

ACÚMULO DE ÁCIDO OXÁLICO E CRISTAIS DE CÁLCIO EM ECTOMICORRIZAS DE EUCALIPTO. II - FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO INDUZIDA POR FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM RAÍZES LATERAIS FINAS⁽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 é eficiente na aquisição de Ca do solo, mas pouco se sabe sobre a participação das ectomicorrizas e dos ácidos orgânicos nesse processo em campo. O acúmulo de cristais de Ca (CaOx) foi avaliado em, aproximadamente, 2.100 raízes laterais finas e ectomicorrizas do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, cultivado por 2,5 anos em área com topografia típica em meia laranja, com vertente côncavo-convexa, na região de Viçosa, MG. Técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura foram usadas para a visualização dos CaOx. Em 73,7 % das raízes, ocorreu abundante acúmulo de drusas e grânulos de CaOx nas células do córtex. A presença conspícua de CaOx foi observada em 56,2 % das ectomicorrizas e em 17,5 % das raízes laterais finas não colonizadas, evidenciando o papel das micorrizas no acúmulo de Ca em eucalipto. A forma predominante dos CaOx foram as drusas nas ectomicorrizas e os grânulos cristalinos nas raízes. Os dez morfotipos de ectomicorrizas observados na área diferiram quanto à presença e à morfologia dos CaOx, o que pode representar distintas capacidades dos fungos ectomicorrízicos em fornecer Ca para a planta hospedeira. A análise da superfície do manto das ectomicorrizas por microscopia eletrônica de varredura não evidenciou a presença de CaOx nessa estrutura, confirmando que,

⁽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

nas condições avaliadas, o acúmulo de cristais limita-se ao córtex radicular. Este é o primeiro relato da ocorrência de CaOx em ectomicorrizas de eucalipto no Brasil, com dados que comprovam que há mecanismos de armazenamento de Ca nas ectomicorrizas em áreas com baixa disponibilidade do elemento.

Termos de indexação: Ectomicorriza, drusa, nutrição mineral, ácidos orgânicos, microscopia.

SUMMARY: ACCUMULATION OF OXALIC ACID AND CALCIUM CRYSTALS IN ECTOMYCORRHIZAS OF EUCALYPT. II – CALCIUM OXALATE CRYSTAL FORMATION INDUCED BY ECTOMICORRHIZAL FUNGI IN FINE LATERAL ROOTS

Eucalypt is efficient at taking up Ca from the soil, however little is known about the contribution of ectomycorrhizas and organic acids to this process under field conditions. The accumulation of calcium oxalate crystals (CaOx) was evaluated in, approximately, 2,100 fine lateral roots and ectomycorrhizas of a 2.5-year-old Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla hybrid, grown in a mountainous area at Viçosa, MG, Brazil. Optical and scanning electron microscopy techniques were used for CaOx observation. Abundant accumulation of calcium as druses or grains in the root cortex cells was observed in 73.7 % of the fine lateral roots. The conspicuous presence of CaOx was observed in 56.2 % of the ectomycorrhizal and in 17.5 % of the nonmycorrhizal fine lateral roots, evidencing the role of the ectomycorrhizal association in calcium storage of eucalypt roots. In the ectomycorrhizal root, druses were the predominant CaOx form, while in nonmycorrhizal roots crystalline grains were more frequent. The 10 ectomycorrhizal morphotypes observed varied in relation to the CaOx content in the root cortex, possibly representing distinct capacities of each ectomycorrhizal fungi to supply Ca to the host plant. The analysis of the mantle surface of the different ectomycorrhizal morphotypes by scanning electron microscopy did not detect the presence of CaOx in this structure, confirming that under the conditions evaluated, CaOx accumulation in the association is limited to the root cortex. This is the first report on the occurrence of CaOx in eucalypt ectomycorrhizas in Brazil, with data that demonstrate the existence of calcium storage mechanisms in the ectomycorrhizas in areas with low calcium availability.

Index terms: ectomycorrhiza, druse, mineral nutrition, organic acids, microscopy.

INTRODUÇÃO

A biomineralização corresponde ao processo no qual organismos vivos formam cristais inorgânicos ou agregados cristalinos intra e extracelulares (Webb, 1999). No caso das plantas, a precipitação e a armazenagem de CaOx têm sido descritas na maioria dos tecidos e órgãos (Zuñiga et al., 2003). Os depósitos intracelulares geralmente estão nos vacúolos de células especializadas na formação do cristal, chamadas de idioblastos (Franceschi & Nakata, 2005).

