais finas não colonizadas e folhas

A média geral das concentrações de ácido oxálico + oxalato (EqAcOx) decresceu ($p < 0,05$) na seguinte ordem: folhas > ectomicorrizas = raízes laterais finas não colonizadas (Quadro 3). As médias de concentração de ácido oxálico e oxalato nas folhas variaram entre 96,1 e 222,5 mg kg⁻¹ (Quadro 3). Essas elevadas concentrações de ácido oxálico e oxalato podem estar relacionadas com as características observadas no solo estudado (Quadro 1), tendo em vista que aumentos na produção de ácidos orgânicos pelas plantas, a exemplo dos ácidos oxálico, cítrico e málico, relacionam-se frequentemente a condições de estresse prevaletentes no meio (Schöll et al., 2005). Deficiências nutricionais, especialmente as relacionadas com Ca e K, e concentrações tóxicas de Al, podem incrementar a produção de ácidos orgânicos nos tecidos foliares (Ma & Miyazaka, 1998; Schöll et al., 2005).

De forma geral, as ectomicorrizas de eucalipto apresentaram concentrações médias semelhantes de

Quadro 3. Concentração de ácido oxálico, oxalato, equivalente a ácido oxálico (EqAcOx) e a oxalato (EqOx) nas ectomicorizas, nas raízes laterais finas não colonizadas e nas folhas de árvores do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (topo, encosta, baixada) na região de Viçosa, MG

Posição topográfica	Classe de DAP ⁽¹⁾	mg kg ⁻¹							
		Ácido oxálico		Oxalato		EqAcOx ⁽²⁾		EqOx ⁽³⁾	
Ectomicorizas									
Topo	Inferior	185,1	a,w	115,8	a,w	300,9	a,w	0,62	a,w
	Médio	92,8	a,x	44,0	b,x	136,8	b,x	0,47	a,x
	Superior	74,1	a,x	82,8	b,wx	156,9	b,x	1,12	a,w
Média		117,3	α,B	80,9	β, B	198,2	α,B	0,74	β,A
Encosta	Inferior	84,3	b,yz	122,4	a,x	206,6	a,x	1,45	a,w
	Médio	107,6	a,xy	94,3	ab,w	201,9	a,wx	0,88	ab,w
	Superior	98,0	a,x	64,1	b,wx	162,1	a,x	0,65	b,x
Média		96,6	α,B	93,6	β,B	190,2	α,B	0,99	β,B
Baixada	Inferior	83,5	b,x	99,4	a,yz	182,9	a,x	1,19	a,w
	Médio	104,5	a,xy	145,0	a,x	249,5	a,wx	1,39	a,w
	Superior	105,5	a,w	171,7	a,y	277,2	a,w	1,63	a,w
Média		97,8	αβ,BC	138,7	α,B	236,5	α,B	1,40	α,A
Média geral		103,9	B	104,4	B	208,3	B	1,04	A
Raízes laterais finas não colonizadas									
Topo	Inferior	114,6	a,wx	108,8	a,w	223,4	a,w	0,94	a,w
	Médio	103,4	a,w	28,4	a,x	131,8	a,x	0,27	ab,x
	Superior	85,2	b,w	74,4	b,x	159,6	a,x	0,87	b,w
Média		101,1	α,C	70,6	β,B	171,6	β,B	0,69	β,A
Encosta	Inferior	77,3	a,yz	94,8	a,x	172,1	a,x	1,22	b,x
	Médio	77,0	a,yz	72,6	a,wx	149,6	a,x	0,94	b,w
	Superior	40,5	b,y	74,9	b,wx	115,4	a,x	1,85	a,w
Média		64,9	β,C	80,7	β,B	145,6	β,B	1,33	α,A
Baixada	Inferior	102,8	a,x	120,0	a,x	222,8	ab,w	1,16	a,w
	Médio	101,9	a,xy	72,4	a,x	174,3	b,x	0,71	x
	Superior	142,1	a,w	157,3	a,wx	299,4	a,w	1,10	a,w
Média		115,6	α,B	116,6	α,B	232,1	α,B	0,99	β,B
Média geral		93,9	B	89,3	B	183,1	B	1,00	A
Folhas									
Topo	Inferior	187,2	a,w	117,8	b,w	305,0	a,w	0,62	a,w
	Médio	170,7	a,w	173,0	b,w	343,7	a,w	1,01	a,w
	Superior	187,9	a,w	146,0	a,w	334,0	a,w	0,77	a,w
Média		181,9	α,A	145,6	α,A	327,6	α,A	0,80	α,A
Encosta	Inferior	146,2	a,x	213,9	a,w	360,1	a,w	1,46	a,w
	Médio	176,1	a,w	110,5	ab,w	286,6	ab,w	0,62	b,w
	Superior	157,6	a,w	96,1	a,w	253,7	b,w	0,60	b,w
Média		159,9	α,A	140,2	α,A	300,1	α,A	0,89	α,B
Baixada	Inferior	181,2	a,w	222,5	a,w	403,7	a,w	1,22	a,w
	Médio	172,5	a,w	199,2	a,w	371,7	a,x	1,15	a,wx
	Superior	152,0	a,w	111,0	a,wx	263,0	b,w	0,73	a,x
Média		168,6	α,A	177,6	α,A	346,1	α,A	1,03	α,B
Média geral		170,1	A	154,5	A	324,6	A	0,90	A

