

DANIEL NOLASCO MACHADO

**ENRIQUECIMENTO E ALOCAÇÃO DE ¹³C EM
PLANTAS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

T

M149e
2009 Machado, Daniel Nolasco, 1983-
Enriquecimento e alocação de ^{13}C em plantas de eucalipto
/ Daniel Nolasco Machado – Viçosa, MG, 2009.
x, 28f. : il. ; 29cm.

Orientador: Roberto Ferreira de Novais.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 22-28

1. Plantas – Nutrição. 2. Eucalipto. 3. Planta – Fisiologia.
4. Plantas e solo. 5. Humus. 6. Carbonos – Isótopos
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.8

DANIEL NOLASCO MACHADO

**ENRIQUECIMENTO E ALOCAÇÃO DE ¹³C EM
PLANTAS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de março de 2009.



Prof. Ivo Ribeiro da Silva
(Coorientador)



Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Coorientador)



Prof. Nairam Félix de Barros



Prof. Reinaldo Bertola Cantarutti



Prof. Roberto Ferreira de Novais
Orientador

À minha família e amigos

Que sempre estiveram comigo em todos
os momentos da minha caminhada...

...dedico esta conquista!

BIOGRAFIA

DANIEL NOLASCO MACHADO, filho de Hélio Ferreira Machado e Cláudia Maria Nolasco Machado, nasceu em 05 de setembro de 1983, em Pompéu, Estado de Minas Gerais.

Em 2002, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em março de 2007, mês que iniciou no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas pelo Departamento de Solos na mesma instituição.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela orientação, sabedoria e correto discernimento nas diversas situações da minha caminhada.

Ao Departamento de Solos e a CAPES pelo apoio financeiro e oportunidade de aprendizado e treinamento.

Ao Prof. Roberto Ferreira de Novais pela orientação, ensinamentos e paciência. Agradeço também por ter agido como pai e amigo nos momentos mais difíceis da minha caminhada.

Ao Prof. Ivo Ribeiro da Silva pela orientação, amizade, conselhos e por toda a confiança empregada no meu trabalho. Agradeço também pelo enorme tempo dedicado na orientação e realização do meu trabalho.

Ao Prof. Marcelo Ehlers Loureiro pela colaboração neste trabalho.

Ao Técnico João Milagres por toda a ajuda, dedicação e empenho na realização do meu trabalho.

A minha amiga-irmã Lorena que sempre esteve comigo em todos os momentos. Pessoa com quem pude compartilhar alegrias e tristezas no decorrer desta caminhada.

A todos os amigos que contribuíram para que meus dias fossem mais agradáveis.

Aos Professores do Departamento de Solos pelas disciplinas ofertadas, pelos ensinamentos transmitidos e pelos conselhos, que foram de grande valia no meu aprendizado.

Aos colegas e funcionários dos laboratórios de Isótopos Estáveis, Solos Florestais e Mineralogia pela contribuição, ajuda e companheirismo.

A toda a minha família, que mesmo distante sempre me incentivou e esteve presente em todos os momentos desta caminhada.

E a todos que, de alguma forma, tiveram contribuição na realização deste trabalho e no meu aprendizado de vida. Meu muito obrigado!!!

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	6
Cultivo de plantas	6
Marcação com ^{13}C	6
Coleta e preparo de amostras de folhas para determinação da razão isotópica.....	8
Coleta e preparo das amostras de partes das plantas para determinação da razão isotópica	9
Análise estatística.....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

MACHADO, Daniel Nolasco. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Enriquecimento e Alocação de ^{13}C em Plantas de Eucalipto**. Orientador: Roberto Ferreira Novais. Coorientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Marcelo Ehlers Loureiro.