A formação de cristais minerais em fungos ectomicorrízicos (FEM) tem sido observada como incrustações de morfologia variada no manto, podendo apresentar-se na forma mono ou diidratada (Tait et al., 1999; Franceschi & Nakata, 2005). Diversos estudos encontraram materiais cristalinos incrustados nas hifas fúngicas e os classificaram, de acordo com a sua forma, em verrugosos, granulados e filamentosos (Malajczuk & Cromack, 1982; Whitney & Arnott, 1987; Connolly & Jellison, 1995; Arocena et al., 2001).

A formação dos CaOx tem sido atribuída a necessidades funcionais diversas. Gourlay & Grime (1994) sugerem que os CaOx são consequência da destoxificação do ambiente radicular em alta concentração de Ca, danosa à célula, como nos solos calcários. Já em muitos ecossistemas naturais e perturbados, a acidificação do solo, a elevada precipitação, a quantidade limitante de minerais essenciais e a lixiviação de cátions podem levar à formação de CaOx no tecido vegetal como forma de estocar minerais para garantir o crescimento normal das plantas (Graustein et al., 1977; Malajczuk & Cromack, 1982; Entry et al., 1992; Cumming et al., 2001).

A deficiência de Ca, Mg, e P, o baixo pH e a presença de Al em concentrações tóxicas são fatores responsáveis pelo menor desenvolvimento das plantações florestais em campo. No Brasil, as áreas utilizadas para a cultura de eucalipto apresentam topografia diversa, solos de reação ácida, com pH inferior a 5,5 (Vale et al., 1996) e concentrações limitantes de nutrientes, como o Ca (Ritchey et al.,

1982). No entanto, os plantios de eucalipto apresentam elevada mobilização desse elemento em função do seu rápido crescimento. O acúmulo de Ca na biomassa de plantações maduras pode variar de 236 a 736 kg ha⁻¹. Nas condições descritas, torna-se relevante a elucidação do papel dos FEM na absorção, no armazenamento e no suprimento de Ca para o hospedeiro.

Plantios florestais, a exemplo do eucalipto e do pinho, encontram-se associados a FEM de várias espécies (Campos, 2004; Giachini et al., 2004), possivelmente como resultado de uma adaptação da planta à baixa disponibilidade de nutrientes (Wallender et al., 1997; Lapeyrie et al., 1990). Graustein et al. (1977) evidenciaram que o fungo ectomicorrízico *Hysterangium* sp. produz CaOx em altas concentrações e sugeriram que, em solos jovens, a produção de ácidos orgânicos pode aumentar a intemperização do solo, incrementando a ciclagem de cátions, especialmente Ca, Fe e Al.

Os estudos sobre a presença de CaOx em fungos ectomicorrízicos são escassos e voltados para áreas temperadas com elevadas concentrações do elemento no solo (Connolly & Jellison, 1995; Entry et al., 1992; Arocena et al., 2001). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o acúmulo de Ca na forma de CaOx nas ectomicorrizas e raízes de eucalipto cultivado em solo com baixa disponibilidade de Ca trocável na região de Viçosa, MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área e caracterização física e química do solo – Gonzalez et al. (2009)

Amostragem de raízes e ectomicorrizas

Para a quantificação da percentagem de raízes e ectomicorrizas contendo CaOx, efetuou-se a amostragem aleatória do sistema radicular de plantas nas diferentes posições topográficas, na camada de 0–10 cm, sendo coletados fragmentos de raízes laterais finas não colonizadas e ectomicorrizas de forma a constituir uma amostra composta. A frequência de CaOx foi determinada nas raízes laterais finas e ectomicorrizas dividindo-se o número de fragmentos observados contendo CaOx pelo número total de fragmentos observados vezes 100. Foram avaliados 2.172 fragmentos de raiz, sendo 1.246 de raízes laterais finas não colonizadas e 926 ectomicorrizas.

