

JULIO CESAR DELVAUX

**Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral no Solo sob Florestas de
Eucalipto em Função do Fluxo de Carbono para a Rizosfera**

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

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

T

D367c
2012

Delvaux, Julio Cesar, 1984-

Comunidade microbiana e nitrogênio mineral no solo sob florestas de eucalipto em função do fluxo de carbono para a rizosfera / Julio Cesar Delvaux. - Viçosa, MG, 2012. xvii, 59f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Arnaldo Chacr Borges

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 48-59

1. Ecologia microbiana. 2. Micro-organismos do solo.
3. Eucalipto. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 577.82

JULIO CESAR DELVAUX

**Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral no Solo sob Florestas de
Eucalipto em Função do Fluxo de Carbono para a Rizosfera**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

JULIO CESAR DELVAUX

Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral no Solo sob Florestas de Eucalipto em Função do Fluxo de Carbono para a Rizosfera

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

APROVADA:

Prof. Maurício Dutra Costa
(Coorientador)

Prof. Júlio Cesar Lima Neves
(Coorientador)

Dr. Fernando Palha Leite

Prof^a. Célia Alencar de Moraes

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais.

Dedico.

ii

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos, pela minha vida e pela oportunidade de crescimento diante dos obstáculos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo acolhimento e pelas oportunidades.

À Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos técnicos da Sociedade de Investigações Florestais (SIF), pelo apoio logístico e pela disposição em ajudar em todas as fases desse trabalho.

Ao meu pai, Agostinho, e à minha mãe, Mariza, presentes em todos os momentos da minha vida, pelo apoio e pelo incentivo.

Ao meu irmão, Ricardo, um grande amigo e companheiro, pela ajuda em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arnaldo Chaer Borges, pela confiança, pela paciência, pelos seis anos de convivência e por despertar em mim a curiosidade pela pesquisa.

Aos meus grandes amigos, Paulo e Marcelo, pela amizade, paciência e disposição em ajudar e ensinar. O apoio de vocês foi fundamental para o sucesso desse trabalho.

À Fernanda, à Larissa e ao Naylor, pelo apoio e pela motivação durante os experimentos.

À professora Célia Alencar de Moraes pelos conselhos e pela ajuda na realização desse trabalho.

Aos professores, Maurício Dutra Costa e Júlio César Lima Neves, pela coorientação e pelos ensinamentos preciosos que nunca esquecerei.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, por ceder a estrutura do Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiental (LBBMA) e por sempre apoiar ações de capacitação dos servidores do DMB.

Ao Dr. Fernando Palha Leite, por aceitar participar da banca examinadora.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia, Danilo, José Evandro, Nilcea, Laura e Aline, Custódio, Pablo, José Carlos, Cesário e Karlos, pelo apoio durante essa caminhada.

Aos técnicos da CENIBRA, Gilson e Guilherme pelo apoio nos experimentos em campo.

Aos amigos dos laboratórios de Microbiologia Industrial, Fisiologia, Genética, LBBMA, Micorriza, Anaeróbios e Alimentos.

Aos colegas de turma, que junto comigo lutaram por essa vitória.

Ao meu amigo Leonardo Correa, pelos conselhos e pela motivação para concluir essa tarefa.

A todos, que de alguma forma, apoiaram a condução desse trabalho.

BIOGRAFIA

JULIO CESAR DELVAUX, filho de Agostinho Delvaux da Silva e Mariza da Silva Ferreira Delveaux, nasceu em Vitória – ES no dia 07 de janeiro de 1984.

Em março de 2006 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV) Viçosa, MG. Em janeiro de 2011, graduou-se em Agronomia e em março desse ano iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola no Departamento de Microbiologia da UFV e o Curso de Especialização em Gestão Ambiental da Universidade Cândido Mendes (UCAM).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 – INTRODUÇÃO.....	01
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 – Seleção das Áreas de Interesse.....	10
3.2 – Anelamento das Árvores.....	14
3.3 – Coleta de Amostras de Solo.....	15
3.4 – Análises dos Teores de Nutrientes nas Amostras de Solo.....	17
	vi

3.4.1 – Análises de Rotina.....	17
3.4.2 – Amônio e Nitrato em Extrato do Solo.....	19
3.5 – Atividade Microbiana.....	20
3.6 – Análise da Diversidade Genética das Populações Microbianas.....	21
3.6.1 – Extração do DNA Metagenômico.....	21
3.6.2 – Análise da Diversidade de Archaea.....	21
3.6.3 – Análise da Diversidade de Bacteria.....	23
3.6.4 – Análise da Diversidade de Fungos.....	25
4 – RESULTADOS.....	27
4.1 – Amônio e Nitrato em Extrato do Solo.....	27
4.2 – Atividade Microbiana.....	29
4.3 – Diversidade Genética.....	32
4.3.1 – Diversidade de Archaea do Solo.....	32
4.3.2 – Diversidade de Bacteria do Solo.....	35
4.3.3 – Diversidade de Fungos do Solo.....	38
5 – DISCUSSÃO.....	42
6 – CONCLUSÃO	47
7 – REFÊRENCIAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Linha do tempo de abordagens moleculares da rizosfera. Adaptado de Barret et. al., 2011.....07
- Figura 2:** Localização das áreas experimentais.....11
- Figura 3:** Anelamento de árvore com 18 meses de crescimento pós-plantio na área 1 (Projeto Catas Altas I).....14
- Figura 4:** A - Bloco de solo embalado e identificado para transporte em caixa com gelo moído para posterior remoção do solo rizosférico. B e C – Remoção do solo rizosférico em laboratório.....15
- Figura 5:** Preparo em campo do extrato para determinação dos teores de amônio e nitrato no solo. A - Remoção do solo rizosférico. B – Adição da solução extratora ($KCl\ 1,0\ mol\ L^{-1}$). C – Agitação contínua por 30 minutos. D – Filtração do extrato em papel de filtro quantitativo.....19
- Figura 6:** Posições de anelamento dos primers no rDNA 16S de Archaea. As regiões hipervariáveis (V) estão realçadas em cinza.....22

Figura 7: Posições de anelamento dos primers no rDNA 16S de Bacteria. As regiões hipervariáveis (V) estão realçadas em cinza.....23

Figura 8: Posições de anelamento dos primers no rDNA 18S. As regiões hipervariáveis (V) estão realçadas em cinza. Adaptado de Hoshino e Morimoto, 201025

Figura 9: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S, índices de Riqueza de UTOs (R) e Diversidade de Shannon (H) detectados com base na separação de amplicons de rDNA 16S (H) de comunidades de Archaea presentes em solos de florestas plantadas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/12); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores Aneladas; CR – Árvores não aneladas.....33

Figura 10: Análise de componentes principais (PCA) da comunidade de archaeas do solo. A ordenação considerou a presença e a ausência de amplicons rDNA 16S de Archaea.....34

Figura 11: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S, índices de Riqueza de UTOs (R) e Diversidade de Shannon (H) detectados com base na separação de amplicons de rDNA 16S (H) de comunidades de Bacteria presentes em solos de florestas plantadas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (05/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; NR – Solo não

rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores Aneladas; CR – Árvores não aneladas.....36

Figura 12: Análise de componentes principais (PCA) da comunidade de bactérias do solo. A ordenação considerou a presença e a ausência de amplicons rDNA 16S de Bacteria.....37

Figura 13: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 18S, índices de Riqueza de UTOs (R) e Diversidade de Shannon (H) detectados com base na separação de amplicons de rDNA 16S (H) de comunidades de fungos presentes em solos de florestas plantadas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil; C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores Aneladas; CR – Árvores não aneladas.....39

Figura 14: Análise de componentes principais (PCA) da comunidade de fungos do solo. A ordenação considerou a presença e a ausência de amplicons rDNA 18S de fungos.....40

Figura 15: Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectada por separação de amplicons de rDNA 16S de Archaea e Bacteria e rDNA 18S de fungos por DGGE.....41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características das áreas e dos povoamentos de eucalipto estudadas.....	10
Quadro 2: Características climáticas das regiões estudadas.....	12
Quadro 3: Histórico de precipitação na área estudada.....	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das amostras de solo armazenadas no LEM. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento pós-plantio; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento pós-plantio; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores aneladas; CR – Árvores não aneladas.....16

Tabela 2: Valores de indicadores químicos no solo (camada de 0 a 10 cm) sob florestas de eucalipto, áreas 1 e 2, nos períodos seco e chuvoso.....18

Tabela 3 – Médias dos teores de amônio e nitrato em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 18 meses pós – plantio (Projeto Catas Altas I) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.....28

Tabela 4 – Médias dos teores de amônio e nitrato em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 72 meses pós – plantio (Projeto Serra do Pinho) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.....29

Tabela 5 – Médias dos valores de respiração em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 72 meses pós – plantio (Projeto Serra do Pinho) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.....30

Tabela 6 – Médias dos valores de respiração em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 18 meses pós – plantio (Projeto Catas Altas I) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.....31

RESUMO

DELVAUX, Julio Cesar, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro, 2012. **Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral no Solo sob Florestas de Eucalipto em Função do Fluxo de Carbono para a Rizosfera.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Coorientadores: Júlio César Lima Neves e Maurício Dutra Costa.

O eucalipto ocupa posição de destaque no setor florestal brasileiro em razão do rápido crescimento e adaptabilidade às diversas condições edafoclimáticas e das características tecnológicas da madeira. Entretanto, as respostas da planta à adição de nitrogenados em florestas continuam suscitando questionamentos. A estratégia de estudo considerando o balanço energético do sistema solo-planta pela existência de um “nitrostato” que controla as entradas e saídas do nitrogênio representa modelo a ser validado para otimizar a produtividade com economia na fertilização nitrogenada em florestas da região tropical. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a influência da interrupção do fluxo de fotoassimilados da parte aérea para a rizosfera pelo anelamento de árvores sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo e nitrogênio mineral. O estudo foi conduzido em duas fases de crescimento pós-plantio em florestas de eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, áreas sob domínio do Bioma Mata Atlântica. Os maiores teores de carbono orgânico total do solo, $3,95 \text{ dag kg}^{-1}$ em floresta com 18 meses de desenvolvimento pós-plantio e $3,62 \text{ dag kg}^{-1}$ na com 72 meses, ocorreram no período chuvoso. Os teores de NH_4^+ em torno de 27 mg kg^{-1} de solo seco, e os de

NO_3^- em torno de 40 mg kg^{-1} de solo seco, foram maiores durante os períodos úmidos e correspondentes a aproximadamente duas vezes os valores do período seco. Já valores de respiração no solo foram maiores na época seca. O índice de diversidade de Shanon (H) variou de 1,7 a 3,5 considerando os domínios, Bacteria, Archaea e Eukarya nas duas fases de crescimento pós-plantio e mostrou que a fase de crescimento não afetou a diversidade microbiana. A avaliação dos perfis de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) revelou pelo método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA) a tendência de agrupamento dos perfis das amostras coletadas na rizosfera, donde se inferiu a existência de capacidade da planta de moldar a estrutura da comunidade microbiana na rizosfera e rizoplano. A variação dos perfis de DGGE dentro de gradiente sazonal mostrou que o aporte de fotoassimilados para a rizosfera e a umidade determinam a estrutura da comunidade microbiana em solos sob florestas plantadas de eucalipto.

ABSTRACT

DELVAUX, Julio Cesar, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2012. **Microbial community and mineral nitrogen in soils under a Eucalyptus plantation in function of Carbon Flow in the Rhizosphere.** Adviser: Amaldo Chaer Borges. Co-Advisers: Júlio César Lima Neves and Maurício Dutra Costa.

Eucalyptus are fast growing woody plants with the ability to adapt when exposed to different edaphoclimatic conditions and with woody technological characteristics that make them important players in the Brazilian forest sector. However, the plant responses to the nitrogen additions continue raising questions. The strategy of study considering the soil-plant energetic balance by the existence of a nitrostat represents a model to be validated in order to optimize the productivity by saving in the nitrogen fertilization in tropical forests. This work aimed to evaluate the effect of the photoassimilates flow from aerial part of the plants by girdling the eucalyptus trees in the soil microbial community structure and in the mineral nitrogen. The study was performed in two distinct growth stages of two post-planting growth stage in Eucalyptus forests in the Vale do Rio Doce area, Minas Gerais state, Brazil, dominated by Atlantic Forest biome. The highest total organic carbon content, 3.95 dag kg^{-1} in forests with 18 months of post-planting development and 3.62 dag kg^{-1} in those with 72 months, were found during the rainy season. The NH_4^+ content around 27 mg kg^{-1} in the dry soil,

and the NO_3^- content around 40 mg kg^{-1} , were higher during the wet season and about twice the amount found during the dry season. The Shannon (H) diversity index ranged from 1.7 to 3.5 considering the Bacteria, Archaea and Eukarya domains and showed no effect of growth stage in the microbial diversity. Clustering analysis by the method of Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) of the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) profiles revealed that samples from rhizosphere grouped together, showing that plants have the ability to recruit a specific microbial community in the rhizosphere and in the rhizoplane. Changes in the DGGE profiles within a seasonal gradient point out that the input of photoassimilates to the rhizosphere and the moisture determine the microbial community structure in soil under Eucalyptus forests.

1 – INTRODUÇÃO

As florestas plantadas de *Eucalyptus* atuam como “dreno” do CO₂ em função das altas taxas de crescimento das árvores e da elevada quantidade de biomassa produzida. Ao mesmo tempo, são também a principal “fonte” de compostos para a formação e manutenção da matéria orgânica do solo, essencial para manter os ciclos biogeoquímicos, a produtividade e a sustentabilidade dos sistemas florestais. O papel dos micro-organismos nos ciclos que impactam as mudanças climáticas é reconhecido como relevante (REID, 2011) e a determinação da diversidade microbiana e de sua atividade - taxas, fluxos, destino dos gases faz-se necessária para que os processos em que participam possam ser inclusive incorporados nos denominados modelos climáticos globais (GCMs) (SPRACKLEN et al., 2012; COMSTEDT et al., 2010).

Estudos realizados em regiões tropicais indicam que solos sob florestas de eucalipto de rápido crescimento são os principais componentes do estoque de carbono no sistema solo-planta (GATTO et al., 2010). A magnitude e a direção das transformações do nitrogênio e carbono orgânico após a implantação de florestas de eucalipto nos trópicos podem exercer o denominado efeito “nitrostato” (JACKSON et al., 2008; HEDIN et al., 2009). Observações sobre o ciclo do nitrogênio ao longo dos séculos indicam que

florestas tropicais acumulam e reciclam grandes quantidades de nitrogênio quando comparadas a florestas temperadas (HEDIN et al., 2009). Segundo esses autores a circulação do nitrogênio pelos compartimentos do sistema solo-planta parece sofrer efetivo controle do componente planta, que age como um nitrostato e regula, de forma dinâmica, as concentrações deste elemento nos dois componentes. O modelo do nitrostato propõe que as entradas e saídas do nitrogênio nos ecossistemas estão diretamente relacionadas ao balanço energético do sistema, de forma a evitar perdas deste elemento. Os trabalhos já desenvolvidos em ecossistemas tropicais fortalecem a hipótese da existência do nitrostato (MENGE & HEDIN 2009) e constituem questões não comprovadas em florestas de eucalipto no Brasil.