Nas últimas décadas, a utilização de isótopos estáveis em várias áreas de pesquisa vem se destacando, como na análise de fluxos e rotas metabólicas, análise de efeitos de estresses em plantas e, em grande escala, no estudo da matéria orgânica do solo (MOS). Estudos de alterações e dinâmica da MOS usando a variação da abundância natural do ^{13}C , requerem mudanças na razão isotópica do C. Uma das alternativas é enriquecer o material vegetal (planta) com ^{13}C , via fixação de $^{13}\text{CO}_2$, de modo que a razão isotópica seja distinta daquela da MOS original. O objetivo deste trabalho foi investigar a homogeneidade do enriquecimento e alocação de ^{13}C em diferentes partes da planta de eucalipto, com idade variando de 4 a 8 meses. No processo de marcação, três plantas de eucalipto cultivadas em solução nutritiva foram expostas a uma atmosfera enriquecida com $^{13}\text{CO}_2$, em uma câmara de vidro (448 dm^3), com temperatura em torno de $24\text{ }^\circ\text{C}$ e concentração de CO_2 monitorada por um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) em amostras de ar retiradas ao longo do processo (126 dias com três pulsos de $^{13}\text{CO}_2$ semanais). Após o período de marcação, as plantas foram separadas em folha (folha-fonte e folha-dreno), galho, casca, lenho e raiz, e analisadas, obtendo-se a $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ das mesmas: folha-fonte (828,07), folha-dreno

(645,72), galho (672,49), casca (691,86), lenho (632,02) e raiz (536,55 ‰). O padrão de alocação e enriquecimento de ^{13}C entre as partes das plantas foi homogêneo, embora com diferenças numéricas da ordem de 291 ‰ na $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$. As plantas de eucalipto mantiveram uma alta taxa de absorção de CO_2 e, conseqüentemente, uma alta taxa fotossintética em concentrações de CO_2 muito acima ($180,4 \text{ mmol L}^{-1} - 7.934 \text{ ppmv}$) do encontrado na atmosfera ($8,64 \text{ mmol L}^{-1} - 380 \text{ ppmv}$). O ^{13}C fixado durante o dia foi liberado em menor escala na respiração noturna em comparação com o ^{12}C .

ABSTRACT

MACHADO, Daniel Nolasco. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Enrichment With, and Allocation of ^{13}C in Eucalypt Plants**. Adviser: Roberto Ferreira de Novais. Co-Advisers: Ivo Ribeiro da Silva and Marcelo Ehlers Loureiro.

In the last decades the use of stable isotopes has gained importance in several research areas, such as metabolites flow and pathways, the effects of biotic and abiotic stresses on plants, and in studies of soil organic matter (SOM). Studies on the alterations and dynamics of SOM using variation in ^{13}C natural abundance require changes in the C isotopic composition, which not always is observed. One alternative is to label plant materials with ^{13}C , via $^{13}\text{CO}_2$, so that the C isotope ratio is different from that of native soil organic matter. Thus, the objective of the current study was to investigate how homogeneous was the labeling as well the allocation to different plant parts of applied ^{13}C . Labeling was carried out with three 4-month old eucalypt plants grown in nutrient solution using a pulse technique. Plants were exposed to an atmosphere enriched with $^{13}\text{CO}_2$ using 448 dm³ glass chambers, under controlled temperature. The CO_2 concentration and the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio were monitored through off-line gas samples analysis in an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) along the pulse-labeling period (126 days, using three pulses per week). After the labeling period the plants were separated in leaves (mature-source leaves and young-drain leaves), branches, bark, stem, and roots, which were then analyzed in an

IRMS. The results were expressed in parts per mill (‰) relative to the Pee-Dee Belemnite standard ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$). The $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ found were: 828.07 ‰ for young leaves, 645.7 ‰ for mature leaves, 672.5 for branches, 691.9 for bark, 632.02 for stem, and 536.6 for roots. The ^{13}C allocation and enrichment pattern among plant parts was homogeneous (statistically equal), although variations in $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ of 292 ‰ between plant parts were observed. The eucalypt plants maintained a high CO_2 absorption, thus photosynthetic rates, even under high CO_2 concentrations ($180.4 \text{ mmol L}^{-1}$ – 7.934 ppmv) that are well above the normal atmospheric CO_2 concentration (8.64 mmol L^{-1} – 380 ppmv). The recently fixed ^{13}C was proportionally less respired at night in comparison to the ^{12}C .

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a utilização de isótopos estáveis em várias áreas de pesquisa vem se destacando, como na análise de fluxos e rotas metabólicas (Ratcliffe & Shachar-Hil, 2006), análise de efeitos de estresses em plantas e em grande escala no estudo da matéria orgânica do solo (MOS) (Fernandes et al., 2007).

O estudo da MOS pode ser facilitado com a utilização desses isótopos estáveis como traçadores. Neste contexto, os isótopos ^{13}C e ^{15}N têm expressiva contribuição, não somente por serem estáveis, mas porque são isótopos de dois nutrientes que possuem ciclo complexo, especialmente no sistema solo-planta (Alves et al., 2005).