Para a determinação do número de morfotipos ectomicorrízicos nas áreas de estudo, bem como da relação entre dado morfotipo e a presença de CaOx, foram coletadas ectomicorrizas na mesma profundidade, em seis árvores escolhidas aleatoriamente em cada parcela, nas três posições topográficas (topo, encosta, baixada). O material coletado foi encaminhado ao laboratório em câmara úmida para os procedimentos

de caracterização dos morfotipos, diafanização, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura

Caracterização dos morfotipos

Os morfotipos de ectomicorrizas mais predominantes, associados à cultura de eucalipto em cada posição topográfica, foram observados sob lupa estereoscópica, fotografados e descritos baseando-se na forma e na cor das ectomicorrizas frescas descritas por Agerer (1992). Posteriormente, foram submetidos às técnicas de diafanização e microscopia eletrônica de varredura.

Diafanização e microscopia ótica de luz polarizada de raízes e ectomicorrizas

Amostras de raízes e de ectomicorrizas foram submetidas a três lavagens com tampão fosfato, pH 7,2, com o intuito de retirar o solo aderido à superfície. As raízes e ectomicorrizas foram desidratadas em séries de etanol 10, 30, 50, 70 e 90 % (v/v), durante 10 min cada. Em seguida, o material foi mantido em etanol 95 % (v/v), durante 12 h. Após esta fase, as amostras foram submetidas a técnicas de clareamento em solução de hipoclorito de sódio 1,8 % (v/v), segundo modificações de Ilarslan et al. (2001). As estruturas diafanizadas foram montadas em lâminas semipermanentes com gelatina glicerínada (Johansen, 1940). Efetuou-se a visualização dos CaOx e registro fotográfico com fotomicroscópio óptico, com filtros de luz polarizada (AX70TRF, Olympus Optical).

Microscopia eletrônica de varredura da superfície do manto

Ectomicorrizas que representavam os diferentes morfotipos encontrados na área de estudo foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 1 mol L⁻¹, pH 6,8–7,0, na proporção 1:1, por 1 h, lavadas em tampão fosfato 1 mol L⁻¹, pH 6,8–7,0, durante 10 min. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70 e 90 % v/v) e secas em ponto crítico (Bal.Tec. 030), utilizando carbono líquido. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro (Balzer, SCA010) e, finalmente, o material foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (LEO, VP 1430).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia e frequência de CaOx em raízes finas e ectomicorrizas de eucalipto

A microscopia óptica de luz polarizada de fragmentos diafanizados de raízes não colonizadas e de ectomicorrizas evidenciou a presença de depósitos de CaOx estendendo-se de forma basípeta a partir dos meristemas radiculares (Figura 1). De forma geral,

foi possível observar duas formas de CaOx: cristais do tipo grânulos, caracterizados como cristais amorfos, sem distribuição uniforme (Figura 1C,G), e do tipo drusas, caracterizados como conglomerados globulares, constituídos de cristais em forma de agulha (Figura 1A,B,D). Observou-se, também, que os CaOx com forma de drusas, presentes principalmente em ectomicorrizas, são maiores que os CaOx do tipo grânulos presentes em raízes não colonizadas (Figura 1D,H). Borchert (1985) e Mazen et al. (2004) relataram que o tamanho e a forma do cristal apresentam grande variação em relação à célula em que se encontra e ao ambiente onde é formado. Também, a quantidade de Ca^{2+} e de ácido oxálico disponível, entre outros fatores ambientais, são determinantes para essas características. Da mesma forma, os cristais variam quanto à distribuição, à frequência, à ocorrência, ao tamanho e à forma,

dependendo da planta (Osuji et al., 1997), sendo a morfologia e distribuição dos CaOx elementos cruciais para a função potencial no organismo (Webb, 1999).

Observou-se que 52,6 % das ectomicorrizas apresentaram abundante acúmulo de CaOx. Já as raízes não colonizadas apresentaram frequência de acúmulo de CaOx substancialmente mais baixa, 17,5 %, indicando que as ectomicorrizas associadas a *Eucalyptus* sp. induzem o armazenamento de Ca na forma de CaOx no sistema radicular da planta hospedeira.