⁽¹⁾ As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. No topo, as árvores de classe inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe média, DAP entre 9 e 10 cm, e as de classe superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na área de encosta, as árvores da classe inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe média, DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe superior, DAP > 10,5 cm. Na área de baixada, as árvores de classe inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe média, com DAP entre 11,7 e 12,2 cm, e as de classe superior com DAP > 14,7 cm. ⁽²⁾ Somatória das concentrações de ácido oxálico e oxalato quantificado por cromatografia de íons e expressas como equivalente a ácido oxálico (EqAcOx). ⁽³⁾ Equivalente a oxalato (EqOx) expresso como concentração de oxalato dividida pela concentração de ácido oxálico. Na coluna, para cada tipo de material biológico analisado (ectomicorizas, raízes laterais finas não colonizadas ou folhas), em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra minúscula (a, b, c) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Na coluna, para a mesma posição topográfica e classe de DAP, médias seguidas pela mesma letra minúscula (w, x, y, z) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Na coluna, para cada tipo de material biológico analisado (ectomicorizas, raízes laterais finas não colonizadas ou folhas), médias seguidas pela mesma letra grega (α, β) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Na coluna, para cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula (A, B, C) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Na coluna, médias gerais seguidas pela mesma letra maiúscula (A, B, C) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

ácido oxálico e oxalato (Quadro 3). As ectomicorrizas de plantas na área de baixada apresentaram as maiores concentrações de oxalato e EqOx ($p < 0,05$) quando comparadas às demais posições da topossequência (Quadro 3). Ainda, as ectomicorrizas apresentaram maiores concentrações de ácido oxálico do que as raízes laterais finas no topo e na encosta ($p < 0,05$), corroborando alguns estudos que evidenciam maior exsudação de ácidos orgânicos em raízes colonizadas por FEM (Ryan et al., 2001; van Hees et al., 2003, 2005).

Observaram-se elevados valores de EqAcOx nas ectomicorrizas de árvores da classe de DAP inferior (Quadro 3), sugerindo que plantas de menor crescimento apresentam maior dependência da associação micorrízica no que tange à exsudação de ácidos orgânicos que irão atuar na disponibilização de nutrientes (Arocena & Glowka, 2000). Também, sabe-se que, em função das condições fisiológicas em que se encontram, as plantas podem regular o fluxo de C para as raízes, alterando a produção de ácidos orgânicos pelas populações de FEM associados, o que pode elevar as taxas de rizodeposição (Jones et al., 2004). A maior concentração de ácido oxálico nas ectomicorrizas comparada às raízes laterais finas não colonizadas é evidência de que a produção deste ácido pode ser efetuada pelos FEM ou ser regulada pela presença desses simbiossiontes.

Observou-se maior concentração de oxalato nas ectomicorrizas na baixada (Quadro 3). Esta área apresentou maior concentração de Ca no solo (Quadro 1), sugerindo que a maior disponibilidade desse nutriente no meio pode induzir maiores concentrações de oxalato no micélio fúngico. De fato, em alguns casos relatados na literatura, aumentos na produção de ácido oxálico e oxalato podem também ocorrer em resposta a incrementos na disponibilidade de Ca (Franceschi & Horner, 1980; Keates et al., 2000).