Existem dois isótopos do C estáveis na natureza: o ^{12}C que apresenta a maior proporção em relação ao total de C (98,89 %) e o ^{13}C com apenas 1,11 % do total (Farquhar et al., 1989).

As análises da composição isotópica de C são feitas medindo-se a relação de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das amostras em relação a um padrão internacional PDB (Pee Dee Belemnite), o qual tem uma relação molar de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (R) de 0,01124. O resultado é expresso em termos da diferença de composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) em relação ao PDB, gerando usualmente um valor negativo, pois a relação molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ das plantas, por exemplo, é inferior à do PDB. Como os valores de δ (delta) são muito pequenos, estes são expressos em partes por mil (‰) (O'Leary, 1981).

Na atmosfera, os valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ do CO_2 situam-se em torno de -7‰ , e nas plantas de -11 a -35‰ . Grande parte da variação isotópica natural nas plantas resulta da discriminação isotópica durante a fotossíntese. As plantas podem ser divididas em três grupos fotossintéticos principais, cada um com seu padrão de discriminação isotópica específico: C_3 , C_4 e CAM. A $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ desses diferentes grupos fotossintéticos são, em geral, resultado de: (1) propriedades bioquímicas das enzimas na fixação primária de CO_2 ; e (2) limitações da difusão do CO_2 dentro das folhas (Farquhar et al., 1989).

As maiores diferenças na composição isotópica de C nas plantas são observadas entre espécies que têm ciclo de carboxilação C_3 , seguido das plantas C_4 . As plantas C_3 fixam o CO_2 atmosférico por meio da enzima Rubisco e as C_4 têm como primeiro sítio de carboxilação a enzima PEP carboxilase. A PEP carboxilase apresenta alta afinidade (baixo K_m) pelo CO_2 (Magalhães, 1985). Como a Rubisco apresenta uma menor afinidade pelo CO_2 , esta enzima discrimina em maior grau o isótopo pesado de C, o ^{13}C , em relação ao isótopo leve, o ^{12}C , muito mais do que a PEP e, assim, as plantas C_3 acumulam menos ^{13}C , apresentando composição isotópica ($\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}$) em torno de -20 a -34‰ , enquanto que para as C_4 , estes valores variam de -9 a -17‰ (Smith & Epstein, 1971).

Desse modo, o uso da abundância natural do ^{13}C para identificar a origem do C do solo pressupõe que sua MO reflita o material vegetal do qual derivou (Balesdent et al., 1987). Estudos de alterações e dinâmica da MOS usando a variação da abundância natural do ^{13}C requer mudanças na razão isotópica do C. Isso ocorre, por exemplo, quando uma espécie dominante do tipo C_3 é substituída por outra(s) do tipo C_4 , ou vice-versa. Esta substituição tem sido útil, por exemplo, para estudar a dinâmica da MOS após a substituição da Floresta Amazônica, dominada por espécies C_3 , por pastagens com gramíneas, dominadas por espécies C_4 (Cerri, 1986; Andreux et al., 1990; Cerri et al., 1990; Choné et al., 1991; Bernoux et al., 1999; Fernandes et al. 2007) ou em áreas de pastagens do tipo C_4 em que se implantaram povoamentos de eucalipto (espécie C_3) (Balieiro et al., 2008; Lima et al., 2008).

No entanto, em solos cuja MOS é constituída por compostos majoritariamente derivados de espécies C₃, como em áreas onde naturalmente não ocorrem espécies do tipo C₄, ou em áreas onde o cultivo do eucalipto, ou outra espécie C₃, já é de longa data, o uso da variação na abundância natural do ¹³C para estudar a MOS é muito dificultado. Uma das alternativas nesses casos é enriquecer o material vegetal (planta) com ¹³C, via fixação de ¹³CO₂, de modo que a razão isotópica seja distinta daquela da MOS original.