Esses resultados evidenciam que a exploração do solo pelos FEM pode aumentar o Ca disponível para a planta nas raízes micorrizadas. A constituição de reservatórios de Ca na raiz na forma de CaOx, induzida pela colonização por FEM, sugere papel importante desses microrganismos no suprimento de Ca para o

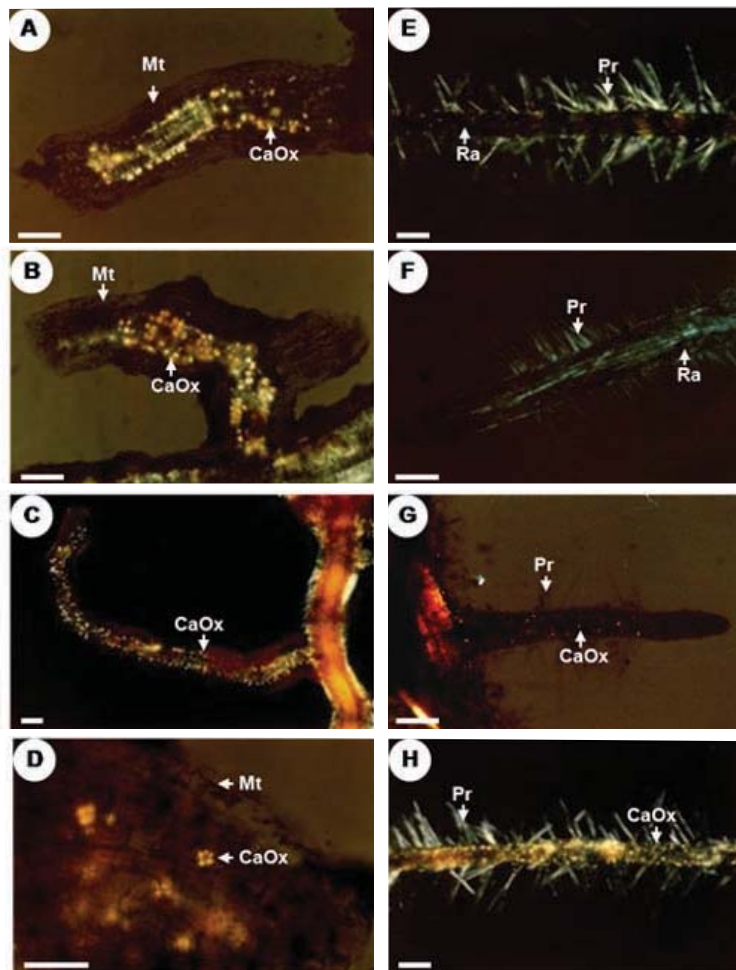


Figura 1. Ectomicorrizas (A-D) e raízes não micorrizadas (E-H) de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, coletadas em campo, submetidas à diafanização com hipoclorito de sódio a 1,8 % e observadas em microscópio óptico com luz polarizada para visualização de cristais de oxalato de Ca (CaOx). Os CaOx aparecem como pontos brilhantes nas estruturas diafanizadas. Observar os CaOx na forma de drusas (A, B, D) e CaOx do tipo granuloso (C, E, H). Manto micorrízico (Mt) e pelos radiculares (Pr) nas ectomicorrizas e raízes (Ra) do eucalipto, respectivamente. Barras: A, B, C, D = 50 μm , E, F, G e H = 200 μm .

eucalipto, especialmente durante a etapa de maior crescimento da planta, quando a demanda pelo elemento é alta e sua disponibilidade no solo é baixa (Ritchey et al., 1982; Barros & Novais, 1996). Alguns autores relatam que os CaOx não são reservatórios inertes de Ca, já que podem ser redissolvidos, mas constituem uma fonte de Ca para a célula (Franceschi, 1989; Webb, 1999).

Embora a função dos CaOx em plantas e fungos não seja bem conhecida (Webb et al., 1995; Webb, 1999), a presença desses elementos podem trazer alguns benefícios para os organismos que os produzem. Alguns autores afirmam que os CaOx constituem estratégias de defesa da planta contra organismos herbívoros (Saltz & Ward, 2000); regulam a concentração de Ca intracelular (Franceschi, 2001) e atuam na detoxificação de diferentes substâncias, como metais pesados e ácido oxálico na célula (Silva et al., 2001; Mazen, 2004). Hipoteticamente, a presença

de CaOx nas raízes e ectomicorrizas de eucalipto pode ter papel na detoxificação de elementos tóxicos no solo, a exemplo do alumínio, presente em altas concentrações no solo da área em estudo (ver Parte I).