Os estudos dos efeitos da sazonalidade, idade da planta, estrutura e atividade da comunidade microbiana sobre o nitrostato tornam-se importantes para determinar o paradoxo do nitrogênio em florestas de eucalipto (CAO et al., 2010).

O balanço energético do sistema solo-planta pode ser alterado em florestas plantadas com o uso da técnica de anelamento da árvore para interromper o fluxo de fotoassimilados da parte aérea para a rizosfera. Essa forma é a sugerida para o estudo do comportamento da comunidade microbiana do solo sem perturbação desse ecossistema (HÖGBERG & READ, 2006). Estudos sobre a estrutura e a dinâmica da comunidade microbiana em florestas de eucalipto deverão contribuir para elucidar a hipótese do nitrostato em função das variações sazonais e fases distintas de crescimento da planta.

O fornecimento de nitrogênio às árvores de eucalipto relaciona-se diretamente à contribuição de diazotróficos e da comunidade microbiana em função do aporte de carbono ao sistema solo-planta.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a influência da interrupção do fluxo de fotoassimilados da parte aérea para as raízes e da sazonalidade sobre a estrutura, atividade das comunidades microbianas e os teores de nitrogênio mineral no solo sob florestas de eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

Os segmentos do setor florestal brasileiro empregam 5 % da população economicamente ativa e contribuem anualmente com mais de R\$ 50 bilhões para o produto interno bruto (PIB) do Brasil (ABRAF, 2012). Nesse setor, plantas do gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) ocupam posição de destaque em razão do rápido crescimento e adaptabilidade às diversas condições edafoclimáticas e características tecnológicas da madeira.

As florestas plantadas de eucalipto no Brasil estão distribuídas, em sua maioria, em áreas dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Pará e Espírito Santo. Atualmente, está ocorrendo novo ciclo de expansão de plantios no Maranhão e Piauí para atender a demanda das indústrias de celulose e de “pellets” em processo de instalação nesses Estados. O crescimento médio anual de áreas com florestas plantadas no país correspondeu a 6,9% entre 2005-2009 (RIBASKI, 2008; ABRAF, 2012). Os produtos industrializados oriundos dos segmentos do setor florestal colocam o país entre os que ocupam posição de destaque no ranking dos maiores produtores e exportadores mundiais (FAO, 2008).

O *Eucalyptus* inclui mais de 700 espécies, representadas em sua maioria por árvores com alta taxa de crescimento, plasticidade e forma retilínea do fuste (RIBASKI, 2008). No Brasil, as plantas do híbrido resultante do cruzamento de *E. grandis* x *E. urophylla* são bem adaptadas às condições edafoclimáticas, apresentam crescimento uniforme, alta produção de celulose e, por isso, impulsionaram o crescimento das florestas plantadas a partir da década de 1990 (LOPES, 2008).

As árvores de eucalipto em florestas aportam grandes quantidades de carbono e nitrogênio ao solo na forma de resíduos (folhas, galhos, raízes mortas) e de exsudatos (FONTAINE et al., 2004; JACKSON et al., 2008; YARWOOD et al., 2009). A presença desses compostos na rizosfera integra o complexo habitat composto por ampla diversidade de organismos que interagem em diversos níveis (BAIS et al., 2006; BARRET, 2011).

A matéria orgânica acumulada no solo, juntamente com os exsudatos radiculares, representam a principal fonte de energia para os microorganismos que promovem a ciclagem da matéria orgânica e, por isso exercem papel chave nos ciclos do carbono e do nitrogênio (BUCKLEY & SCHMIDT, 2002). Como a maior parte do carbono disponível para os microorganismos do solo é derivada da fotossíntese, os processos ou fatores que a influenciam também afetam a alocação de carbono para a parte aérea e raízes, podendo controlar a disponibilidade de carbono no solo e, conseqüentemente, a atividade e a composição da comunidade microbiana (JACKSON et al., 2008). As principais vias de transporte do carbono fixado pela fotossíntese para o solo são via floema, deposição do material vegetal e a de decomposição de raízes mortas (WARDLE, 1992; JACKSON et al., 2008). A introdução de fotoassimilados no solo via raízes representa importante fonte de compostos de carbono prontamente assimiláveis para a microbiota, sendo um dos principais fatores que determinam a presença e a atividade da comunidade microbiana na rizosfera (YARWOOD et al. 2009).

A quantidade e a qualidade dos compostos de carbono e do nitrogênio disponíveis no solo controlam a dinâmica das populações e processos microbianos, incluindo a fixação biológica, a nitrificação e a desnitrificação. É sabido que fatores sazonais influenciam diretamente a

transferência subterrânea de carbono e nitrogênio realizada pelas árvores e por processos microbianos (CANNELL & DEWAR, 1994). Especificamente, afetam diretamente a fisiologia das árvores, principalmente a fotossíntese e a rizodeposição (KANDELER et al., 2006; HAASE et al., 2007; COMPANT et al., 2010; RASCHE et al., 2011).

A determinação da composição dos exsudatos radiculares em cultivos de tremoço branco e milho, seguida da adição de exsudatos radiculares artificiais, evidenciaram que a composição desses exsudatos afeta a estrutura da comunidade microbiana do solo (MARSCHNER et al., 2002; BAUDOIN et al., 2003).

O anelamento de árvores ao interromper o fluxo de fotoassimilados da parte aérea para a zona radicular evita a perturbação física do solo (HÖGBERG et al., 2006). Entretanto, não existem relatos da utilização do anelamento para estudo da estrutura da comunidade microbiana em solos de florestas plantadas com eucalipto no Brasil. Essa técnica é utilizada em estudos de respiração do solo, com intuito de separar a respiração heterotrófica da autotrófica, bem como em estudos de modificações físico-químicas do solo causadas pela exsudação radicular (BINKLEY et al., 2006; DANNENMANN et al., 2009). A exsudação radicular é o principal motor da respiração do solo e o anelamento representa uma poderosa ferramenta para o entendimento da dinâmica das comunidades microbianas do solo em função da alocação de compostos de carbono para as raízes (CHEN et al., 2010).

Os valores de respiração no solo são similares aos da fixação de carbono pela fotossíntese terrestre e superam os das emissões antrópicas. Estima-se que mais da metade dessas emissões seja fruto da respiração de raízes ou de micro-organismos da rizosfera, diretamente influenciada pela fotossíntese (HÖGBERG & READ, 2006). A respiração no solo é um indicador robusto da atividade de populações microbianas e de fácil reprodução. Ela permite comparações entre diversos habitats e reflete mudanças ocasionadas por distintos manejos e variações sazonais (MACHULLA, 2003). Autores admitem que 25 % do CO₂ emitido para a atmosfera seja proveniente da respiração em solos sob florestas (RAICH &

SCHLESINGER, 1992; RAICH & POTTER, 1995; VAN DER WERF et al., 2009).

A formação de comunidades específicas associadas à rizosfera de espécies vegetais é determinada por complexas interações gênicas. A abordagem molecular a partir da década de 1970 tem contribuído para o maior conhecimento dessas interações (RAINEY, 1999) e surgimento de novas tecnologias (Figura 1).

Técnicas de *fingerprinting* são capazes de fornecer dados sobre a diversidade genética de um ambiente específico, bem como propiciar comparações entre diferentes habitats. A Eletroforese em Gel Desnaturante com Gradiente (DGGE) é talvez a mais usada entre as técnicas denominadas de independentes de cultura. Baseia-se na separação de *amplicons* do mesmo tamanho, mas que diferem em seu perfil de desnaturação em razão das diferenças em sua sequência de bases (ERCOLINI, 2004).

Os estudos sobre a diversidade de micro-organismos do solo, sua composição e funcionamento, são complexos em razão de sua heterogeneidade física, química e biológica e, também, das relações entre a quantidade de espécies e a abundância de micro-organismos (DANIEL, 2005; LIMA, 2011). A diversidade microbiana pode ser conceituada em termos ecológicos e moleculares como o número e a distribuição de sequências distintas presentes no DNA extraído diretamente da comunidade microbiana de um determinado habitat (VAN ELSAS et al., 2004). A sua quantificação com uso de índices, como o de Shannon (H), é de importância em análises de fenômenos como sucessão, colonização e resposta a distúrbios antrópicos ocorridos em determinado ambiente. Autores destacam que são poucos os estudos em que se avalia a estrutura da comunidade microbiana do solo sob floresta de eucalipto (CAO et al., 2010).

A maior parte das plantas estudadas no planeta apresentam simbioses bem sucedidas com grande variedade de micro-organismos (BRUNDRETT, 2009), muitos deles colonizando a rizosfera (BENT, 2006; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

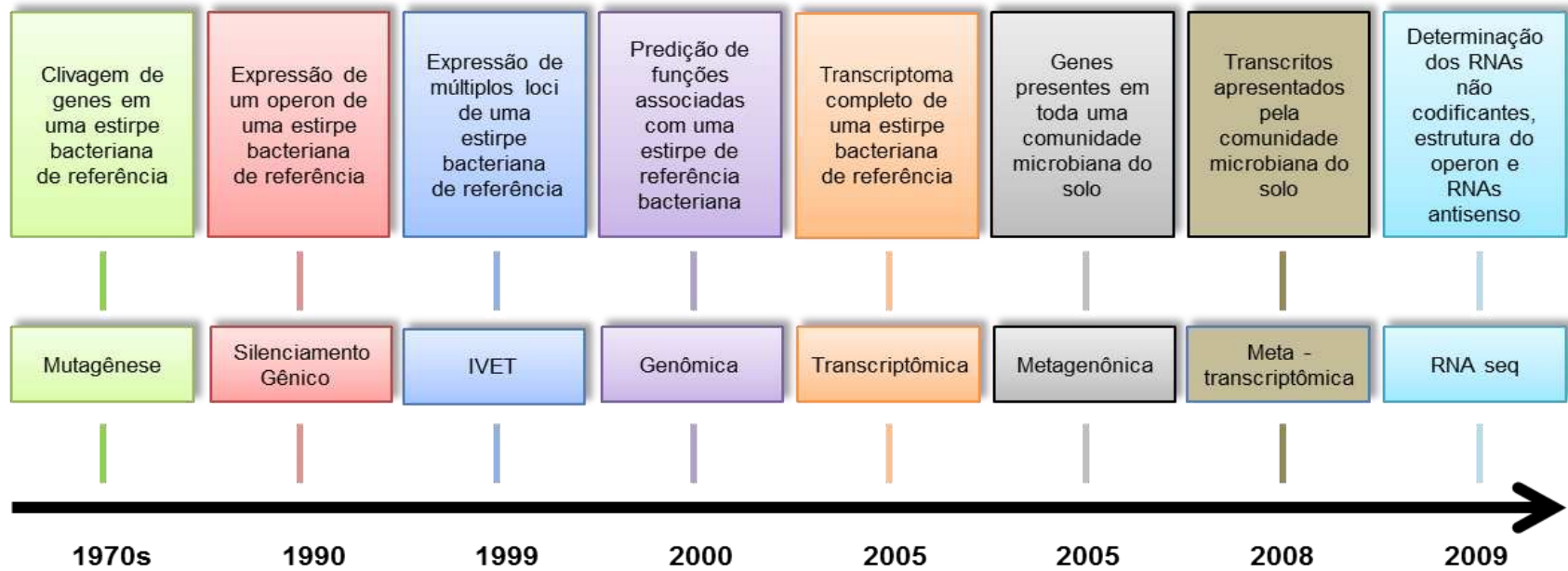


Figura 1: Linha do tempo de abordagens moleculares da rizosfera. Adaptado de Barret et. al., 2011.

Em áreas sob florestas de eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil a DGGE com uso de *primers* grupo-específico para Firmicutes mostrou-se com maior sensibilidade para detectar diferenças causadas pelo efeito do uso da terra, com aumento da diversidade em solos sob eucalipto quando comparada com a de matas nativas. As diferenças quanto ao uso e classe de solo são reveladas com maior sensibilidade com o uso de grupos de *primers* específicos para gama-Proteobacteria, leveduras e fungos na DGGE (CAMPELO, 2008).

O estresse hídrico durante o período seco reduz o crescimento de raízes e da parte aérea e altera a partição de carbono na planta (COMPANT et al., 2010).

Teores de amônio e nitrato em solos de áreas cultivadas com eucalipto no sudeste brasileiro apresentam valores substancialmente elevados após o corte das árvores, possivelmente em razão das condições propícias à conservação do nitrogênio. Ao mesmo tempo, tal acúmulo não se mostra compatível com os dados de balanços de nitrogênio em florestas comerciais de eucalipto, quando se considera as quantidades do nitrogênio adicionadas em fertilizantes, sugerindo a existência de aporte desse elemento de fontes ainda não determinadas (COSTA, 1995). Os plantios de eucalipto são realizados em áreas de solos ácidos e de baixa fertilidade que requerem aporte significativo de nutrientes (BARROS et al., 2004). Entretanto, o eucalipto apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada, possivelmente porque as diversas fontes naturais de nitrogênio são suficientes para atender à demanda das plantas (GAMA-RODRIGUES et al., 2005). A mineralização do nitrogênio orgânico ao longo do ciclo de desenvolvimento do eucalipto pode representar a principal fonte de nitrogênio para a cultura e, com o esgotamento da reserva de nitrogênio orgânico potencialmente mineralizável após vários ciclos da cultura espera-se respostas das plantas à adubação nitrogenada (SMETHURST et al., 2003; PULITO, 2009).

A hipótese da existência de nitrostato em funcionamento nas florestas de eucalipto em região tropical, modulando o balanço de nitrogênio e carbono em função da disponibilidade de energia no sistema solo-planta,

motivou o presente estudo em florestas de eucalípto em duas fases de crescimento pós-plantio, na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Seleção das Áreas de Interesse

As áreas experimentais foram demarcadas na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil, de propriedade da Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), cultivadas com *Eucalyptus urograndis* clone 386[®], que apresentam baixa resposta à adubação nitrogenada, situados nos municípios de Catas Altas (Área 1 – Projeto Catas Altas I) e Santa Bárbara (Área 2 – Projeto Serra do Pinho), Minas Gerais (Figura 2).

O talhão amostrado na área 1 (Projeto Catas Altas I) está no sétimo ciclo de cultivo (implantação em dezembro de 1970), apresentando produtividade média de 340 m³ ha⁻¹ e o talhão amostrado na área 2 (Projeto Serra do Pinho) no terceiro ciclo de cultivo (implantação em dezembro de 1989), com produtividade média de 340 m³ ha⁻¹ (Quadro 1).