A marcação de plantas por meio da exposição ao ¹³CO₂ passou a ser utilizada na década de 80, pois era difícil obter uma autorização para uso de ¹⁴C, ambientalmente perigoso (Alves et al., 2008). Palta & Fillery (1999) propuseram um sistema portátil que permite a marcação de plantas com ¹³C *in situ*. O sistema era composto de uma câmara de plástico transparente, onde se adicionava ácido láctico em um recipiente contendo NaH¹³CO₃ (99 % ¹³C) e a concentração de CO₂ na câmara era monitorada com um analisador de gás com detector de infravermelho (IRGA). Após o período de marcação verificou-se um enriquecimento bastante homogêneo de 5 % de ¹³C entre ramos e raízes. Estudos das transformações da palhada de arroz no solo após ser submetida a manejos distintos foram feitos com material duplamente marcado com ¹³C e ¹⁵N, sendo que o resíduo enriquecido que foi adicionado ao solo apresentava uma $\delta_{PDB}^{13}C$ de 543 ‰ (Bird et al., 2002, 2003).

Não foram encontrados dados em relação à marcação de plantas de eucalipto com ¹³C a campo, talvez pela maior dificuldade de controle do processo e homogeneidade de marcação em plantas lenhosas adultas.

Para estudos das transformações e estabilização do C derivado de resíduos vegetais no solo, poderá ser interessante que os componentes e, ou, compostos da planta possuam razão isotópica semelhante de forma que não haja sub- ou superestimação dos componentes nas frações da MOS. No entanto, tal pressuposto nem sempre é possível visto que naturalmente já ocorre discriminação isotópica do C nas plantas. Bromand et al. (2001) estudando a partição diferencial de ¹³C em diferentes componentes das plantas como grão, casca, caule e

raízes, cultivaram plantas de trigo (*Triticum aestivum*) expondo-as a uma atmosfera enriquecida com $^{13}\text{CO}_2$. Eles observaram uma taxa similar de enriquecimento nas diferentes partes da planta: grão = 3,41, casca = 3,41, caule = 3,65 e raiz = 3,50 % de átomos de ^{13}C . Como a abundância de ^{13}C manteve-se homogênea nas diferentes partes da planta, os autores concluíram que a marcação da biomassa vegetal com ^{13}C pode ser importante em estudos de dinâmica e monitoramento do C no solo. Como exemplo, Stewart et al. (2009) utilizaram resíduos de plantas de trigo enriquecidas com ^{13}C ($\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C} = 738,63 \text{ ‰}$) para avaliar a capacidade e o mecanismo de estabilização da MOS de sete tipos de solo, durante 2,5 anos de incubação.

Em estudo realizado por Whelan et al. (1970), com plantas herbáceas C_3 e C_4 , foi verificado que resíduos vegetais com maiores teores de açúcares, proteínas, ácidos orgânicos e aminoácidos apresentaram valores similares de ^{13}C em relação ao material total da planta, sendo esses compostos de mais fácil decomposição. Em contrapartida, resíduos com maiores teores de lipídeos e carotenóides, de decomposição mais lenta, apresentaram menores valores de ^{13}C em relação à planta toda. Celulose e hemicelulose compõem de 57 a 77 % do tecido de plantas herbáceas, e são tipicamente enriquecidas de 1–2 ‰ com ^{13}C em relação ao material total da planta. Resíduos de plantas lenhosas, com maiores teores de lignina, são mais empobrecidos em ^{13}C e de difícil decomposição em relação à celulose (Benner et al., 1987). Como os compostos orgânicos vegetais, que compõem as unidades estruturais dos tecidos, como as proteínas, celulose, hemicelulose, amido, pectina, lignina e lipídios, são importantes na formação da MOS (Kögel-Knabner, 2002; Guerra et al., 2008), resíduos de plantas de composição variável, enriquecidas com ^{13}C , podem apresentar diferenças na decomposição, com diferente contribuição na $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ da MOS em relação ao material adicionado.

Em cultivos de ciclo mais longo, como é o caso florestal, a MOS parece estar estreitamente relacionada com a sustentabilidade da produção a longo prazo (Mendham et al., 2004). A cultura do eucalipto pode proporcionar aumentos nos teores da MOS ao longo dos anos de