Distribuição de CaOx em morfotipos predominantes de ectomicorrizas

Foram observados quatro morfotipos de ectomicorriza no topo (Figura 2) e na encosta (Figura 3) e dois na baixada (Figura 4). As ectomicorrizas associadas a eucalipto apresentaram forma variada, sem pelos radiculares e com manto recobrendo a superfície. Os 10 morfotipos de ectomicorriza relatados ilustram a diversidade de FEM que interage com as raízes da planta hospedeira na área estudada. Giachini et al. (2000) descreveram 49 espécies de FEM em plantações de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. no Estado de Santa Catarina e, recentemente, Campos (2004) observou 20 morfotipos

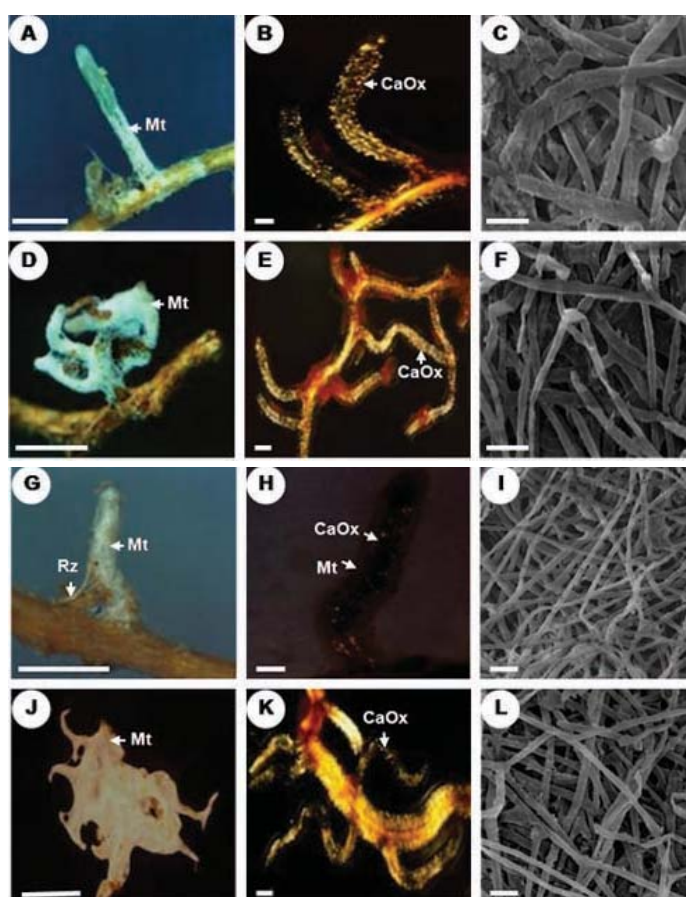


Figura 2. Morfologia de ectomicorrizas de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, coletadas no topo de área com topografia típica em meia laranja, de vertente côncavo-convexa, e observadas por microscopia óptica (A, D, G, J); por microscopia óptica de luz polarizada, para visualização de cristais de oxalato de Ca (CaOx). (B, E, H, K); e por microscopia eletrônica de varredura (C, F, I, L). As três fotos horizontais correspondem a um morfotipo distinto. Os CaOx aparecem como pontos brilhantes nas estruturas diafanizadas. Observar manto micorrízico (Mt), rizomorfos (Rz) e diferenças na distribuição de CaOx entre os diferentes morfotipos de ectomicorriza. Barras: A, D, G e J = 1 mm; B, E, H e K = 200 μ m; C = 3 μ m; F = 5 μ m; I = 20 μ m; L = 10 μ m.

distintos de FEM em povoamentos de eucalipto no Estado de Minas Gerais. Embora o número de morfotipos observados neste trabalho tenha sido menor, demonstrou-se que, mesmo em área ocupada inicialmente com pastagens e posteriormente cultivada com eucalipto por apenas 2,5 anos, a presença de FEM no plantio é significativa.

A diversidade de morfotipos observada nas diferentes posições topográficas sugere interação entre as características do ambiente e a prevalência de determinadas espécies fúngicas. Observou-se número superior de morfotipos ectomicorrízicos no topo e na encosta (Figuras 2 e 3), que apresentaram menor teor de Ca e Mg (Quadro 1 – Parte D). Já na baixada, o menor número de morfotipo de FEM pode estar relacionado aos teores mais elevados desses cátions no solo. A distribuição local das ectomicorrizas na floresta parece, de fato, ser controlada pelo hospedeiro em função das características ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e água (Allen et al., 1995).

Meyer et al. (1988) observaram que, em plantio de *Picea abies*, há correlação negativa entre a distribuição das ectomicorrizas associadas às árvores e as concentrações de cátions no solo.