Quadro 1: Características das áreas e dos povoamentos de eucalipto estudadas

Projeto	Lat. (w)	Long. (s)	Altitude (m)	Solo	Ano do início do plantio com eucalipto	Produtividade do eucalipto m ³ ha ⁻¹
Catas Altas I	43° 24' 54"	19° 57' 32"	750	LAd1	1970	340
Serra do Pinho	43° 24' 28"	20° 4' 30"	740	LAW2	1989	340

Fonte: Cenibra e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

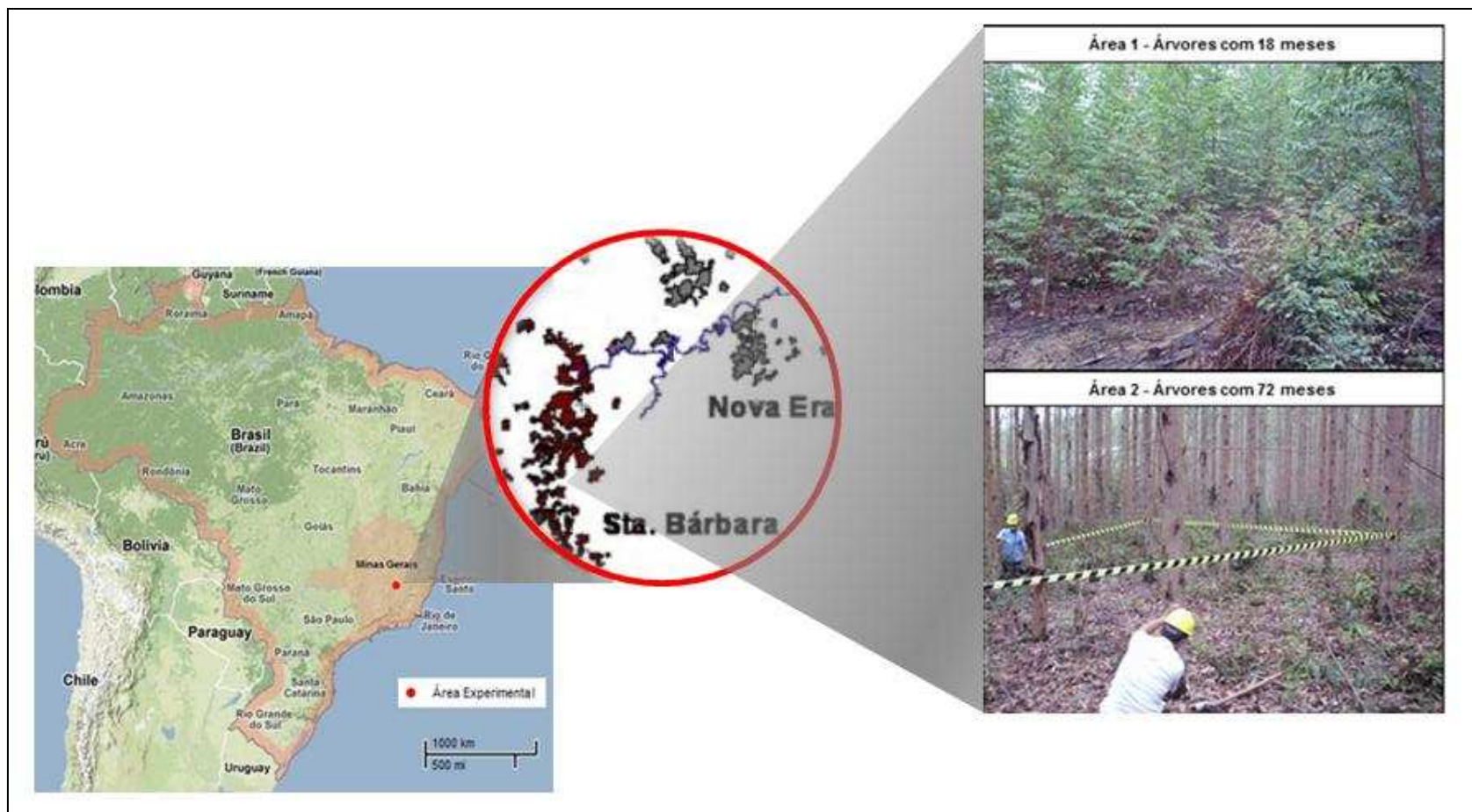


Figura 2: Localização das áreas experimentais.

Nas duas regiões predominam solos altamente intemperizados com relevo movimentado, de ondulado a forte ondulado. A classe de solo mais representativa é Latossolo Amarelo.

Os solos das áreas 1 e 2 apresentam classe textural franco – argilo – arenoso.

A vegetação natural dessas áreas era de floresta estacional semidecidual e foi substituída inicialmente pela cultura do café, seguida de pastagens (LEITE, 2000). Posteriormente, áreas de floresta nativa e extensas áreas de pastagens, a maioria delas degradadas, foram ocupadas com a cultura do eucalipto (LEITE, 2001; MENEZES, 2005).

As duas áreas apresentam tipo climático Cwa (mesotérmico) pela classificação de Köppen, caracterizado por inverno seco e estação chuvosa no verão (Quadros 2 e 3).

Quadro 2: Características climáticas das regiões estudadas

Variável	
Temperatura máxima (°C)	26,4
Temperatura mínima (°C)	16,9
Temperatura média (°C)	21,6
Umidade Relativa (%)	67,0
Vento (m/s)	2,3
Precipitação (mm)	122,9
Déficit hídrico (mm)	15,3
Exc. hídrico (mm)	49,9*

Fonte: Cenibra - Estação Climatológica do Gaspar. Médias dos últimos 22 anos.

* Média do ano de 2012.

As parcelas experimentais foram delimitadas na porção central dos talhões dos plantios indicados pela empresa em área correspondente a 90 m², formando dois blocos contendo plantas com 18 meses de idade, bem como outros dois blocos contendo plantas com 72 meses de idade. O espaçamento entre as árvores nas florestas das duas áreas é de 3,33 x 3 metros e o calendário das amostragens estabelecido para o início do período chuvoso (12/10/11), período chuvoso (16/12/11) e período seco (02/05/12).

Quadro 3: Histórico de precipitação na área estudada

Ano	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
	mm ³											
2011	243,0	123,4	329,5	93,7	21,3	8,9	1,8	1,0	8,9	231,4	431	664,2
2012	382,3	28,7	166,1	21,8	138,6	16,5	0,0	5,3	36,8	-	-	-

Fonte: Cenibra - Estação Climatológica do Gaspar

A fertilização de implantação na área 1 (Projeto Catas Altas I) foi feita com 100 g planta⁻¹ de NPK 6-30-6 (0,25% B, 1,0% Zn e 1,0% Cu) . A primeira adubação de manutenção consistiu na aplicação de 300 kg ha⁻¹ de NPK 6-10-29 (0,6% B, 0,5% Zn e 0,5% Cu) e a segunda na aplicação de 200 kg ha⁻¹ de NPK 6-10-29 (0,6% B, 0,5% Zn e 0,5% Cu). A calagem consistiu na aplicação de 1500 kg ha⁻¹ de Calcário/Lama+Mg. Na área 2 (Projeto Serra do Pinho) o plantio foi feito com 90 g planta⁻¹. Foram aplicados 400 kg ha⁻¹ de Fosfato Reativo; KCl + B (1,2 %) + Zn(1,0%) + Cu (0,5%) na quantidade de 350 kg ha⁻¹; e 30 kg ha⁻¹ de Borogran, como adubação de manutenção. A calagem consistiu na aplicação de 2000 kg ha⁻¹ de Calcário/Lama+Mg.

3.2 – Anelamento das Árvores

O anelamento das árvores de um dos dois blocos nos talhões das parcelas experimentais delimitadas nas áreas 1 (Projeto Catas Altas I) e 2 (Projeto Serra do Pinho) foi realizado por ocasião da primeira coleta, pela remoção de 20 cm da casca ao redor do tronco, a 1,5 m acima do solo (Figura 3). O bloco com árvores não aneladas representou o tratamento controle. O anelamento das árvores foi realizado para interromper o fluxo de compostos de carbono para a rizosfera via floema (HÖGBERG, 2006).

Ao longo do período experimental as árvores aneladas foram monitoradas semanalmente para retirada de brotações, afim de evitar o fluxo de fotoassimilados para as raízes.

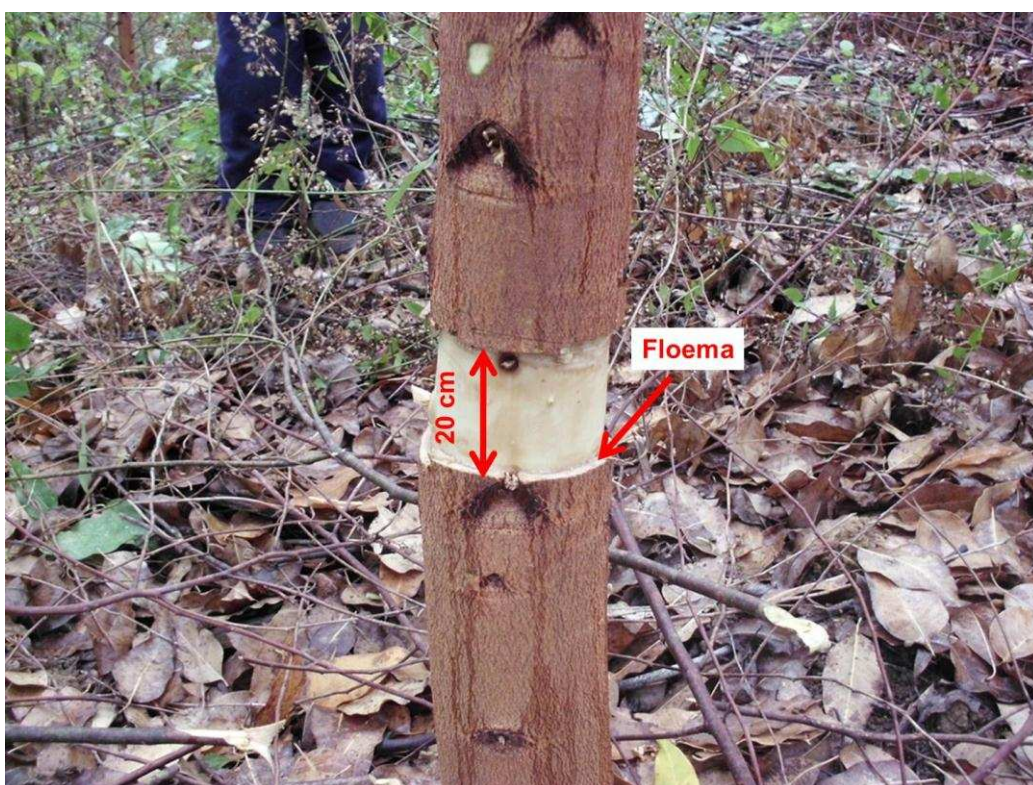


Figura 3: Anelamento de árvore com 18 meses de crescimento pós-plantio na área 1 (Projeto Catas Altas I).

3.3 – Coleta de Amostras de Solo

As amostras de 500 g de solo da camada de 0-10 cm foram coletadas no entorno da árvore central de cada bloco, estabelecendo-se o raio médio de coleta de maneira a interceptar a zona de crescimento de raízes finas, próximas à superfície do solo. Blocos de solo contendo raízes finas em crescimento foram também coletados e embalados para transporte em caixas com gelo picado até o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), onde foram codificadas (Tabela 1) e conservadas a -20 °C. Após o descongelamento efetuado à temperatura ambiente, o solo rizosférico foi removido das raízes finas com pincel esterilizado e recolhido em placas de Petri esterilizada (Figura 4).



Figura 4: A - Bloco de solo embalado e identificado para transporte em caixa com gelo moído para posterior remoção do solo rizosférico. B e C – Remoção do solo rizosférico em laboratório.

Tabela 1: Identificação das amostras de solo armazenadas no LEM. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento pós-plantio; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento pós-plantio; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores aneladas; CR – Árvores não aneladas.

ÉPOCA	ÁREA	TRATAMENTO	SOLO	AMOSTRA	CÓDIGO
INÍCIO DO PERÍODO CHUVOSO	ÁREA 1	ANELADAS	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 500	C1-A1-NR-AN
				LEM 501	C1-A1-NR-AN
		RIZOSFÉRICO		LEM 502	C1-A1-SR-AN
				LEM 503	C1-A1-SR-AN
				LEM 504	C1-A1-NR-CR
		CONTROLE	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 505	C1-A1-NR-CR
	RIZOSFÉRICO		LEM 506	C1-A1-SR-CR	
			LEM 507	C1-A1-SR-CR	
	ÁREA 2	ANELADAS	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 508	C1-A2-NR-AN
				LEM 509	C1-A2-NR-AN
			RIZOSFÉRICO	LEM 510	C1-A2-SR-AN
		RIZOSFÉRICO		LEM 511	C1-A2-SR-AN
				LEM 512	C1-A2-NR-CR
				LEM 513	C1-A2-NR-CR
		CONTROLE	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 514	C1-A2-SR-CR
RIZOSFÉRICO			LEM 515	C1-A2-SR-CR	
				LEM 516	C2-A1-SR-AN
PERÍODO CHUVOSO	ÁREA 1	ANELADAS	RIZOSFÉRICO	LEM 517	C2-A1-SR-AN
				LEM 518	C2-A1-NR-AN
		NÃO RIZOSFÉRICO		LEM 519	C2-A1-NR-AN
				LEM 520	C2-A1-SR-CR
				LEM 521	C2-A1-SR-CR
		CONTROLE	RIZOSFÉRICO	LEM 522	C2-A1-NR-CR
	NÃO RIZOSFÉRICO		LEM 523	C2-A1-NR-CR	
				LEM 524	C2-A2-SR-AN
	ÁREA 2	ANELADAS	RIZOSFÉRICO	LEM 525	C2-A2-SR-AN
				LEM 526	C2-A2-NR-AN
			NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 527	C2-A2-NR-AN
		RIZOSFÉRICO		LEM 528	C2-A2-SR-CR
				LEM 529	C2-A2-SR-CR
				LEM 530	C2-A2-NR-CR
		CONTROLE	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 531	C2-A2-NR-CR
			LEM 532	C3-A1-SR-AN	
			LEM 533	C3-A1-SR-AN	
ÁREA 1	ANELADAS	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 534	C3-A1-NR-AN	
			LEM 535	C3-A1-NR-AN	
	RIZOSFÉRICO		LEM 536	C3-A1-SR-CR	
			LEM 537	C3-A1-SR-CR	
			LEM 538	C3-A1-NR-CR	
	CONTROLE	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 539	C3-A1-NR-CR	
		LEM 540	C3-A2-SR-AN		
		LEM 541	C3-A2-SR-AN		
ÁREA 2	ANELADAS	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 542	C3-A2-NR-AN	
			LEM 543	C3-A2-NR-AN	
	RIZOSFÉRICO		LEM 544	C3-A2-SR-CR	
			LEM 545	C3-A2-SR-CR	
			LEM 546	C3-A2-NR-CR	
	CONTROLE	NÃO RIZOSFÉRICO	LEM 547	C3-A2-NR-CR	

3.4 –Análises dos Teores de Nutrientes nas Amostras de Solo

3.4.1 – Análises de Rotina

As análises dos teores de nutrientes realizadas para avaliação da fertilidade de solo em cada uma das três épocas de coleta foram realizadas por métodos padrão do Laboratório de Análise Química de Solo do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se das amostras compostas coletadas da camada 0-10 cm do solo nos blocos estabelecidos . Nessas amostras, procedeu-se às análises: pH em água e em KCl; Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; K, P, Zn, Cu, Fe e Mn disponíveis, pelo Mehlich-1; B, extraído com água quente; H + Al, com NH₄OAC 1 mol L⁻¹ a pH 7,0; e carbono orgânico por oxidação da matéria orgânica pelo método de Walkley-Black (ALVAREZ et al., 1999).