cultivo (Pegoraro, 2007; Vital, 2007; Faria et al., 2008; Lima et al., 2008). Diversos estudos têm sido realizados com relação ao melhor manejo dos resíduos da cultura como folhas, galhos, casca, para se obter um maior acúmulo de MOS. Essas partes das plantas são constituídas de diferentes proporções de lignina, celulose e hemicelulose, que são importantes componentes formadores da MOS (Guerra et al., 2008). Por serem os derivados da lignina mais pobres em ^{13}C (Benner et al., 1987) e, ela e seus derivados contribuirão substancialmente para a formação da MOS (Stevenson, 1994; Simpson et al., 2003; Kelleher et al., 2006), torna-se necessário um alto nível (intensidade) de marcação com ^{13}C em plantas lenhosas, em particular, para possibilitar o estudo da dinâmica da formação e degradação da MOS derivada de seus resíduos. Poucos estudos são disponíveis sobre o método necessário para obter este alto nível de marcação e, particularmente, no caso do eucalipto, não foram encontrados estudos com tal propósito. A determinação e o melhor entendimento do enriquecimento e alocação de ^{13}C nessas partes das plantas podem auxiliar no estudo da dinâmica desses compostos das plantas no solo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o enriquecimento e a homogeneidade da alocação de ^{13}C em diferentes partes da planta de eucalipto (folha, galho, casca, lenho e raiz).

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de plantas

Foram utilizadas três plantas clonais de eucalipto (híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*), com 90 dias de idade, cultivadas em tubetes. Essas plantas foram transferidas para vasos de 10 L onde foram cultivadas em solução nutritiva de Clark (1975), com sistema de aeração constante e pH mantido a 5,5, em casa de vegetação. Após um período de 30 dias nessa solução, o processo de marcação das plantas com ^{13}C foi iniciado.

Marcação com ^{13}C

No processo de marcação foi utilizada uma câmara de vidro de 448 dm^3 . Esta continha uma bomba de aeração para a solução nutritiva, uma placa de Petri para adicionar o H_2SO_4 e o $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$, um pequeno ventilador para homogeneização do CO_2 , um termômetro e dois tubos de vidro com septo de borracha na lateral da câmara, um para a adição do ácido e do carbonato, e outro para a coleta de amostras de ar da câmara. Acima da câmara, havia uma haste com uma lâmpada halógena de 1.000 W, que fornecia uma irradiância de $340\ \mu\text{mol f\u00f3tons cm}^{-2}$, sendo que, entre a lâmpada e a câmara, era mantida uma lâmina de água de oito cm para restringir o aquecimento dentro da câmara proveniente da lâmpada, permitindo manter uma temperatura em torno de $24\ ^\circ\text{C}$.

No primeiro dia das plantas na câmara (120 dias do início do experimento), iniciou-se o processo de marcação com ^{13}C , às 13:00 h do dia, sendo isto realizado com uma frequência de três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira). Nesse momento foi coletada uma amostra de 10 mL de ar da câmara, utilizando-se uma seringa cromatográfica, com o objetivo de monitorar a concentração de CO_2 e a variação na composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) do ar da câmara. Posteriormente, a lâmpada foi ligada, iniciando-se a absorção do CO_2 da câmara pelas plantas. Foi deixado ocorrer a absorção de CO_2 por um tempo de 30 a 60 min, antes de se iniciar os pulsos de $^{13}\text{CO}_2$, com o objetivo de abaixar a concentração de CO_2 inicial da câmara de aproximadamente 13,64 (600) a 17,73 mmol L^{-1} (780 ppmv) para 11,37 mmol L^{-1} (500 ppmv). A alta concentração de CO_2 inicial era devida a baixa ventilação do ambiente. Após esse tempo de absorção de CO_2 , foi coletada outra amostra de ar da câmara e foi dado o primeiro pulso de $^{13}\text{CO}_2$, injetando-se uma solução de $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ 0,18 mol L^{-1} , contendo 99 % de ^{13}C (Isotec Inc. Miamisburg, Ohio), com seringa cromatográfica de 10 mL através do septo lateral, em um frasco com 50 mL de H_2SO_4 3,8 mol L^{-1} . O CO_2 evoluído foi homogeneizado na câmara selada por meio de um pequeno ventilador. Três minutos após o pulso foi coletada outra amostra de ar da câmara. Outros quatro pulsos de $^{13}\text{CO}_2$ foram efetuados com uma hora de intervalo, sendo que antes e após cada pulso foram coletadas amostras de ar da câmara. Uma hora após o 5º pulso, aproximadamente às 19:00 h do dia, a lâmpada foi desligada, iniciando o período escuro. Doze horas após iniciado o período escuro, aproximadamente às 7:00 h do dia seguinte, foi coletada outra amostra de ar da câmara e a lâmpada foi ligada novamente, deixando-se ocorrer a absorção de CO_2 , acumulado na câmara como consequência da respiração das plantas no período escuro, por um tempo necessário para que aproximadamente 80 % deste CO_2 fosse absorvido. Este tempo variou de 6 a 10 h, ao longo dos 126 dias. Com isso, parte do ^{13}C liberado na respiração noturna foi refixado. Após esse tempo, aproximadamente às 15:00 h do dia, as plantas eram retiradas da câmara de marcação e levadas para a casa de vegetação,

permanecendo nesta até as 13:00 h do dia seguinte, quando eram trazidas de volta à câmara e reiniciada a marcação. Esse ciclo se repetiu três vezes por semana durante 126 dias (18 semanas).