Os diversos morfotipos de ectomicorriza das três posições topográficas submetidas a técnicas de diafanização apresentaram variada distribuição de CaOx nas células radiculares (Figuras 2, 3 e 4B, E, H, K).

Os CaOx observados nos morfotipos da encosta (Figura 3), onde o teor de Ca^{2+} foi virtualmente nulo (Quadro 1- Parte D), apresentaram abundantes cristais com morfologia granular. Já os morfotipos do topo e da baixada apresentaram cristais predominantemente na forma de drusas. Este fato está de acordo com o relato de Mazen et al. (2004), que observaram que, em raízes de *Lemma minor*, o tamanho e número de cristais aumentaram em função do aumento de Ca^{2+} no solo.

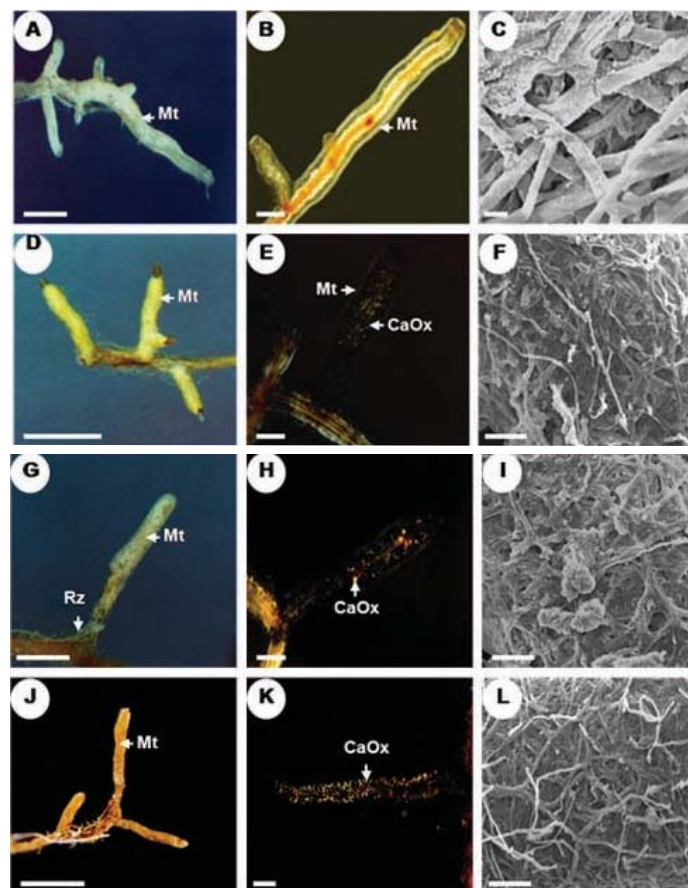


Figura 3. Morfologia de ectomicorrizas de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* coletadas na encosta de área com topografia típica em meia laranja de vertente côncavo-convexa, observadas por microscopia óptica (A, D, G, J); por microscopia óptica de luz polarizada, para visualização de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) (B, E, H, K); e por microscopia eletrônica de varredura (C, F, I, L). As três fotos horizontais correspondem a um morfotipo distinto. Os CaOx aparecem como pontos brilhantes nas estruturas diafanizadas. Barras: A, D, G e J = 1 mm; B, E, H e K = 200 μm ; C = 5 μm ; F = 15 μm ; I e L = 30 μm .

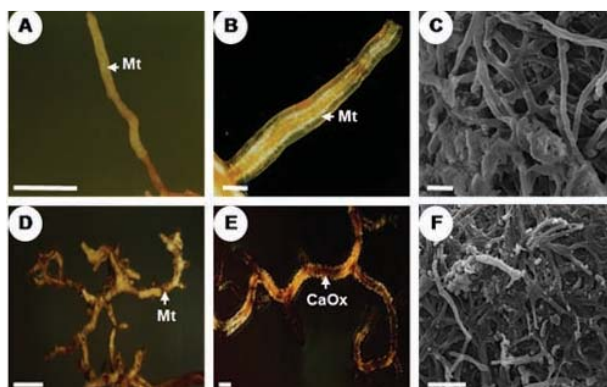


Figura 4. Morfologia de ectomicorrizas de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, coletadas na baixada de área com topografia típica em meia laranja de vertente côncavo-convexa, e observadas por microscopia óptica (A, D); por microscopia óptica de luz polarizada, para visualização de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) (B, E); e por microscopia eletrônica de varredura (C, F). As três fotos horizontais correspondem a um morfotipo distinto. Os CaOx aparecem como pontos brilhantes nas estruturas diafanizadas. Observar manto micorrízico (Mt), e diferenças na distribuição de CaOx entre os diferentes morfotipos de ectomicorriza. Barras: A e D = 1 mm; B e E = 200 μ m; C = 10 μ m; F = 30 μ m.