Nas raízes laterais finas não colonizadas, as concentrações de ácido oxálico e de oxalato foram semelhantes nas posições topográficas estudadas, variando de 28,4 a 157,3 mg kg⁻¹ (Quadro 3). As maiores concentrações de ácido oxálico ($p < 0,05$) foram observadas no topo e na baixada, podendo estar relacionadas com as maiores concentrações de bases presentes neste local (Franceschi & Horner, 1980; Keates et al., 2000). Já os maiores valores de oxalato e de EqAcOx ($p < 0,05$) foram registrados na baixada e na encosta, respectivamente (Quadro 3).

As raízes laterais finas não colonizadas apresentaram a maior razão EqOx na área de encosta ($p < 0,05$) (Quadro 3). Esse fato pode ser atribuído hipoteticamente à alta saturação por Al do solo nesse local (Quadro 1), uma vez que a formação de complexos Al-ácidos orgânicos constitui estratégia de proteção das plantas contra as formas tóxicas do elemento no solo (Silva et al., 2001; Klugh-Stewart & Cumming, 2009).

Ácidos orgânicos no solo não rizosférico, rizosférico e ectomicorrizosférico

As concentrações médias gerais de ácido oxálico e oxalato nos solos não rizosférico, rizosférico e ectomicorrizosférico foram, em mg kg⁻¹, de 54,5 e 21,7, 100,0 e 34,2, 155,7 e 28,0, respectivamente. Em geral, as concentrações de ácido oxálico decresceram na seguinte ordem: solo ectomicorrizosférico > solo rizosférico > solo não rizosférico (Quadro 4). Para o oxalato, as maiores concentrações foram medidas para o solo rizosférico, seguido pelo solo ectomicorrizosférico e, por último, pelo não rizosférico.

Em relação à concentração EqAcOx, o maior valor ($p < 0,05$) foi observado no solo ectomicorrizosférico, 183,7 mg kg⁻¹, seguido do solo rizosférico, 134,3 mg kg⁻¹, e do solo não rizosférico, 76,0 mg kg⁻¹.

Os valores de EqOx decresceram na seguinte ordem ($p < 0,05$): solo não rizosférico, 0,44 > solo rizosférico, 0,33 > solo ectomicorrizosférico, 0,19. Conclui-se que o ácido oxálico tende a predominar na interface ectomicorriza-solo. Alguns trabalhos em casa de vegetação e no campo mostram que FEM podem excretar quantidades significativas de ácido oxálico no solo (Griffiths et al., 1994; Dutton & Evans, 1996; van Hees et al., 2003, 2005). Em condições axênicas, plantas colonizadas por FEM ou FMA exsudam mais ácidos orgânicos no solo do que plantas não micorrizadas (Ahonen-Jonarth et al., 2000; Casarin et al., 2003; Klugh-Stewart & Cumming, 2009).

Esta atividade aumenta a solubilização de minerais complexados no solo em função da redução do pH e da capacidade de complexação dos ácidos orgânicos, levando à maior disponibilidade de nutrientes (Cromack et al., 1979; Jones et al., 1992; Jongmans et al., 1997). Assim, o incremento constatado na produção de ácido oxálico no solo ectomicorrizosférico possivelmente constitui estratégia dos FEM para liberar e absorver P e Ca do solo, fornecendo-os à planta hospedeira. Além da produção de ácidos orgânicos, os mecanismos de disponibilização de nutrientes efetuados por FEM envolvem a síntese e secreção para o meio de fosfatases e a produção de H⁺ como resposta a ao maior fluxo de C do hospedeiro para o fungo (Gardner et al., 1983; Bolan et al., 1994).

Concentração de minerais em ectomicorrizas e raízes laterais finas não colonizadas e análise de correlação

A média de concentração de nutrientes nas ectomicorrizas, em g kg⁻¹, decresceu na seguinte ordem: Ca (27,84) > Mg (7,91) > P (5,24) > K (0,94), variando em função da posição topográfica avaliada (Quadro 5). As concentrações de Ca, Mg e K foram superiores no topo e na baixada ($p < 0,05$), enquanto o maior valor para P foi observado no topo (Quadro 5).