Tabela 2: Valores de indicadores químicos no solo (camada de 0 a 10 cm) sob florestas de eucalipto, áreas 1 e 2, nos períodos seco e chuvoso.

	Período Chuvoso		Período Seco	
	Área 1	Área 2	Área 1	Área 2
pH _{H2O}	5,54	4,94	5,61	5,45
pH _{KCl}	4,18	4,07	4,38	4,27
P _{rem}	26,00	17,40	26,90	20,30
P	7,70	3,10	13,60	2,50
K	95,00	39,00	135,00	58,00
Zn	2,92	1,47	1,44	0,76
Fe	157,90	87,30	139,40	76,00
Mn	13,70	9,80	16,90	12,20
Cu	2,02	0,39	0,75	0,20
B	0,30	0,24	0,33	0,40
S	14,70	20,20	13,40	13,90
Ca ²⁺	0,70	0,70	0,92	0,69
Mg ²⁺	0,25	0,22	0,35	0,16
Al ³⁺	0,60	0,90	0,40	0,70
SB	1,19	1,02	1,62	1,00
T	7,59	8,82	7,22	7,90
t	1,79	1,92	2,02	1,70
H + Al	6,40	7,80	5,60	6,90
V	15,70	11,60	22,40	12,70
m	33,50	46,90	19,80	41,20
N	0,13	0,10	0,12	0,10
MO	3,95	3,62	2,90	2,63

pH em H₂O e KCl: relação 1:2,5; P_{rem}: mg/L; P, K, Zn, Fe, Mn, Cu, B, S: mg/dm³; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, SB, T, t, H + Al: cmol_c/dm³; V e M: %; MO e N: dag/Kg;

3.4.2 – Amônio e Nitrato em Extrato do Solo

No momento da coleta das amostras em campo foram pesados 5,0 gramas de solo em frasco de borosilicato e adicionados 50 mL do extrator KCl 1,0 mol L⁻¹. Os frascos foram agitados em plataforma orbital por 30 minutos e deixados em repouso por duas horas. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo e o extrato recolhido em tubos foi colocado em caixa com gelo para transporte até o LEM, para as determinações dos teores de amônio e nitrato (Figura 5).



Figura 5: Preparo em campo do extrato para determinação dos teores de amônio e nitrato no solo. A - Remoção do solo rizosférico. B – Adição da solução extratora (KCl 1,0 mol L⁻¹). C – Agitação contínua por 30 minutos. D – Filtração do extrato em papel de filtro quantitativo.

Os teores de amônio do solo foram determinados conforme metodologia proposta por Kempers (Kempers & Zeweers, 1986). Para a determinação do amônio foram transferidos 1mL de cada extrato para tubos de borosilicato de 10 mL onde foram adicionados 4,0 mL do extrato do solo,

0,9 mL da solução RT (16,5 g de salicilato de sódio, 0,01 g de nitroprussiato de sódio, 1,5 mL de água desionizada, 9,33 g citrato de sódio, 4,0 g de NaOH) e 0,1 mL da solução a 2 % de hipoclorito de sódio. O tubo permaneceu em repouso por 120 minutos, para desenvolvimento da cor azul, e a leitura do valor de absorbância foi realizada utilizando-se o comprimento de onda de 646 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU-640[®] (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA) para a comparação com os valores da curva padrão. Os resultados foram expressos em mg de NO₃⁻ kg⁻¹ de solo seco.

A determinação dos teores de NO₃⁻ foi realizada conforme metodologia proposta por Yang e colaboradores (YANG et al., 1998). Foram transferidos 1mL de cada extrato para tubos de 20 mL onde foram adicionados 0,5 mL da solução TRI (1,0 g de salicilato de sódio, 0,2 g de NaCl, 0,1 g de sulfamato de amônio dissolvidos em 100 mL de NaOH 0,01 mol L⁻¹), para secagem em estufa a 65 °C por aproximadamente 16 horas. A seguir, foram adicionados 1,0 mL de H₂SO₄, 5,0 mL de água desionizada e 5,0 mL de NaOH 10,0 mol L⁻¹. A presença de nitrato evidenciada pela formação da cor amarela foi quantificada em espectrofotômetro Milton Roy Spectronic 20D (Milton Roy Co., Rochester, NY) pela leitura do valor de absorbância no comprimento de onda de 410 nm, para a comparação com os valores da curva padrão. Os resultados foram expressos em mg kg⁻¹ de NO₃⁻ de solo seco.

3.5 – Atividade Microbiana

As taxas de evolução de CO₂ foram avaliadas em respirômetro de fluxo contínuo CA 2A–UI2 (Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente da Universidade Federal de Viçosa, utilizando metodologia descrita por Alef e colaboradores (ALEF et al., 1995). Em frascos de borossilicato de 250 mL foram colocados 15 g de solo e a umidade corrigida para 60 % da capacidade de campo. Os frascos abertos repousaram por três dias a

(MYERS et al., 1985) adicionado à extremidade 5' do *forward*. As regiões V3 dos rDNAs 16S de Archaea foram amplificadas utilizando-se o *primer* Arch344GC e o *primer* universal 517r (ATTACCGCGGCTGCTGG) (LANE et al., 1985).

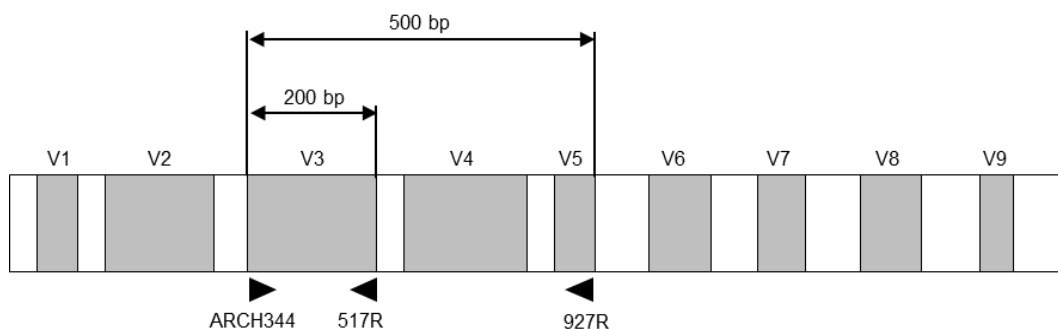


Figura 6: Posições de anelamento dos primers no rDNA 16S de Archaea. As regiões hipervariáveis (V) estão realçadas em cinza.

A primeira PCR foi realizada em eppendorf de 0,2 mL contendo 5 μ L do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer, 200 μ M de dNTPs, 0,75 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 670 ng de BSA, 0,16 μ M do *primer* Arch344GC, 0,16 μ M do *primer* 927r, aproximadamente 30 ng de DNA total e água desionizada Milli-Q esterilizada, para completar 25 μ L. A segunda PCR foi realizada com uso de 1,0 μ L da primeira como molde e substituição do *primer* 927r pelo 517r.

As ampliações foram realizadas por meio de *touchdown* sob as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por cinco minutos, 10 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de 61 °C por 30 segundos, com decréscimo de 0,5 °C a cada ciclo até atingir a temperatura de 56 °C, e temperatura de 72 °C por 30 segundos. Após os 10 ciclos iniciais, foram realizados 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto. Por último, uma etapa de 72 °C por sete minutos para a extensão final.

A separação dos diferentes *amplicons* em DGGE foi feita pela aplicação de 20 μ L dos produtos da segunda PCR em gel vertical de poliacrilamida em tampão TAE (Tris base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; Na₂.EDTA.2H₂O 10 mM, pH 8,0), sendo de 40 % a 55 % o gradiente úreia/formamida. A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C e

voltagem constante de 60V durante 20 horas, sendo o gel corado com SYBR[®] Gold (INVITROGEN, CARLSBAD, CA). A eletroforese foi realizada em equipamento DCode[™] Universal Mutation Detection System (BIO-RAD – CALIFÓRNIA USA), seguindo as recomendações do fabricante.

A comparação dos perfis de bandas dos géis da DGGE foi realizada utilizando o programa Bionumerics[®] versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A variável Riqueza de Archaea foi estimada pelo programa com base em matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como um (1) e ausência como zero (0). A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente de Dice de similaridade e no método de agrupamento médio entre grupos (UPGMA). As análises de riqueza e diversidade foram realizadas utilizando o software PAST (HAMMER et al., 2001).

3.6.3 – Análise da Diversidade de Bacteria

As amplificações da região rDNA 16S, correspondentes a V1-V9 (Figura 7), foram realizadas com a utilização dos *primers* universais F27 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e R1492 (TACCTTGTTACGACTT) (DENG et al., 2007).

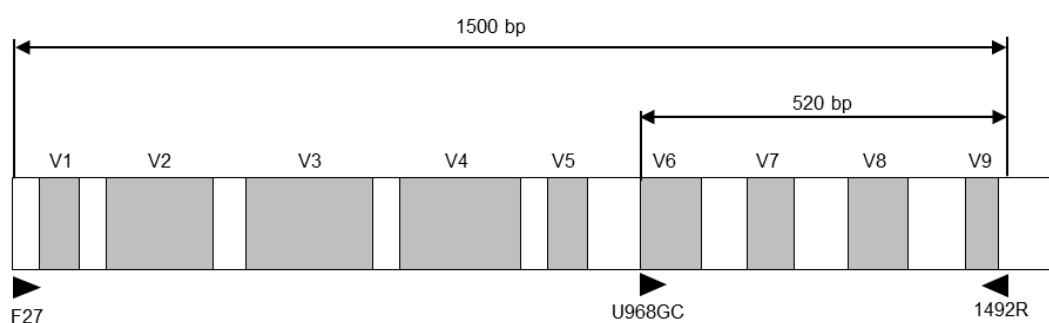


Figura 7: Posições de anelamento dos primers no rDNA 16S de Bacteria. As regiões hipervariáveis (V) estão realçadas em cinza.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 µL contendo: 5 µL do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer , 200 µM de dNTPs, 2,0 U de

GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio (670 ng de BSA, 0,16 μ M de cada *primer*, aproximadamente 30 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada.

As ampliações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72 °C e extensão final durante 7 minutos a 72 °C.

As regiões do rDNA 16S correspondentes a V6-V9 foram amplificadas utilizando 1,0 μ L da primeira PCR como molde, e substituição do *primer* F27 pelo U968 (AACGCGAAGAACCCTTAC) (FAVIER et al., 2002) com grampo GC (MYERS et al., 1985) adicionado à extremidade 5' do *forward* (Figura 9). A reação foi realizada em volume final de 25 μ L contendo 5,0 μ L do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer, 200 μ M de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 670 ng de BSA, 0,5 μ L de formamida, 0,16 μ M de cada *primer* e água desionizada (Milli-Q) e esterilizada.

A separação dos diferentes *amplicons* em DGGE foi realizada pela aplicação de 20 μ L dos produtos de PCR em gel vertical de poliacrilamida sendo de 40 % a 55 % o gradiente úreia/formamida. A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C e voltagem constante de 60V durante 20 horas, sendo o gel corado com SYBR[®] Gold (INVITROGEN, CARLSBAD, CA).

As análises de agrupamento das impressões digitais genótípicas da comunidade de Bacteria foram realizadas com o programa Bionumerics[®]. Os dendrogramas foram construídos com base no coeficiente binário de Dice utilizado no cálculo da matriz de similaridade, sendo a análise de agrupamento pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic* (UPGMA) e os valores de riqueza e diversidade calculados através da matriz de presença e ausência com uso do PAST[®].

3.6.4 – Análise da Diversidade de Fungos

Para amplificar as regiões V1-V9 do rDNA 18S (Figura 8) de fungos foram utilizados os *primers* NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) (MAY et al., 2001) e EF3 (TCCTCTAAATGACCA AGTTTG) (OROS-SICHLER et al., 2006). As regiões V7-V8 foram amplificadas com uso dos *primers* FF390 (CGATAACGAACGAGACCT) (VAINIO & HANTULA, 2000) e FR1GC (CCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGCCGAICCAT TCAATCGGTAIT) (VAINIO & HANTULA, 2000).

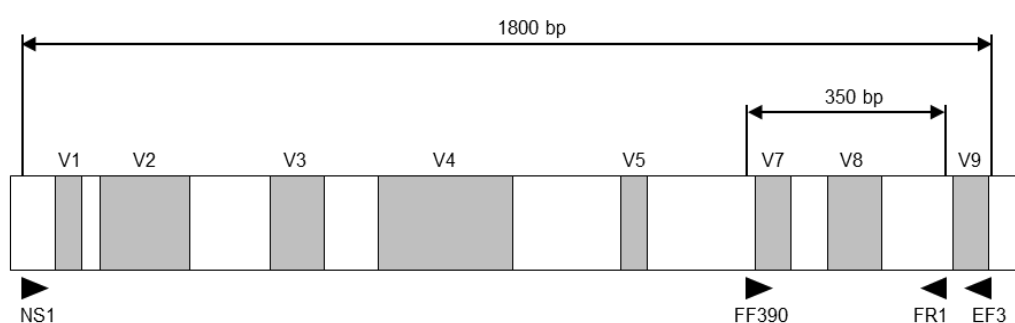


Figura 8: Posições de anelamento dos primers no rDNA 18S. As regiões hipervariáveis (V) estão realçadas em cinza. Adaptado de Hoshino e Morimoto, 2010.

A primeira PCR foi realizada em volume final de 25 μ L, contendo 5 μ L do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer, 200 μ M de dNTPs, 2,0 U de GoTaq Flex DNA polimerase, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,16 μ M do *primer* NS1, 0,16 μ M do *primer* EF3, aproximadamente 30 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) e esterilizada.

As ampliações foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 47 °C por 1 minuto, extensão por 2 minutos a 72 °C e extensão final durante 10 minutos a 72 °C.

A segunda PCR foi realizada com 1,0 μ L da primeira como molde, e substituição do *primers* NS1 e EF3 pelo par FF390/FR1GC sob as seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto, extensão por 1 minuto a 72 °C e extensão final durante 10 minutos a 72 °C.

A separação dos diferentes *amplicons* foi realizada por DGGE sendo 35 % a 55 % o gradiente úreia/formamida. A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60 °C, voltagem constante de 60V durante 20 horas, sendo o gel corado com SYBR[®] Gold (INVITROGEN, CARLSBAD, CA).

As análises de agrupamento das impressões digitais genotípicas da comunidade de fungos foram realizadas com o programa Bionumerics[®]. Os dendrogramas foram construídos com base no coeficiente binário de Dice utilizado no cálculo da matriz de similaridade, sendo a análise de agrupamento pelo UPGMA e os valores de riqueza e diversidade calculados por meio da matriz de presença e ausência com uso do PAST[®].