Neste trabalho, demonstrou-se que, mesmo em baixa disponibilidade de Ca^{2+} no solo, os FEM induzem o armazenamento de Ca pela planta, sugerindo maior aquisição do elemento quando as raízes encontram-se colonizadas pelos FEM. Este fato deve-se, possivelmente, à maior disponibilização do Ca no solo em decorrência da maiores concentrações de ácidos orgânicos na ectomicorrizosfera (Parte I).

Os CaOx observados não estavam associados ao manto fúngico, como foi evidenciado pela análise da superfície do manto por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 2, 3 e 4C, F, I, L). O depósito de CaOx no manto de fungos ectomicorrízicos, comum em solos calcários, sugere que a formação dos cristais nesta estrutura típica das ectomicorrizas constitui estratégia de tolerância às elevadas concentrações do elemento (Cromack et al., 1979; Connolly & Jellison, 1995; Tait et al., 1999; Arocena et al., 2001). Os depósitos cristalinos observados sugerem que os FEM induzem a formação dos CaOx nas células radiculares corticais por meio do incremento na concentração de Ca e exsudação de ácidos orgânicos pelo fungo. Em estudos de campo e casa de vegetação, foram evidenciados a absorção e o transporte de Ca em rizomorfos de FEM a partir de fontes minerais como apatita, resultando em teores de Ca de duas a três vezes maiores nos rizomorfos em comparação aos ápices radiculares (Wallender et al., 2002).

Este trabalho constitui o primeiro relato do acúmulo de Ca na forma de cristais de oxalato induzido pela associação ectomicorrízica nas raízes de eucalipto, sugerindo papel importante dos fungos ectomicorrízicos na aquisição de Ca para a planta com baixa disponibilidade do elemento no solo. No entanto, estudos são necessários para definir o quão disponível para as plantas são estas formas cristalizadas de Ca e quais são os fatores que controlam sua formação.

CONCLUSÕES

1. O acúmulo CaOx ocorre tanto nas raízes laterais finas não colonizadas quanto nas ectomicorrizas de eucalipto.
2. Fungos ectomicorrízicos associados às raízes laterais finas induzem maior acúmulo de CaOx nas células do córtex radicular da planta hospedeira.
3. A morfologia e a distribuição de CaOx variam com o morfotipo de ectomicorriza, evidenciando papéis distintos dos fungos ectomicorrízicos em induzir a formação de depósitos de Ca.
4. Maior quantidade de CaOx nas ectomicorrizas evidencia a contribuição de FEM na aquisição de Ca pelo eucalipto, mesmo em baixa disponibilidade do elemento no solo.

LITERATURA CITADA

- AGERER, R. Characterization of ectomycorrhiza. In: NORRIS, J.R.; READ, D.J. & VARMA, A.K., eds. Techniques of mycorrhizal research. San Diego, Academic Press, 1992. 928p.
- ALLEN, E.; ALLEN, M.F.; HELM, D.; TRAPPE, J.M.; MOLINA, R. & RINCON, E. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant Soil*, 170:47-62, 1995.
- AROCENA, J.M.; GLOWA, K.R. & MASSICOTTE, H.R. Calcium-rich hypha encrustations on *Piloderma*. *Mycorrhiza*, 10:209-215, 2001.
- 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.
- BORCHERT, R. Calcium-induced patterns of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. and *Albizia julibrissin* Durazz. *Planta*, 165:301-310, 1985.
- CAMPOS, D.T.S. Diversidade de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de eucalipto. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 82p. (Tese de Doutorado)
- CONNOLLY, J. & JELLISON, J. Calcium translocation, calcium oxalate accumulation, and hyphal sheath morphology in the white-rot fungus *Resinicium bicolor*. *Can. J. Bot.*, 73:927-936, 1995.