Quadro 4. Concentração de ácido oxálico, oxalato, equivalente a ácido oxálico (EqAcOx) e a oxalato (EqOx) no solo ectomicorrizosférico, solo rizosférico e solo não rizosférico do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (topo, encosta, baixada) na região de Viçosa, MG

Posição topográfica	Classe de DAP ⁽¹⁾	Ácido oxálico		Oxalato		EqAcOx ⁽²⁾		EqOx ⁽³⁾	
		mg kg ⁻¹							
Solo ectomicorrizosférico									
Topo	Inferior	129,1	b,w	70,6	a,w	199,7	a,w	0,55	a,w
	Médio	140,3	a,w	30,1	a,w	170,4	a,w	0,21	a,w
	Superior	157,5	a,w	42,7	a,w	200,2	a,w	0,27	a,w
Média		142,3	β,A	47,8	α,A	190,1	α,A	0,34	α,A
Encosta	Inferior	206,7	a,w	17,5	a,w	224,2	a,w	0,08	a,w
	Médio	139,8	a,w	15,4	a,w	155,2	a,w	0,11	a,w
	Superior	177,4	a,w	13,2	a,x	190,6	a,w	0,07	a,w
Média		174,6	α,A	15,4	α,B	190,0	α,A	0,09	β,B
Baixada	Inferior	156,4	a,w	41,7	a,w	198,1	a,w	0,27	a,w
	Médio	143,5	a,w	9,8	a,w	153,3	a,w	0,07	a,w
	Superior	150,4	a,w	10,9	a,x	161,3	a,x	0,07	b,w
Média		150,1	αβ,A	20,8	α,B	170,9	α,B	0,14	αβ,B
Média geral		155,7		28,0		183,7		0,19	
Solo rizosférico									
Topo	Inferior	99,0	a,wX	44,6	a,wX	143,6	a,w	0,45	a,w
	Médio	89,4	a,x	20,0	a,x	109,4	a,w	0,22	a,x
	Superior	95,8	a,x	31,3	b,x	127,1	a,w	0,33	b,x
Média		94,7	α,B	31,9	α,A	126,7	α,B	0,33	α,A
Encosta	Inferior	110	a,x	23,6	a,w	133,6	a,x	0,21	a,w
	Médio	98,5	a,x	50,7	a,w	149,2	a,w	0,51	a,w
	Superior	85,3	a,x	11,9	a,w	97,2	a,w	0,14	a,x
Média		98,0	α,B	28,7	α,A	127,0	α,B	0,29	αβ,A
Baixada	Inferior	69,4	a,x	20,6	a,x	90,0	a,x	0,30	b,w
	Médio	129,0	a,w	10,3	a,x	139,3	a,w	0,08	b,w
	Superior	123,0	a,wX	95,1	a,w	218,1	a,w	0,77	a,w
Média		107,1	α,B	42,0	α,A	149,1	α,A	0,38	α,A
Média geral		100,0		34,2		134,3		0,33	
Solo não rizosférico									
Topo	Inferior	60,8	a,x	8,7	a,x	69,5	a,x	0,14	a,x
	Médio	28,1	a,y	18,5	a,w	46,6	a,x	0,66	a,x
	Superior	39,0	a,y	28,0	b,w	67,0	a,y	0,71	a,x
Média		42,6	α,C	18,4	α,B	61,0	αβ,C	0,50	α,A
Encosta	Inferior	45,4	a,y	15,0	a,w	60,4	b,y	0,33	a,w
	Médio	38,3	a,y	18,0	a,w	56,3	b,x	0,47	a,w
	Superior	65,0	a,x	53,0	a,w	118,0	a,x	0,82	a,x
Média		49,5	α,C	29	α,A	78,2	αβ,C	0,54	α,A
Baixada	Inferior	59,3	b,w	13,6	a,w	72,9	a,x	0,23	a,w
	Médio	50,6	b,w	24,1	a,w	74,7	a,x	0,48	a,w
	Superior	103,0	a,w	16,0	a,x	119	a,x	0,16	a,x
Média		70,9	α,C	17,9	α,B	88,8	α,C	0,29	αβ,B
Média geral		54,3		21,7		76,0		0,44	

⁽¹⁾ As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. No topo, as árvores de classe Inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe média, DAP entre 9 e 10 cm, e as de classe superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na área encosta, as árvores da classe Inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe média, DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe superior, DAP > 10,5 cm. Na área de baixada, as árvores de classe inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe média, com DAP entre 11,7 e 12,2 cm, e as de classe superior com DAP > 14,7 cm. ⁽²⁾ Somatória das concentrações de ácido oxálico e oxalato quantificadas por cromatografia de íons e expressas como equivalente a ácido oxálico (EqAcOx). ⁽³⁾ Equivalente a oxalato (EqOx) expresso como concentração de oxalato dividida pela concentração de ácido oxálico. Na coluna, para cada tipo de solo analisado (ectomicorrizosférico, rizosférico ou não rizosférico), em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra minúscula (a, b, c) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na coluna, para a mesma posição topográfica e classe de DAP, médias seguidas pela mesma letra minúscula (w, x, y, z) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na coluna, para cada tipo de solo analisado (ectomicorrizosférico, rizosférico ou não rizosférico), médias seguidas pela mesma letra grega (α, β) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na coluna, para cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula (A, B, C) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