4 – RESULTADOS

4.1 – Amônio e Nitrato em Extrato do Solo

Os teores de amônio (NH_4^+) foram maiores ($p < 0,05$) nos períodos úmidos quando comparados ao seco, em torno de 27 mg Kg^{-1} de solo seco na área 1, com plantas mais jovens (Tabela 3), e 18 mg Kg^{-1} de solo seco na área 2, com plantas com 72 meses de crescimento pós-plantio (Tabela 4).

Na área 1, os teores de NH_4^+ no solo rizosférico no entorno das árvores aneladas durante o período úmido e foram maiores ($p < 0,05$) que aqueles das não aneladas (Tabela 3), enquanto na área 2 os teores mantiveram-se constantes (Tabela 4).

As análises dos teores de nitrato (NO_3^-) no solo revelaram aumento da concentração desse ânion durante o período chuvoso nas duas áreas experimentais, em torno de 45 mg Kg^{-1} de solo seco os maiores teores e correspondentes a aproximadamente cinco vezes os valores no período seco (Tabelas 3 e 4).

Nos plantios com 18 meses de crescimento os teores de NO_3^- no solo rizosférico coletado no entorno das árvores aneladas foram maiores

($p < 0,05$), que os das não aneladas, enquanto nos plantios com 72 meses os valores de NO_3^- foram semelhantes ($p < 0,05$) (Tabelas 3 e 4).

A análise dos teores de NO_3^- no solo não-rizosférico revelaram tendência de maior concentração de NO_3^- no entorno das árvores não aneladas nos plantios com 18 meses de crescimento, sendo que o oposto ocorreu nos plantios com 72 meses de crescimento (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Médias dos teores de amônio e nitrato em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 18 meses pós – plantio (Projeto Catas Altas I) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.

Médias dos Teores de Amônio ¹ e Nitrato ² no Solo – Projeto Catas Altas I ³							
Tratamento	Amostragem ⁴	Solo Rizosférico			Solo Não Rizosférico		
		NH_4^+	NO_3^-	N mineral ⁵	NH_4^+	NO_3^-	N mineral ⁵
		----- mg kg ⁻¹ de solo seco -----			----- mg kg ⁻¹ de solo seco -----		
Árvores Aneladas	Início Chuvoso	23,24 c	24,50 b	47,74	24,76 b	9,32 e	34,08
	Chuvoso	27,24 a	43,18 a	70,42	24,47 b	21,32 c	45,79
	Seco	7,65 h	7,28 f	14,93	3,62 i	4,43 h	8,05
Árvores Não Aneladas	Início Chuvoso	14,79 g	6,53 f	21,32	22,23 d	13,37 d	35,60
	Chuvoso	20,55 e	14,11 d	34,66	17,47 f	24,89 b	42,36
	Seco	7,17 h	5,59 g	12,76	3,85 i	4,39 h	8,24

^{1/} Teores de NH_4^+ (Kempers & Zeweers, 1986). Médias dos teores de NH_4^+ seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste Tukey a 5%.

^{2/} Teores de NO_3^- (YANG et al., 1998). Médias dos teores de NO_3^- seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste Tukey a 5%.

^{3/} Árvores com 18 meses de crescimento.

^{4/} Amostras: 12/10/12 (Início do Período Chuvoso); 16/12/12 (Período Chuvoso); 02/05/12 (Período Seco).

^{5/} Teores de Nitrogênio Mineral representam a soma dos teores de NH_4^+ e NO_3^- .

Tabela 4 – Médias dos teores de amônio e nitrato em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 72 meses pós – plantio (Projeto Serra do Pinho) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.

Médias dos Teores de Amônio ¹ e Nitrato ² no Solo – Projeto Serra do Pinho ³							
Tratamento	Amostragem ⁴	Solo Rizosférico			Solo Não Rizosférico		
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N mineral ⁵	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N mineral ⁵
		----- mg kg ⁻¹ de solo seco -----			----- mg kg ⁻¹ de solo seco -----		
Árvores Aneladas	Início Chuvoso	18,27 b	5,73 gh	24,00	12,73 f	8,60 e	21,33
	Chuvoso	14,08 d	32,01 b	46,09	13,04 e	15,94 c	28,98
	Seco	4,24 i	5,25 i	9,49	4,04 j	5,00 i	9,04
Árvores Não Aneladas	Início Chuvoso	0,99 k	5,78 g	6,77	18,21 b	6,38 f	24,59
	Chuvoso	18,46 a	36,76 a	55,22	17,60 c	10,12 d	27,72
	Seco	4,83 g	5,21 i	10,04	4,48 h	5,50 ghi	9,98

^{1/} Teores de NH₄⁺ (Kempers & Zeweers, 1986). Médias dos teores de NH₄⁺ seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste Tukey a 5%.

^{2/} Teores de NO₃⁻ (YANG et al., 1998). Médias dos teores de NO₃⁻ seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste Tukey a 5%.

^{3/} Árvores com 72 meses de crescimento.

^{4/} Amostragens: 12/10/12 (Início do Período Chuvoso); 16/12/12 (Período Chuvoso); 02/05/12 (Período Seco).

^{5/} Teores de Nitrogênio Mineral representam a soma dos teores de NH₄⁺ e NO₃⁻.

4.2 – Atividade Microbiana

Os valores de respiração no solo, quantificados em µmol de CO₂ por hora, por grama de solo seco, foram maiores (p<0,05) durante o período seco (Tabelas 5 e 6). Entretanto, os valores medidos nos solos da área 1 foram maiores que os da área 2. A respiração no solo sob árvores aneladas e não aneladas foram semelhantes (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Médias dos valores de respiração em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 72 meses pós – plantio (Projeto Serra do Pinho) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.

Médias dos Valores de Respiração¹ do Solo – Catas Altas I²			
Tratamento	Amostragem ³	Solo Rizosférico	Solo Não Rizosférico
		-- $\mu\text{Mol de CO}_2 \text{ Hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de solo seco--	-- $\mu\text{Mol de CO}_2 \text{ Hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de solo seco--
Árvores Aneladas	Início Chuvoso	0,0231 g	0,0263 f
	Chuvoso	0,0322 c	0,0189 h
	Seco	0,0301 d	0,0522 a
Árvores Não Aneladas	Início Chuvoso	0,0128 i	0,0111 i
	Chuvoso	0,0279 ef	0,0170 h
	Seco	0,0437 b	0,0288 de

^{1/}Valores de respiração do solo (ALEF et al., 1995). Médias dos valores de respiração seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste Tukey a 5%.

^{2/} Árvores com 18 meses de crescimento.

^{3/} Amostras: 12/10/12 (Início do Período Chuvoso); 16/12/12 (Período Chuvoso); 02/05/12 (Período Seco)

Tabela 6 – Médias dos valores de respiração em solo rizosférico e não rizosférico em floresta de eucalipto com 18 meses pós – plantio (Projeto Catas Altas I) na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.

Médias dos Valores de Respiração¹ do Solo – Projeto Serra do Pinho²			
Tratamento	Amostragem ³	Solo Rizosférico	Solo Não Rizosférico
		-- $\mu\text{Mol de CO}_2 \text{ Hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de solo seco--	-- $\mu\text{Mol de CO}_2 \text{ Hr}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de solo seco--
Árvores Aneladas	Início Chuvoso	0,0139 hi	0,0092 i
	Chuvoso	0,0111 gh	0,0156 ef
	Seco	0,0258 a	0,0206 d
Árvores Não Aneladas	Início Chuvoso	0,0160 e	0,0108 gh
	Chuvoso	0,0125 hi	0,0122 gh
	Seco	0,0235 c	0,0291 b

¹Valores de respiração do solo (ALEF et al., 1995). Médias dos valores de respiração seguidas pela mesma letra não diferem pelo Teste Tukey a 5%.

² Árvores com 18 meses de crescimento.

³ Amostragens: 12/10/12 (Início do Período Chuvoso); 16/12/12 (Período Chuvoso); 02/05/12 (Período Seco)

4.3 – Diversidade Genética

4.3.1 – Diversidade de Archaea do Solo

A análise do padrão de migração dos fragmentos de DNA no gel de DGGE mostrou distintas UTOs de arqueas nos solos analisados (Figuras 9).

A análise de componentes principais (PCA) revelou a formação de grupos distintos entre as amostras coletadas nos períodos seco, início do chuvoso e chuvoso (Figura 10). A PCA permitiu a distribuição dos perfis das comunidades ao longo dos eixos de ordenação com base na presença e ausência de bandas detectadas por DGGE. Os valores percentuais associados a cada eixo da ordenação (X,Y,Z) informam a explicabilidade desses eixos ao longo das mudanças percebidas nas estruturas das comunidades dentro do espaço de ordenação. O gráfico gerado da PCA explicou 63,7 % do comportamento das populações de arqueas em função dos períodos avaliados (Figura 10).

O anelamento das árvores provocou mudanças no perfil da comunidade, observando-se tendência de agrupamento das amostras coletadas no entorno das árvores aneladas (Figura 9). Pela análise dos agrupamentos as populações presentes no solo rizosférico se distinguiram daquelas do solo não – rizosférico nas duas áreas estudadas (Figura 9).

Os índices de riqueza (R) e diversidade genética de Shannon (H) foram maiores nas amostras coletadas durante os períodos úmidos, quando comparado aos do período seco, não havendo variação significativa nas duas fases de crescimento das plantas (Figura 9).

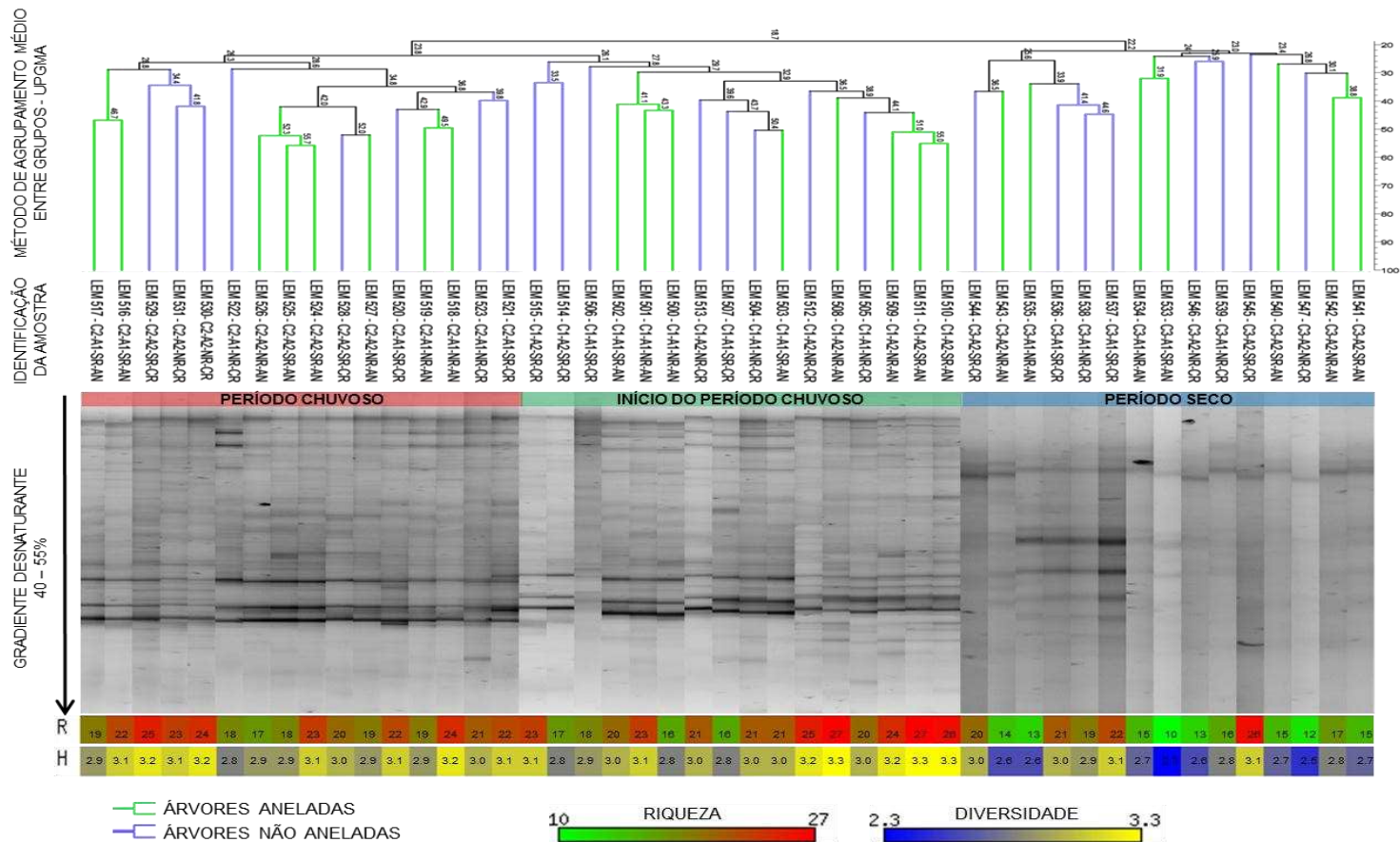


Figura 9: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S, índices de Riqueza de UTOs (R) e Diversidade de Shannon (H) detectados com base na separação de amplicons de rDNA 16S (H) de comunidades de Archaea presentes em solos de florestas plantadas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/12); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores Aneladas; CR – Árvores não aneladas.

ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS COMUNIDADES DE ARCHAEAS DO SOLO

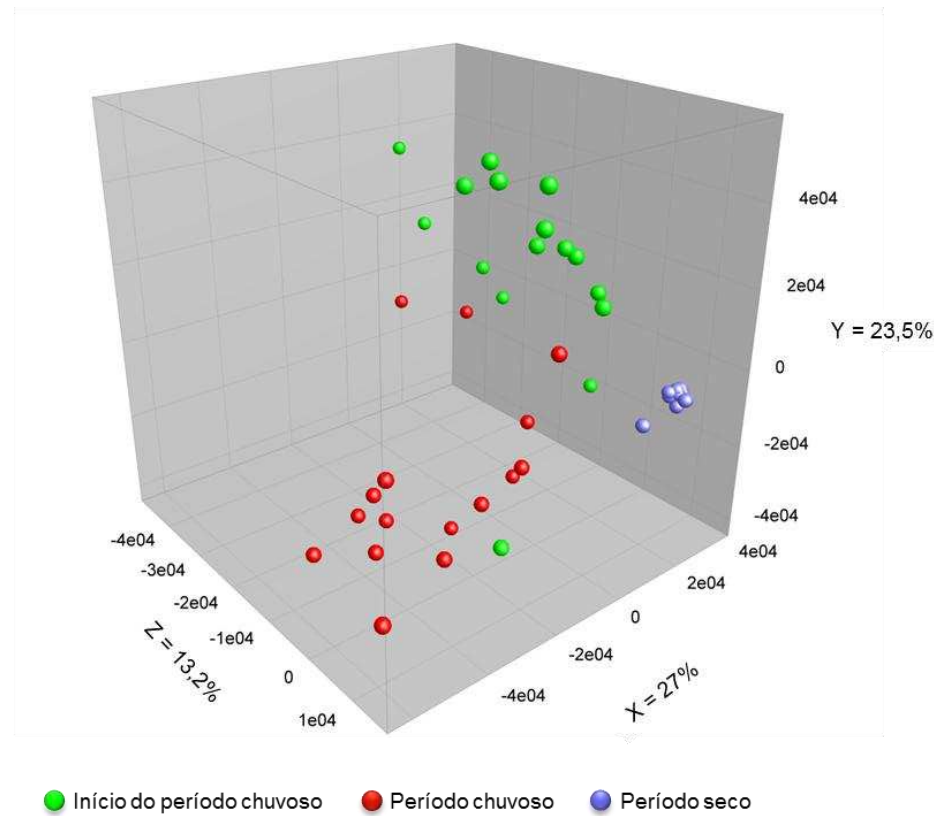


Figura 10: Análise de componentes principais (PCA) da comunidade de archaeas do solo. A ordenação considerou a presença e a ausência de amplicons rDNA 16S de Archaea.