- CROMACK, K.; GRAUSTEIN, W.C.; SPEIDEL, K.; TODD, A.W.; SPYCHER, G.; LI, C.Y. & TODD, R.L. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of *Hysterangium crassum*. Soil Biol. Biochem., 11:463-468, 1979.
- CUMMING, J.R.; SWIGER, T.; KURNIK, B.E. & PANNACCIONE, G. Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminium *in vitro*. Can. J. For. Res., 31:703-710, 2001.
- ENTRY, J.A.; ROSE, C. & CROMACK, K. Microbial biomass and nutrient concentrations in hyphal mats of the ectomycorrhizal fungus *Hysterangium setchellii* in a coniferous forest soil. Soil Biol. Biochem., 5:447-453, 1992.
- FRANCESCHI, V.R. Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. Protoplasma, 148:130-137, 1989.
- FRANCESCHI, V.R. Calcium oxalate in plants. Trends Plant Sci., 6:331, 2001.
- FRANCESCHI, V.R. & NAKATA, P. Calcium oxalate in plants: Formation and function. Ann. Rev. Plant. Biol., 56:41-71, 2005.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A. & TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantation in Southern Brazil. Mycologia, 92:1166-1177, 2000.
- GOURLAY, I.D. & GRIME, G.W. Calcium oxalate crystals in African *Acacia* species and their analysis by scanning proton microprobe (SPM). IAWA J., 2:137-148, 1994.
- GRAUSTEIN, W.C.; CROMACK, K. & SOLLINS, P. Calcium oxalate: Occurrence in soils and effect on nutrient and geochemical cycles. Science, 432:1252-1254, 1977.
- ILARSLAN, H.R.; PALMER, G. & HORNER, H.T. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. Ann. Bot., 88:243-257, 2001.
- LAPEYRIE, F.; PICATTO, C.; GERARD, J. & DEXHEIMER, J.T. Study of intracellular and extracellular calcium oxalate accumulation by ectomycorrhizal fungi in pure culture or in association with *Eucalyptus* seedlings. Symbiose, 9:163-166, 1990.
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill. 1940. 523p.
- MALAJCZUCK, N. & CROMACK, K. Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhizal roots of *Pinus radiata* and *Eucalyptus marginata*. New Phytol., 4:527-531, 1982.
- MAZEN A.; ZHANG, D.Z. & FRANCESCHI, V.R. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: Physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. New Phytol., 161:435-448, 2004.
- MAZEN, A. Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related to accumulation of toxic metals. Russ. J. Plant Physiol., 51:281-285, 2004.
- MEYER, J.; SCHNEIDER, B.U.; WERK, K.; OREN, R. & SCHULZE, E.D. Performance of two *Picea abies* (L.) Karst. stands at different stages of decline. V. Root tips and ectomycorrhiza development and their relations to above ground and soil nutrients. Oecologia, 77:7-13, 1988.
- OSUJI, J.; OKOLI, B. & ORTIZ, R. Histochemical localization of calcium oxalate crystals in fruits of plantain and banana cultivars. Fruits, 52:5-10, 1997.
- RITCHEY, K.D.; SILVA, E. & COSTA, U. Calcium deficiency in clay B horizons of Savanna Oxisols. Soil Sci., 6:378-382, 1982.
- SALTZ, S. & WARD, D. Responding to a three-pronged attack: Desert lilies subject to herbivory by dorcas gazelles. Plant Ecol., 148:127-138, 2000.
- 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.
- TAIT, K.; SAYER, J.; GHARIEB, M.E. & GADD, G. Fungal production of calcium oxalate in leaf litter microcosms. Soil Biol. Biochem., 31:1189-1192, 1999.
- VALE, F.R.; FURTINI, N.; RENÓ, N.B.; FERNANDES, L.A. & RESENDE, A.V. Crescimento radicular de espécies florestais em solo ácido. Pesq. Agropec. Bras., 9:609-616, 1996.
- WALLENDER, H.; WICKMAN, T. & JACKS, G. Apatite as a P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. Plant Soil, 196:123-131, 1997.
- 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.
- WEBB, M. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. Plant Cell, 11:751-761, 1999.
- 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.
- WHITNEY, K. & ARNOTT, H.J. Calcium oxalate crystal morphology and development in *Agaricus bisporus*. Mycology, 79:180-187, 1987.
- ZUÑIGA, D.; GRAJEDA, J.; SEPULVEDA, J.; WITAKER, J. & MORENO, A. Cristalchemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coat of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. J. Plant Physiol., 190:239-245, 2003.