Quadro 5. Concentração de cálcio, magnésio, fósforo e potássio em ectomicorrizas do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (topo, encosta, baixada) na região de Viçosa, MG

Posição topográfica	Classe de DAP ⁽¹⁾	g kg ⁻¹			
		Ca	Mg	P	K
Topo	Inferior	20,2 a	8,1 ab	5,8 a	0,7 a
	Médio	35,6 a	8,5 a	6,9 a	1,4 a
	Superior	12,0 b	8,5 a	6,2 a	0,8 a
Média		22,6 AB	8,4 A	6,3 A	0,9 A
Encosta	Inferior	24,0 a	3,5 c	3,5 a	0,8 a
	Médio	29,2 a	5,4 a	4,5 a	0,7 b
	Superior	16,1 b	8,6 a	4,7 a	1,0 a
Média		23,1 B	5,8 B	4,2 B	0,8 A
Baixada	Inferior	25,9 a	9,7 a	5,3 a	0,9 a
	Médio	16,5 a	7,9 a	5,0 a	1,0 ab
	Superior	70,8 a	10,8 a	5,0 a	1,0 a
Média		37,7 A	9,5 A	5,1 B	1,0 A
Média geral		27,8	7,9	5,2	0,9

⁽¹⁾ As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. No topo, as árvores de classe inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe média, DAP entre 9 e 10 cm, e as de classe superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na área encosta, as árvores da classe inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe média, DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe superior, DAP > 10,5 cm. Na área de baixada, as árvores de classe inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe média, com DAP entre 11,7 e 12,2 cm, e as de classe superior com DAP > 14,7 cm. Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

As concentrações médias de nutrientes, em mg kg⁻¹, nas raízes laterais finas não colonizadas de eucalipto decresceram na seguinte ordem: Ca (34,6) > Mg (11,1) > P (4,8) > K (0,9) (Quadro 6). As maiores concentrações de Ca, Mg, P e K foram registradas para as raízes do topo.

Em geral, observaram-se correlações negativas não significativas entre as concentrações de nutrientes nas raízes e ectomicorrizas de eucalipto e as concentrações de ácido oxálico e oxalato nas mesmas estruturas (dados não mostrados). A produção de ácidos orgânicos e a extrusão de prótons pelas hifas de FEM correlacionam-se com processos de intemperismo e de disponibilização de nutrientes para o hospedeiro (Landeweert et al., 2001; van Hees et al., 2003, 2005). No entanto, isto nem sempre reflete no acúmulo de nutrientes na parte aérea ou em outros órgãos da planta em função de outras variáveis que influenciam a disponibilidade e a absorção de nutrientes (van Hees et al., 2005).

No topo, observaram-se correlações negativas entre as concentrações de Mg nas ectomicorrizas (-0,835; p < 0,1) e de P nas raízes (-0,725; p < 0,05) com a concentração de ácido oxálico nas raízes não colonizadas.

Na encosta, observou-se correlação negativa entre as concentrações de K e a concentração de ácido oxálico nas ectomicorrizas (-0,619; p < 0,1). Fato semelhante

já foi relatado para plantas de *Pinus silvestris* colonizadas por *Hebeloma crustuliniforme* (van Hees et al., 2005). Nesta mesma área, observaram-se, também, correlações negativas entre as concentrações de Ca e Mg nas raízes e a concentração de oxalato (-0,735 e -0,681, respectivamente; p < 0,05). Já na baixada, observou-se correlação negativa (-0,648; p < 0,1) entre as concentrações de Ca e ácido oxálico nas raízes.