4.3.2 – Diversidade de Bacteria do Solo

Os perfis eletroforéticos dos fragmentos do rDNA 16S, amplificados com os *primers* universais do domínio Bacteria revelaram a presença de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) dominantes, correspondentes às bandas de maior intensidade e de mesmo alinhamento entre todas as raias dos dois géis. As UTOs menos abundantes são representadas pelas bandas de baixa intensidade e mostraram ampla variação em função das condições climáticas e à fase de crescimento da planta (Figura 11).

O gráfico gerado pela análise dos componentes principais (PCA) explicou 61,8 % do comportamento das comunidades de bactérias no solo durante os períodos estudados. Três grupos distintos se formaram, basicamente em função da época de coleta (Figura 12).

O anelamento das árvores, ao interromper o fornecimento de fotoassimilados, levou a mudanças no perfil da comunidade, com tendência de agrupamento das amostras coletadas no entorno das árvores aneladas e não aneladas. Os clusters formados entre as amostras desses dois tratamentos apresentam valores médios de similaridade maiores que 50 % (Figura 11).

A análise de agrupamento dos perfis eletroforéticos revelou tendência de agrupamento entre às amostras de solo coletadas na região rizosférica quando comparadas as de solo não rizosférico (Figura 11).

Os índices de riqueza (R) e diversidade genética de Shannon (H) foram maiores durante os períodos úmidos, não havendo diferença entre os valores encontrados nas áreas avaliadas (Figuras 11 e 15).

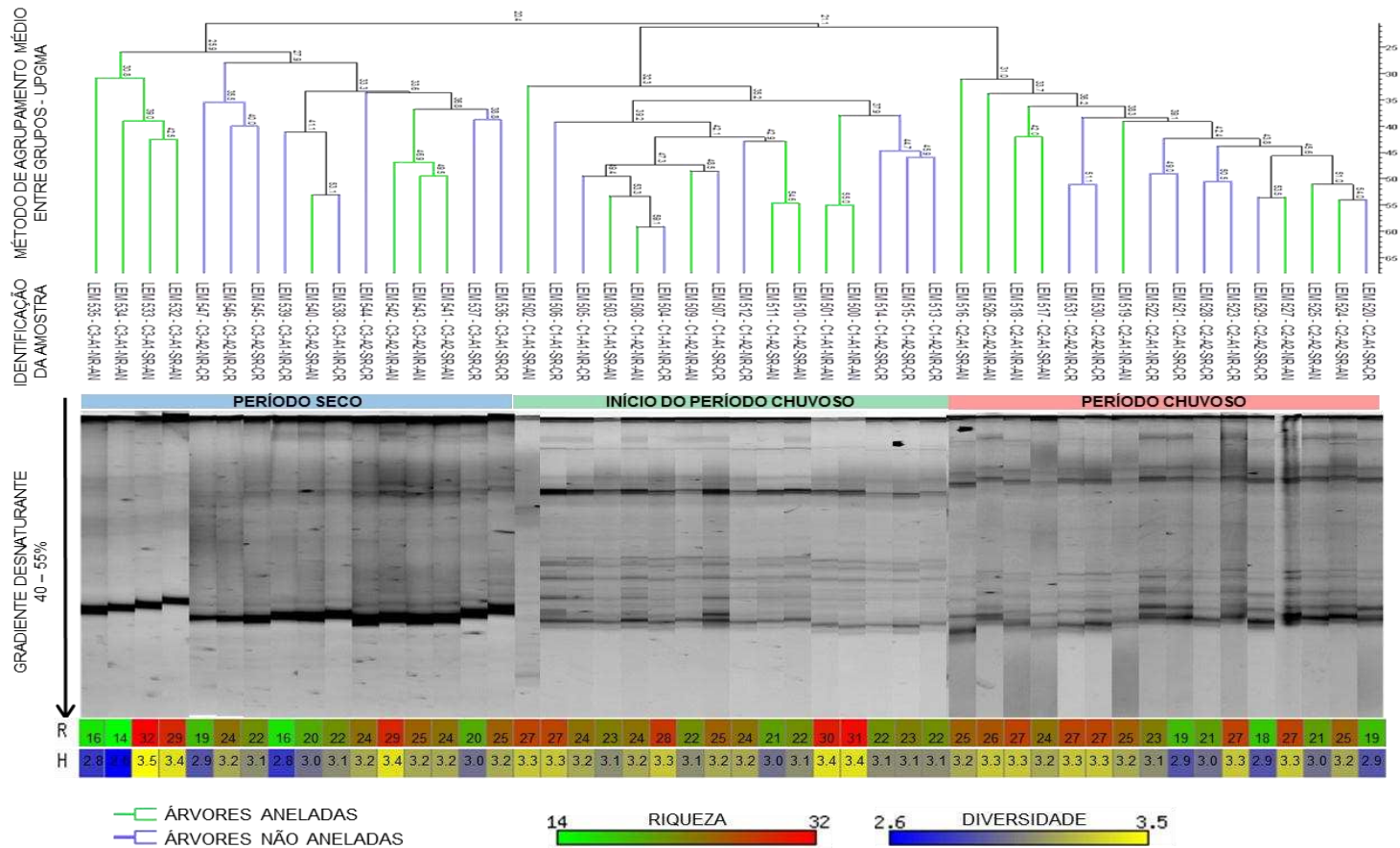


Figura 11: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S, índices de Riqueza de UTOs (R) e Diversidade de Shannon (H) detectados com base na separação de amplicons de rDNA 16S (H) de comunidades de Bacteria presentes em solos de florestas plantadas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (05/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico; AN – Árvores Aneladas; CR – Árvores não aneladas.

ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS DO SOLO

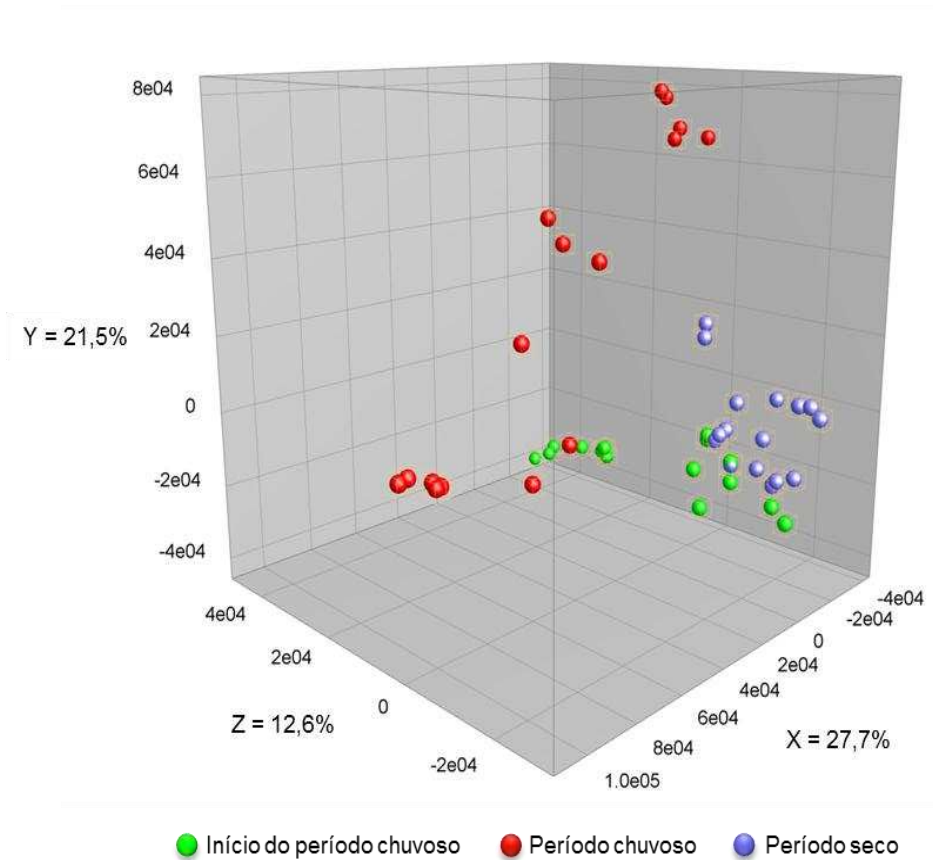


Figura 12: Análise de componentes principais (PCA) da comunidade de bactérias do solo. A ordenação considerou a presença e a ausência de amplicons rDNA 16S de Bactéria.

4.3.3 – Diversidade de Fungos do Solo

A análise por DGGE dos fragmentos do rDNA 18S mostrou distintas UTOs de fungos nos solos analisados. Nos géis, as bandas com intensidades similares e intensas representam ribotipos abundantes nos dois períodos, seco e chuvoso (Figura 13).

Ao analisar os agrupamentos hierárquicos definidos com base na separação de *amplicons* de rDNA 18S por DGGE, as estruturas das comunidades nos períodos úmidos ordenaram-se espacialmente distantes daquelas presentes no solo durante o período seco, quando analisada por PCA, sendo 43 % da variação explicada por essa análise (Figura 14).

A análise de UPGMA revelou que os padrões dos perfis referentes aos períodos úmido e seco compartilham menos de 16 % de similaridade e formam grupos distintos (Figura 25).

O anelamento das árvores provocou mudanças no perfil da comunidade fúngica (Figura 25), com tendência de agrupamento das amostras coletadas no entorno das árvores aneladas, sendo maiores que 45 % os valores de similaridade. Houve uma tendência de agrupamento das comunidades de solos coletados na região rizosféricas de árvores aneladas e não aneladas em ambas as fases de crescimento da planta (Figura 13).

O cálculo da variável riqueza (Figura 13) revelou maiores valores de UTOs durante os períodos úmidos, quando comparados aos valores de período seco. Também os índices de diversidade genética de Shannon (H) foram maiores durante os períodos úmidos (Figuras 13 e 15) e, ao mesmo tempo, nas áreas 1 e 2 os valores de riqueza e diversidade genética foram similares (Figuras 13 e 15).

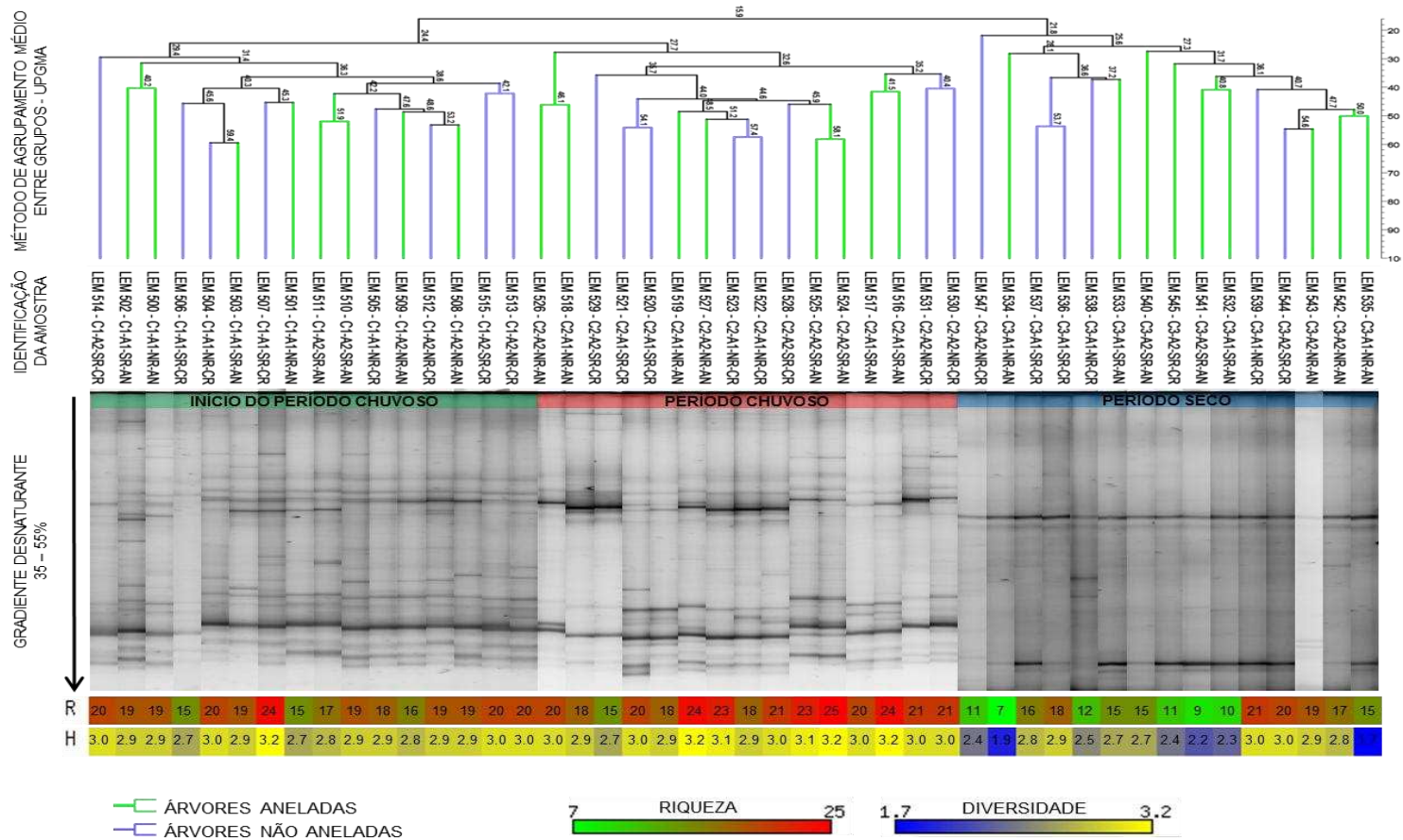


Figura 13: Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 18S, índices de Riqueza de UTOs (R) e Diversidade de Shannon (H) detectados com base na separação de amplicons de rDNA 16S (H) de comunidades de fungos presentes em solos de florestas plantadas de Eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil C1 – Coleta no início do período chuvoso (12/10/11); C2 – Coleta período chuvoso (16/12/11); C3 – Coleta no período seco (02/05/12); A1 – Árvores com 18 meses de crescimento; A2 – Árvores com 72 meses de crescimento; NR – Solo não rizosférico; SR – Solo rizosférico: AN – Árvores Aneladas; CR – Árvores não aneladas.

ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS COMUNIDADES DE FUNGOS DO SOLO

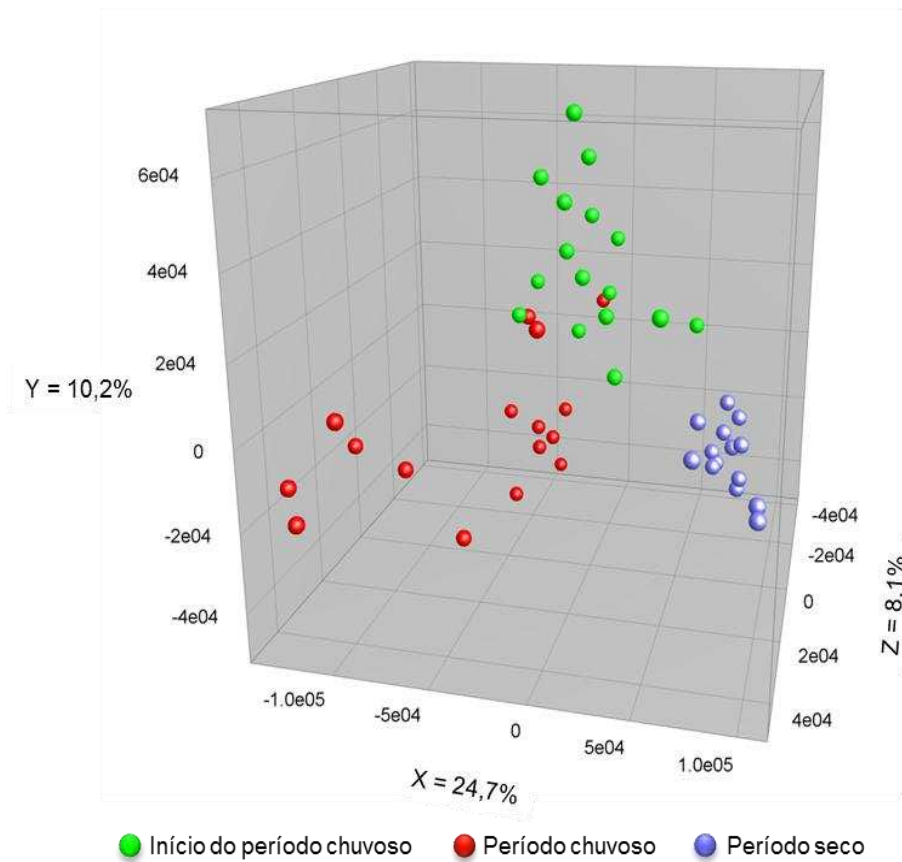


Figura 14: Análise de componentes principais (PCA) da comunidade de fungos do solo. A ordenação considerou a presença e a ausência de amplicons rDNA 18S de fungos.

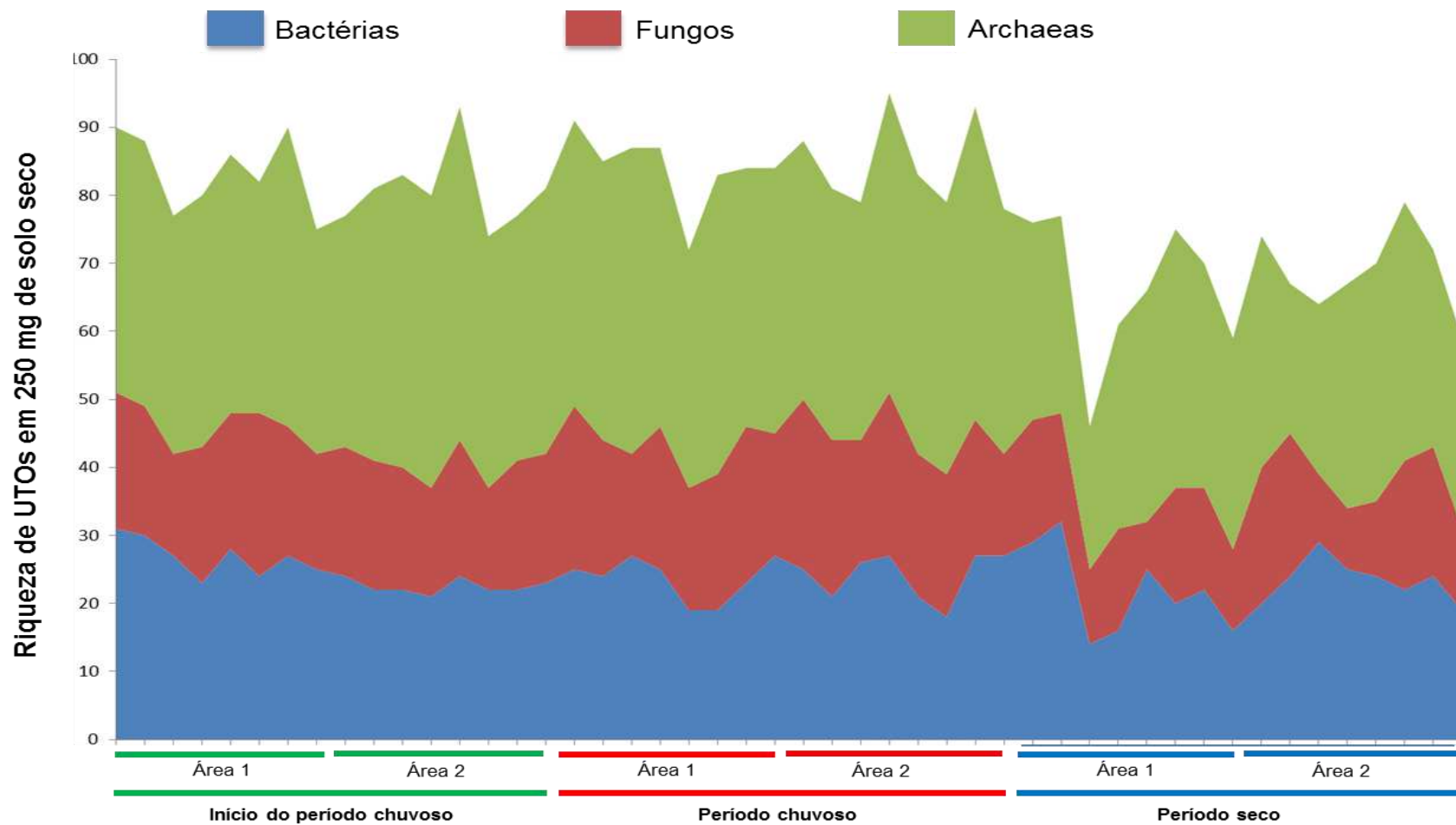


Figura 15: Riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectada por separação de amplicons de rDNA 16S de Archaea e Bactéria e rDNA 18S de fungos por DGGE.

5. DISCUSSÃO

Os valores dos teores de N-mineral (NH_4^+ e NO_3^-) encontrados no solo sob florestas de eucalipto (Tabelas 3 e 4) expressam o resultado das atividades de micro-organismos amonificadores e nitrificadores durante os períodos seco e chuvoso. Ressalte-se que a umidade do solo nas florestas de eucalipto estudadas é também uma condição definidora da dinâmica dos estoques de compostos de carbono e nitrogênio quando da retirada da cobertura vegetal, como a no sul da Amazônia brasileira (NEILL et al., 1997).

A redução dos teores de água no solo durante a estação seca pode ser o fator determinante do aumento na evolução de CO_2 nesse período nas áreas analisadas (Tabelas 5 e 6) em razão do reestabelecimento e reestruturação das comunidades de micro-organismos aeróbios. Baixos valores de respiração têm sido relacionados ao alto teor de umidade do solo durante o período chuvoso. (RAISON et al., 1986; KEITH et al., 1997; DAVIDSON et al., 2008).

Estudos similares realizados em solos de florestas plantadas no hemisfério norte relatam aumento da respiração basal durante o período chuvoso (EPRON et al., 2009). Entretanto, o clima nessas regiões é marcado por uma estação fria chuvosa e outra quente e seca, diferente do

daquele do sudeste do Brasil caracterizado por uma estação quente chuvosa no verão, seguida por um período frio e seco.

A heterogeneidade entre os valores das replicatas biológicas de uma mesma área foram interpretados como fato da atividade microbiana no solo depender não só de características como sazonalidade, clone e espaçamento, mas também de características qualitativas, tais como volume de raízes finas, exsudatos e organismos da rizosfera. Resultados similares foram observados em florestas tropicais na Guiana Francesa (BRÉCHET et al., 2011).

Os valores similares de atividade microbiana encontrados entre as parcelas aneladas e não aneladas, contemplando solo rizosférico e não rizosférico, demonstram que mesmo com a efetividade do anelamento, as reservas de carboidratos encontrados na raízes mantêm a respiração no solo. Em florestas de eucalipto no Brasil, após cinco meses de anelamento, houve pouca redução da biomassa de raízes finas vivas (BINKLEY et al., 2006).

A redução do número de folhas da copa, e a menor espessura dos troncos das árvores aneladas demonstram a efetividade da técnica.

Diante da expressão do setor florestal brasileiro e a importância das florestas plantadas na retenção de CO₂ torna-se importante a realização de novos estudos que elucidem o comportamento das populações microbianas do solo nesses ecossistemas em função das variações sazonais. Esses estudos contribuirão para a criação de modelos de dinâmica de carbono em ecossistemas florestais.

A pequena variação nos índices de diversidade das comunidades de arqueas, bactérias e fungos encontrados nos solos em duas fases de crescimento da planta indicam que o ciclo de crescimento de florestas de eucalipto não influencia negativamente a diversidade microbiana do solo. Estudos da comunidade microbiana por PFLA (análise de perfil de ácidos graxos) em solos sob florestas de eucalipto na região subtropical da China comprovaram que a diversidade é influenciada por fatores sazonais e pela umidade do solo, sendo observada pouca variabilidade entre as fases de crescimento da planta (CAO et al, 2010).

A presença de UTOs dominantes de arqueas, bactérias e fungos ao longo do período avaliado, bem como a presença de uma diversa gama de UTOs características de cada época indicam que a diversidade microbiana nesse habitat mantém certa estabilidade ao longo do crescimento da planta. Modelos desenvolvidos com base em dados ambientais mostram que o aumento da complexidade leva a uma maior estabilidade em comunidades diversas, onde a combinação de interações antagônicas e mutualísticas pode estabilizar a dinâmica populacional (MOUGI & KONDOH, 2012).

A variação dos perfis de DGGE dentro de um gradiente sazonal (Figuras 9 a 15) para os três domínios estudados mostram que a sazonalidade é o principal determinante da comunidade microbiana em solos de florestas plantadas de eucalipto. Estudos similares relatam que a sazonalidade é o principal determinante da variação do perfil das comunidades microbianas em solos florestais (BRANT et al., 2006; LI et al., 2005; FENG et al., 2009; CHEN et al., 2010; LIU et al., 2010). Em florestas de eucalipto de regiões subtropicais a composição da comunidade bacteriana do solo bem como o perfil de utilização de substratos apresentam respostas sazonais (LIU et al., 2010).

O maior número de UTOs de bactérias e arqueas em relação a fungos em todos os períodos avaliados (Figura 15) possivelmente é resultado do sistema de uso da terra. Trabalhos similares mostram que maiores concentrações de Ca, Mg e K, proporcionam a elevação do pH da solução do solo, favorecendo o aumento da biomassa bacteriana em relação à biomassa fúngica (ARAO, 1999; KILLHAM, 1994; GRAYSTON & PRESCOTT, 2005).

O menor efeito do anelamento sobre a estrutura da comunidade microbiana quando comparado a período amostral, úmido e seco, pode ser explicado pela regeneração de raízes finas, disponibilização das reservas de carboidratos para a região da rizosfera e pela decomposição das raízes mortas após o anelamento. Estudos relatam que árvores de eucalipto aneladas ainda são capazes de produzir novas raízes bem como produzir alguns exsudatos radiculares (BINKLEY et al. 2006; ZELLER et al. 2008; CHEN et al. 2010; WU et al., 2011).

A tendência de agrupamento das comunidades microbianas dos três domínios encontradas no solo no entorno da rizosfera (Figuras 9, 11 e 13) foi assumida como a capacidade da planta de recrutar uma microbiota específica na rizosfera. As comunidades bacterianas podem ser altamente planta-específicas, sendo essa modulação resultado de alterações na composição química dos exsudatos liberados pelas plantas (GERMIDA et al., 1998; GRAYSTONS et al., 1998; KAISER et al., 2001; KOWALCHUK et al.; 2002). Esse resultado fortalece a hipótese da existência do nitrostato em florestas de eucalipto, onde a planta atua como principal modulador do balanço de nitrogênio e carbono em função da disponibilidade de energia no sistema-planta.

Em florestas de *Fagus sylvatica* L. na Áustria, o anelamento de árvores evidenciou que a disponibilização de compostos de carbono para o solo e a sazonalidade são os principais determinantes da composição filogenética das comunidades de arqueas e bactérias (RASCHE et al, 2011).

Alterações da estrutura da comunidade fúngica em solos de floresta boreal após quatro anos de anelamento das árvores foram atribuídas ao corte do suprimento de fotoassimilados para o solo (YARWOOD et al., 2009).

Evidências do controle exercido pelo sistema planta sobre a fixação biológica de nitrogênio por micro-organismos de vida livre e a comprovação do efeito do balanço energético sobre esse processo (REED et. al, 2011), reforçam a hipótese de que a fixação biológica representa a principal entrada de nitrogênio nos ecossistemas florestais. Pequenos aportes de nitrogênio à fração orgânica do solo podem constituir um grande reservatório desse nutriente, capaz de suprir a demanda da planta.

Os estudos sobre respostas a adubação nitrogenada e balanço de nitrogênio em florestas de eucalipto realizados no Brasil têm como foco as quantidades de nitrogênio na planta e no solo, nitrogênio total ou na forma amoniacal ou nítrica, sem considerações mais detalhadas sobre a comunidade microbiana, sua estrutura e dinâmica temporal em resposta a mudanças das condições ambientais no ecossistema.

A compreensão da dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta em florestas de eucalipto sob enfoque do nitrostato, pode ser a chave para o desenvolvimento de novos modelos de fertilização nitrogenada dessas florestas, de forma a otimizar o uso desse nutriente.

6. CONCLUSÃO

O aporte de fotoassimilados para a rizosfera e a umidade determinam as taxas de respiração, a dinâmica do nitrogênio mineral e a estrutura da comunidade microbiana em solos sob florestas de eucalipto na região do Vale do Rio Doce, Minas Gerais , Brasil, fato que concorre para corroborar a hipótese da existência do nitrostato em funcionamento nesse ecossistema. Inferiu-se a existência de capacidade da planta de moldar a estrutura da comunidade microbiana na rizosfera e rizoplano pelos índices derivados da análise dos perfís da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

7 – REFERÊNCIAS

ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.). *Methods in soil microbiology and biochemistry*. New York: Academic, 1995. p. 464-470.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA ABRAF: ano base 2011. Brasília, DF: ABRAF, 2012.