As correlações obtidas neste trabalho sugerem que a produção de ácidos orgânicos pela planta é regulada por múltiplos fatores. As características químicas e físicas do solo podem interagir de forma a mascarar as relações teóricas esperadas de correlações positivas entre o teor de nutrientes, em especial o de Ca, e os de ácidos orgânicos. A presença abundante de CaOx nas ectomicorrizas de eucalipto cultivados na topossequência foi observada mesmo em solos da encosta, com baixa disponibilidade de Ca (Parte II). Assim, correlações negativas entre as concentrações de Ca e as de ácido oxálico ou oxalato nas ectomicorrizas não eram esperadas.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram o importante papel dos FEM na liberação de ácidos orgânicos que atuam na mobilização de nutrientes em solo plantado com eucalipto. Contudo, cabe ressaltar a importância de se efetuar trabalhos adicionais que melhor elucidem as relações entre as

Quadro 6. Concentração de cálcio, magnésio, fósforo e potássio em raízes laterais finas não colonizadas do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (topo, encosta, baixada) na região de Viçosa, MG

Posição topográfica	Classe de DAP ⁽¹⁾	g kg ⁻¹			
		Ca	Mg	P	K
Topo	Inferior	32,4 a	8,5 a	5,1 a	1,1 a
	Médio	36,2 a	18,3 a	7,3 a	0,9 ab
	Superior	26,8 b	14,6 a	6,2 a	0,9 ab
Média		31,8 A	13,8 AB	6,2 A	1,0 A
Encosta	Inferior	12,5 b	5,3 a	3,3 b	0,9 a
	Médio	21,5 a	5,7 a	4,7 a	0,6 b
	Superior	20,9 a	5,2 a	3,9 b	0,9 a
Média		18,3 A	5,4 B	4,0 B	0,8 A
Baixada	Inferior	99,2 a	20,7 a	4,4 a	0,9 a
	Médio	31,3 b	11,2 a	3,9 a	1,2 a
	Superior	30,8 b	10,3 a	4,1 a	1,0 a
Média		53,8 A	14,1 A	4,1 B	1,1 A
Média geral		34,6	11,1	4,8	0,9

⁽¹⁾ As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. No topo, as árvores de classe inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe média, DAP entre 9 e 10 cm, e as de classe superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na área de encosta, as árvores da classe inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe média, DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe superior, DAP > 10,5 cm. Na área de baixada, as árvores de classe inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe média, com DAP entre 11,7 e 12,2 cm, e as de classe superior com DAP > 14,7 cm. Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %

diferentes populações de FEM na produção de ácidos orgânicos e a absorção e o acúmulo de nutrientes pela planta hospedeira. Estudos do fluxo de nutrientes das ectomicorrizas para a parte aérea da planta serão essenciais para a elucidação das relações entre a produção de ácidos orgânicos e a nutrição mineral do eucalipto em solos velhos e ácidos prevalentes no Estado de Minas Gerais.

CONCLUSÕES

1. A colonização micorrízica em eucalipto é influenciada pela posição topográfica do plantio em áreas com relevo em meia laranja, de vertente côncavo-convexa, típico da Zona da Mata mineira, levando à heterogeneidade na distribuição da associação no povoamento.

2. A presença de fungos ectomicorrízicos associados às raízes de eucalipto contribui significativamente para a ocorrência de maiores concentrações de ácido oxálico no solo.

3. As concentrações de ácido oxálico medidas nas ectomicorrizas e nas raízes laterais finas não se correlacionam positivamente com as de Ca, Mg, K e P, evidenciando que os elementos disponibilizados pelo ácido oxálico não são acumulados nesses órgãos.

LITERATURA CITADA

- AHONEN-JONNARTH, U.; van HEES, P.W.; LUNDSTRÖM, U.S. & FINLAY, R.D. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytol.*, 146:557-567, 2000.
- ALVAREZ V., V.H.; NOVAIS, R.F.; DIAS, L.E. & OLIVEIRA, J.A. Determinação e uso de fósforo remanescente. *B. Inf. SBSC*, 25:27-34, 2000.
- AROCENA, J.M. & GLOWA, K.R. Mineral weathering in the ectomycorrhizosphere of subalpine (*Abies lasiocarpa*) as revealed by soil solution composition. *For. Ecol. Manag.*, 133:61-70, 2000.
- AROCENA, J.M.; GLOWA, K.R. & MASSICOTTE, H.R. Calcium-rich hypha encrustations on *Piloderma*. *Mycorrhiza*, 10:209-215, 2001.
- BARGALI, S.S.; SINGH, S.P. & SINGH, R.P. Patterns of weight loss and nutrient release from decomposing leaf litter in an age series of eucalypt plantations. *Soil Biol. Biochem.*, 25:1731-1738, 1993.
- BARROS, N.F. & COMERFORD, N.B. Sustentabilidade da produção de florestas plantadas na região tropical. In: CURI, N.; MARQUES, J.J.; GUILHERME, L.R.G.; LIMA, J.M.; LOPES, A.S.S. & ALVAREZ V., V.H., eds. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira Ciência do Solo, 2002. v.2. p.487-592.

- BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F. Eucalypt nutrition and fertilizer regimes in Brazil. In: ATTIWILL, P.M. & ADAMS, M.A., eds. Nutrition of eucalypts. Collingwood, CSIRO Publishing, 1996. 440p.
- BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R.R. & LEROUX, G.D. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol. Biochem.*, 27:349-356, 1995.
- BELLEI, M.M.; GARBAYE, J. & GIL, M. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (Southern Brazil). *For. Ecol. Manag.*, 54:205-213, 1992.
- BOLAN, N.S.; NAIDU, R.; MAHIMAIRAJA, S. & BASKARAN, S. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biol. Fert. Soils*, 18:311-319, 1994.
- CAMPOS, D.T.S. Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 82p. (Tese de Doutorado)
- CASARIN, V.; PLASSARD, C.; SOUCH, G. & ARVIEH, J.C. Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie*, 23:461-469, 2003.
- CROMACK, K.; GRAUSTEIN, W.C.; SPEIDEL, K.; TODD, A.W.; SPYCHER, G. & TODD, R.L. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of *Hysterangium crassum*. *Soil Biol. Biochem.*, 11:463-468, 1979.
- DEFELIPO, B.V. & RIBEIRO, A.C. Análise química do solo (metodologia). 2.ed. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 26p. (Boletim de Extensão, 29)
- DUTTON, M.V. & EVANS, C.S. Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.*, 42:881-895, 1996.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, 1997. 212p.
- FOELKET, C. Eucalyptus online book. Disponível em : < <http://www.eucalyptus.com.br>>. Acesso em: 28 de jan de 2009.
- FOX, T.R. & COMERFORD, N.B. Low molecular weight organic acids in selected forest soil of the Southwestern USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54:1139-1144, 1990.
- FRANCESCHI, V.R. & HORNER, H.T. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.*, 46:361-427, 1980.
- GARDNER, W.K.; BARBER, D.A. & PARBERRY, D.G. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant Soil*, 70:107-114, 1983.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A. & TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in Southern Brazil. *Mycologia*, 92:1166-1177, 2000.
- GIOVANETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84:489-500, 1980.
- GRIFFITHS, R.P.; BAHAM, J.E. & CALDWELL, B.A. Soil solution chemistry of ectomycorrhizal mats in forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 3:331-337, 1994.
- JACKSON, M.L. Soil chemical analysis. New Jersey, Prentice-Hall, 1958. 498p.
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill. 1940. 523p.
- JONES, D.; HODGE, A. & KUZYAKOV, Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.*, 163:459-480, 2004.
- JONES, D.; McHARDY, W.J.; WILSON, M.J. & VAUGHAN, D. Scanning electron microscopy of calcium oxalate on mantle hyphae of hybrid larch roots from a farm forestry experimental site. *Micron. Microsc. Acta*, 3:315-317, 1992.
- JONGMANS, A.; van BREEMEN, N.; LUNDSTRÖM, U.; van HEES, P.; FINLAY, R.D.; SRINIVASAN, M.; UNESTAM, T.; GIESLER, R.; MELKERUD, P. & OLSSON, M. Rock-eating fungi. *Nature*, 389:682-683, 1997.
- KEATES, S.A.; TARLYN, N.; LOEWUS, F.A. & FRANCESCHI, V.R. L-ascorbic acid and L-galactose are sources of oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry*, 53:433-440, 2000.
- KLUGH-STEWART, K. & CUMMING, R. Organic acid exudation by mycorrhizal *Andropogon virginicus* L. (broomsedge) roots in response to aluminum. *Soil Biol. Biochem.*, 41:367-373, 2009.
- KOSKE, R.E. & GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.*, 92:488-505, 1989.
- LANDEWEERT, R.; HOFFLAND, E.; ROGER, D.; FINLAY, Y.; THOM, W.; KUYPER, A. & van BREEMEN, N. Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.*, 16:248-254, 2001.
- LEITE, F.P. Relações nutricionais e alterações de características químicas de solos da região do Vale do Rio Doce pelo cultivo do eucalipto. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 72p. (Tese de Doutorado)
- MA, Z. & MIYASAKA, S.C. Oxalate exudation by Taro in response to Al. *Plant Physiol.*, 118:861-865, 1998.
- MELLO, A.; ANTONIOLLI, Z.; KAMINSKI, J.; SOUZA, E. & OLIVEIRA, V.L. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. *Ci. Flor.*, 3:293-301, 2006.
- MOLINA, R.; MASSICOTTE, H. & TRAPPE, J.M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In: ALLEN, M., ed. Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process. New York, Chapman and Hall, 1992. p.357-423.

- NEVES, J.C.L. Produção e partição de biomassa, aspectos nutricionais e hídricos em plantios clonais de eucalipto na região litorânea do Espírito Santo. Campos dos Goytacazes, UENF, 2000. 191p.
- OLSSON, P.A.; JAKOBSEN, I. & WALLENDER, H. Foraging and resource allocation strategies of mycorrhizal fungi in a patchy environment. In: van der HEIJDEN, M.G.A. & SANDERS, I.R., eds. Mycorrhizal ecology, ecological studies. Berlin, Springer-Verlag, 2002. p.93-110.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment for infection. Trans. Brit. Mycol. Soc., 55:158-161, 1970.
- RITCHEY, K.D.; SILVA, E. & COSTA, U. Calcium deficiency in clay B horizons of savanna Oxisols. Soil Sci., 6:378-382, 1982.
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. & JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol., 52:527-560, 2001.
- SANTOS, V.L.; MUCHOVEJ, R.M.C.; BORGES, A.C.; NEVES, J.C.L. & KASUYA, M.C.M. Vesicular-arbuscular-ectomycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. Braz. J. Microbiol., 32:81-86, 2001.
- SCHÖLL, V.; HOLFFLAND, E. & van BREEMEN, N. Organic anion exudation by ectomycorrhizal fungi and *Pinus sylvestris* in response to nutrient deficiencies. New Phytol., 170:153-163, 2005.
- SCHUMACHER, M. & CALDEIRA, M. Estimativa da biomassa e do conteúdo de nutrientes de um povoamento de *Eucalyptus globulus* (Labillardière) sub-espécie *maidenii*. Ci. Flor., 1:45-53, 2001.
- SIEVERDING, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Friedland, Bremer; Rossdorf, TZ-Verlagsgesellschaft, 1991. 371p.
- SILVA, F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, Embrapa Comunicação para a Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; RAPER, C.D.; CARTER, T.E. & RUFTY, T.W. Differential aluminium tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. Plant Physiol., 112:200-210, 2001.
- SILVA, M.A.; COSTA, M.D.; ROCHA, R.B. & BORGES, A.C. Formação de ectomicorrizas por monócários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptus grandis*. R. Bras. Ci. Solo, 31:917-929, 2007.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press, 1997. 605p.
- SMYTH, T.J. & CRAVO, M.S. Aluminum and calcium constraints to continuous crop production in a Brazilian Amazon Oxisol. Agron. J., 84:843-850, 1992.
- SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F. & BELLEI, M.M. Teor de fósforo no solo influencia o desenvolvimento de ectomicorrizas e nutrição e crescimento de mudas de eucalipto. R. Árvore, 2:140-151, 1989.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA - SBS. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/cdrom.html>>. Acesso em 28 de jan. 2009.
- SOUZA, L.; SILVA, G. & OLIVEIRA, V. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. Pesq. Agropec. Bras., 39:349-355, 2004.
- VALE, F.R.; FURTINI NETO, A.E.; RENÓ, N.B.; FERNANDES, L.A. & RESENDE, A.V. Crescimento radicular de espécies florestais em solo ácido. Pesq. Agropec. Bras., 9:609-616, 1996.
- van HEES, P.; GODBOLD, D.L.; JENTSCHKE, G. & JONES, D.L. Impact of ectomycorrhizas on the concentration of simple organic acids in a forest soil. Eur. J. Soil Sci., 54:697-706, 2003.
- van HEES, P.; JONES, D.L.; JENTSCHKE, G. & GODBOLD, D.L. Impact of coniferous seedlings and ectomycorrhizal fungi upon the concentration of organic acids in soil solution. Soil Biol. Biochem., 37:771-776, 2005.
- VETTORI, L. Métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico, 7)
- WALLENDER, H.; JOHANSSON, J. & PALLON, J. PIXEL analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different minerals in forest soil. FEMS Microbiol. Ecol., 9:147-156, 2002.
- WALTON, G.P. Specific acidity of water extract and oxalate content of foliage African sorrel. Bot. Gazette, 7:158-173, 1952.
- WEBB, M.; CAVALETTO, J.; CARPITA, N.C.; LOPEZ, L.E. & ARNOTT, H.J. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. Plant J., 7:663-648, 1995.