ARAO, T. In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring ¹³C incorporation into soil phospholipids fatty acids from ¹³C acetate. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, **31**: 1015 – 1020, 1999.

BAIS, H.P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S. & VIVANCO, J. M.; The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 233 – 266, 2006.

BARRET M.; MORRISSEY J. P.; O'GARA F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biology and Fertility of Soils*, **47**:729–743, 2011.

BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. & NOVAIS, R.F. Mineral fertilizer recommendations for eucalypt plantations. In: GONÇALVES, J.L.M. & BENEDETTI, V. *Forest nutrition and fertilization*. Piracicaba, IPEF, 2004. p 305.

BAUDOIN, E., BENIZRI, E. & GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community composition in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, **35**: 1183–1192, 2003.

BENT, E. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* Springer, Berlin: 225–258, 2006.

BRANT, J.B., MYROLD, D.D. & SULZMAN, E.W. Root controls on soil microbial community structure in forest soils. *Oecologia*, **148**: 650–659, 2006.

BRÉCHET, L., PONTON, S., ALMÉRAS, T., BONAL, D. & EPRON, D. Does spatial distribution of tree size account for spatial variation in soil respiration in a tropical forest? *Plant and Soil*, **347**:293–303, 2011.

BINKLEY, D., STAPE, J.L., TAKAHASHI, E.N. & RYAN, M.G. Tree-girdling to separate root and heterotrophic respiration in two Eucalyptus stands in Brazil. *Oecologia*, **148**: 447–454, 2006.

BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, **320**: 37–77, 2009.

BUCKLEY, D. H. & SCHMIDT, T. M. Exploring the biodiversity of soil: a microbial rainforest. Biodiversity of Microbial Life, In: Staley, J. T. & Reysenbach, A. L. (eds). Wiley-Liss: New York, NY, 2002. 183–208.

CAMPELO, I. S. G. Diversidade bacteriana em solos do Rio Doce sob diferentes usos da terra e manejos do eucalito. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 96f. (Dissertação de Mestrado).

CAMPELO, I. S. G. Comunidades microbianas e qualidade do solo em povoamentos de eucalito. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2008. 145f. (Tese de Doutorado).

CAO, Y.S., FU, S.L., ZOU, X.M., CAO, H.L., SHAO, Y.H. & ZHOU, L.X. Soil microbial community composition under Eucalyptus plantations of different age in subtropical China. European Journal of Soil Biology, **46**: 128–135. 2010.

CANNELL M.G.R.; DEWAR R.C. Carbon allocation in trees: a review of concepts for modelling. Advances in Ecological Research, **25**: 59-104; 1994.

CHEN, D. M., ZHANG, Y., LIN, Y.B., ZHU, W.X. & FU, S.L. Changes in belowground carbon in *Acacia crassicarpa* and *Eucalyptus urophylla* plantations after tree girdling. Plant and Soil, **326**: 123–135. 2010.

COMPANT S., VAN DER HEIJDEN M. G.A. & SESSITSCH, A. Climate change effects on beneficial plant–microorganism interactions. FEMS Microbiology Ecology, **73**: 197–214, 2010.

COMSTEDT D., BOSTRÖM B. & EKBLAD A. Autotrophic and heterotrophic soil respiration in a Norway spruce forest: estimating the root decomposition and soil moisture effects in a trenching experiment. Biogeochemistry, **104**: 121-132, 2011.

COSTA, M. D. Atividade biológica e liberação de nutrientes em resíduos da exploração de povoamentos de eucalipto. 1995. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1995. (Mestrado em Microbiologia).

DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nature*, London, **3**: 470-478, 2005.

DANNENMANN M., SIMON J., GASCHE R., HOLST J., NAUMANN P. S., KÖGEL-KNABNER I., KNICKER H., MAYER H., SCHLOTTER M., PENA R., POLLE A., RENNENBERG H. & PAPPENBERG H. Tree girdling provides insight on the role of labile carbon in nitrogen partitioning between soil microorganisms and adult European beech. *Soil Biology & Biochemistry*. **41**: 1622–1631, 2009.

DAVIDSON E. A., BELK E. & BOONE R. D. Soil water content and temperature as independent or confounded factors controlling soil respiration in a temperate mixed hardwood forest. *Global Change Biology*, **4**: 217–227, 1998.

DENG W. D., WANAPAT M., MA S. C., CHEN J., XI D. M., HE T. B., YANG Z. F., MAO H. M. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences manifest rumen bacterial diversity in Gayals (*Bos frontalis*) fed fresh bamboo leaves and twigs (*Sinarumdinaria*). *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, **20**:1057–1066, 2007.

EPRON D., MARSDEN C., M'BOU A. T., SAINT-ANDRÉ L., D'ANNUNZIO R. & NOUVELLON Y. Soil carbon dynamics following afforestation of a tropical savannah with Eucalyptus in Congo. *Plant and Soil*, **323**: 309–322, 2009.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Applied Microbiology*, **56**: 297–314, 2004.

FAVIER C. F., VAUGHAN E. E., VOS W. M. & AKKERMANS, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates,” *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 219–226, 2002.

FENG, W.T., ZOU, X.M. & SCHAEFER, D. 2009. Above- and belowground carbon inputs affect seasonal variations of soil microbial biomass in a subtropical monsoon forest of southwest China. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**: 978–983, 2009.

FLYNN, B.; SHIELD, E. *Eucalyptus progress in higher value utilization: a global review*. Tacoma: Robert Flynn & Associates, 1999. 212p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 12 de julho de 2012.

FONTAINE S, BARDOUX G, BENEST D, VERDIER B, MARIOTTI A, ABBADIE L. Mechanisms of the priming effect in a savannah soil amended with cellulose. *Soil Science Society of America Journal*, **68**: 125-131, 2004.

GAMA-RODRIGUES E. F., BARROS N. F., GAMA-RODRIGUES A. C., SANTOS G.A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, **29**: 893-901, 2005.

GATTO A., BARROS N. F., NOVAIS R. F., SILVA I. R., LEITE H. G., LEITE F. P. & VILLANI E. M. A. Estoques de carbono no solo e na biomassa em plantações de eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, **34**: 1.069-1.079, 2010.

GERMIDA J. J., SICILIANO S. D., FREITAS J. R. & SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, **26**: 43–50, 1998.

GRAYSTON S.J. & PRESCOTT C.E. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, **37**: 1157–1167, 2005.

GRAYSTON S. J., WANG S., CAMPBELL C. D. & EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, **30**: 369–378, 1998.

HAASE S., NEUMANN G., KANIA A., KUZYAKOV Y., RÖMHELD V. & KANDELER E., Elevation of atmospheric CO₂ and N nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**: 2208–2221, 2007.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9, 2001.

HEDIN L. O., BROOKSHIRE E. N. J., MENGE D. N. L., BARRON A. R., The nitrogen paradox in tropical forest ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**: 613-635, 2009.

HÖGBERG P. & READ D. J. Towards a more plant physiological perspective on soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 548–554, 2006.

JACKSON, L. E.; BURGER, M. & CAVAGNARO, T. R. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. *Annual Review of Plant Biology*, **59**: 341-363, 2008.

JURGENS G., LINDSTROM K., SAANO A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 803-805, 1997.

KAISER O., PUHLER A. & SELBITSCH W. Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microbial Ecology*, New York, **42**: 136–149, 2001.

KANDELER E., MOSIER A. R., MORGAN J. A., MILCHUNAS D. G., KING J. Y., RUDOLPH S. & TSCHERKO D. Response of soil microbial biomass and enzyme activities to the transient elevation of carbon dioxide in a semi-arid grassland. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**: 2448–2460, 2006.

KEITH H., JACOBSEN K. L. & RAISON R. J. Effects of soil phosphorus availability, temperature and moisture on soil respiration in *Eucalyptus pauciflora* forest. *Plant and Soil*, **190**: 127–141, 1997.

KEMPERS A. J., ZWEERS A. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Communications In Soil Science and Plant Analysis*, **17**: 715-723, 1986.

KILLHAM K. *Soil ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 242 p.

KOWALCHUK G. A., BUMA D. S., De BOER, W., KLINKHAMER P. G. L., VAN VEEN J. A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Wageningen, **81**: 509–520, 2002.

LANE D. J., PACE B., OLSEN G. J., STAHL D. A., SOGIN M. L. & PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**: 6955-6959, 1985.

LEITE, F. P. Relações nutricionais e alterações de características químicas de solos da região do Vale do Rio Doce pelo cultivo do eucalipto. 2001. 72 f

Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

LI Y. Q., XU M., ZOU X. M. & XIA Y. Soil CO₂ efflux and fungal and bacterial biomass in a plantation and a secondary forest in wet tropics in Puerto Rico. *Plant and Soil*, **268**: 151–160, 2005

LIMA, J. E. Diversidade de bacteria e Archaea em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011. 83f. (Dissertação de Mestrado).

LIU Z. F., FU, B. J., ZHENG, X. X. & LIU, G. H. Plant biomass, soil water content and soil N:P ratio regulating soil microbial functional diversity in a temperate steppe: a regional scale study. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**: 445–450, 2010.

LOPES, J. L. W. Qualidade de mudas clonais do híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla*, submetidas a diferentes regimes hídricos. Tese (Doutorado em Agronomia/Irrigação e Drenagem) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 171p. 2008.

LUGTENBERG B. & KAMILOVA F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, **63**: 541–556, 2009.

MACHULLA G. Soil microbial indicators and their environmental significance. *Journal of Soils and Sediments* **3**: 229, 2003.

MARSCHNER P., NEUMANN G., KANIA A., WEISSKOPF L. & LIEBEREI R. Spatial and temporal dynamics of bacterial community composition in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil*, **246**: 167–174, 2002.

MAY L. A., SMILEY B. & SCHMIDT M. G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**: 829-841, 2001.

MENEZES, A. A. Produtividade do eucalipto e sua relação com a qualidade e a classe de solo. 2005. 98 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

MENGE D. N. & HEDIN L. O. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120,000-year chronosequence. *New Zealand Ecological Society*, **90**: 190-201, 2009.

MOYANO F. E., VASILYEVA N., BOUCKAERT L., COOK F., CRAINE J., CURIEL Y. J., DON A., EPRON D., FORMANEK P., FRANZLUEBBERS A., ILSTEDT U., KÄTTERER T., ORCHARD V., REICHSTEIN M., REY A., RUAMPS L., SUBKE J. A., THOMSEN I. K., & CHENU, C. The moisture response of soil heterotrophic respiration: interaction with soil properties. *Biogeosciences*, **9**: 1173-1182, 2012.

MOUGI A. & KONDOH M. Diversity of Interaction Types and Ecological Community Stability. *Science*, **337**: 349-351, 2012.

MYERS R. M., FISCHER S. G., LERMAN L. S., MANIATIS T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, **13**: 3131-3145, 1985.

NEILL C., MELLILO J.M, STEUDLER P. A., CERRI C. C., MORAES F. L., PICCOLO M. C. & BRITO, M. Soil carbon and nitrogen stocks followings forest clearing for pasture in the southern Brazilian Amazon. *Ecological Applications*, Washington, **7**: 1216-1225, 1997.

OROS-SICHLER, M.; GOMES, N.C.M; NEUBER G. & SMALLA K. A new seminested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. Soil Science Society of America Journal, **65**:63–75, 2006.

PULITO, A. P. Resposta à fertilização nitrogenada e estoque de nitrogênio biodisponível em solos usados para plantações de *Eucalyptus*. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2009. (Dissertação de Mestrado).

RAICH J. W. & POTTER C. S. Global patterns of carbon dioxide emissions from soils. Global Biogeochemical Cycles, **9**: 23–36, 1995.

RAICH J. W. & SCHLESINGER W. H. The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. Tellus, **44**: 81–99, 1992.

RAINEY P. B. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. Environmental Microbiology, **1**: 243–257, 1999.

RAISON R. J., WOODS P. V. & KHANNA P. K. Decomposition and accumulation of litter after fire in sub-alpine eucalypt forests. Australian Journal of Ecology, **11**: 9–19, 1986.

RASCHE F., KNAPP D., KAISER C., KORANDA M., KITZLER B., ZECHMEISTER-BOLTENSTERN S., RICHTER A. & SESSITSCH A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. The ISME Journal, **5**: 389-402, 2011.

RASKIN L., STROMLEY J. M., RITTMANN B. E. , STAHL D. A. Groupspecific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Applied and Environmental Microbiology, **60**: 1232-1240, 1994.

REID, A. Incorporating microbial processes into climate change models. American Academy of Microbiology Report, 2011.

RIBASKI J.; Cultivo do Eucalipto. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivoEucalipto/>>. Acesso em: 12 de julho de 2012.

RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blücher, 1981. 296p.

RUFINO A. M. M. Estoque de Carbono em Solos sob Plantios de Eucalipto e Fragmento de Cerrado. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, 2009. 71f. (Dissertação de Mestrado).

SMETHURST P., HOLZ H., MORONI M. & BAILLIE C. Nitrogen management in *Eucalyptus nitens* plantations. Forest Ecology and Management, **193**: 63-80, 2004.

SPRACKLEN, D. V., ARNOLD, S. R., TAYLOR, C. M. Observations of increased tropical rainfall preceded by air passage over forests. Nature, **11390**: 1476-4687, 2012.

VAN DER WERF G. R., MORTON D. C., DEFRIES R. S., OLIVIER J. G. J., KASIBHATLA P. S., JACKSON R. B., COLLATZ G. J. & RANDERSON J. T. CO₂ emissions from forest loss. Nature Geoscience, **2**: 737–738, 2009.

VAN ELSAS J., GARBEVA P., VAN VEEN J. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Review of Phytopathology, Lawrence, **42**: 243-270, 2004.

VAINIO E. J., & J. HANTULA. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, **104**: 927-936, 2000.

WARDLE D. A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews*, **67**: 321-358, 1992.

WU J., LIU Z., WANG X., SUN Y., ZHOU L., LIN Y. & FU S. Effects of understory removal and tree girdling on soil microbial community composition and litter decomposition in two Eucalyptus plantations in South China. *Functional Ecology*, **25**: 921–931, 2011.

YANG J. E., KIM J. J., SKOGLEY E. O. & SCHAFF B. E. A Simple Spectrophotometric Determination of Nitrate in Water, Resin, and Soil Extracts. *Soil Science Society of America Journal*, **62**: 1108–1115

YARWOOD S. A., MYROLD D. D. & HÖGBERG M. N. Termination of belowground C allocation by trees alters soil fungal and bacterial communities in a boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology*, **70**: 151-162, 2009.

ZELLER B., LIU J. X., BUCHMANN N. & RICHTER A. Tree girdling increases soil N mineralization in two spruce stands. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**, 1155–1166, 2008.