As amostras de ar da câmara coletadas ao longo dos dias foram analisadas em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) de fluxo contínuo (20–20 ANCA-GSL, Sercon, Crewe, UK), com sensibilidade analítica de 0,3 ‰, determinando a variação na concentração de CO₂ e a composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) do CO₂ da câmara. Para essas amostras de ar, foi utilizado como referência o CO₂ atmosférico (8,64 mmol L⁻¹ = 380 ppmv), determinado em amostras de 10 mL de ar do ambiente externo ao laboratório, sempre às 8:00 h da manhã, no início de cada semana.

A $\delta^{13}\text{C}$ foi calculada em com base na equação:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{‰}) = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{PDB}}) / R_{\text{PDB}}] \times 1.000$$

Em que R_{amostra} é a relação molar ¹³C/¹²C da amostra analisada e R_{PDB} a relação molar ¹³C/¹²C do padrão Pee Dee Belemnite.

Coleta e preparo de amostras de folhas para determinação da razão isotópica

No decorrer do processo de marcação (1^o, 14^o, 21^a, 42^o, 63^o, 91^o, 98^o e 126^o dias), foram coletadas amostras de folhas-fonte (folhas maduras, completamente expandidas) e folhas-dreno (folhas jovens que apresentavam até 20 % da área de uma folha-fonte completamente desenvolvida e apresentando coloração verde escura) das plantas, para monitoramento da dinâmica do enriquecimento e posterior avaliação da eficiência do mesmo. As folhas foram moídas e o material resultante foi passado em peneira de 0,250 mm (60 mesh) de malha, de modo a facilitar a pesagem de 1 mg de cada amostra, para análise no IRMS, obtendo a $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ das mesmas.

Coleta e preparo das amostras de partes das plantas para determinação da razão isotópica

Após o término do período de marcação (126^o dia), as plantas foram novamente divididas em folhas-fonte e folhas-dreno e também em caule, galhos, casca e raízes, sendo as amostras liofilizadas e passadas em moinho do tipo Willey.

O resíduo moído das partes das plantas foi macerado novamente para passar em peneira de 0,250 mm (60 mesh) de malha, pesando-se 1 mg de cada amostra (folha-fonte, folha-dreno, galho, casca, lenho e raiz) para determinação da $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ por IRMS.

Análise estatística

O experimento foi constituído de três plantas dispostas na câmara de marcação, cada uma representando uma repetição. Os dados de enriquecimento de ^{13}C em cada parte da planta foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias por meio de teste de Tukey a 5 %, utilizando o software SAEG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do processo de marcação, considerando-se os dois primeiros dias da terceira semana como exemplo (pois são representativos de todo o processo), observou-se que havia na câmara, aproximadamente, $17,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de CO_2 . Depois de uma hora na presença de luz, e a conseqüente absorção de CO_2 pelas plantas, a concentração abaixou para $12,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (uma absorção de $5,3 \text{ mmol L}^{-1}$). Neste ponto, foi efetuado o primeiro pulso com uma solução de $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ na câmara, elevando para $14,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a concentração de CO_2 . Daí em diante a cada 1 h era efetuado um pulso, sendo que antes e depois do mesmo foram coletadas amostras de ar para posterior análise. Ao longo do tempo de marcação foi observada uma absorção média de $3,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de CO_2 pelas plantas, com um incremento médio de $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ por pulso.

Ao fim de 6 h (cinco pulsos) de marcação, a lâmpada foi desligada, quando na câmara havia $4,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de CO_2 . Após 12 h a lâmpada foi novamente ligada, sendo que, nesse momento, a concentração de CO_2 na câmara subiu para $180,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (7934 ppmv), resultante da elevada taxa respiratória noturna.

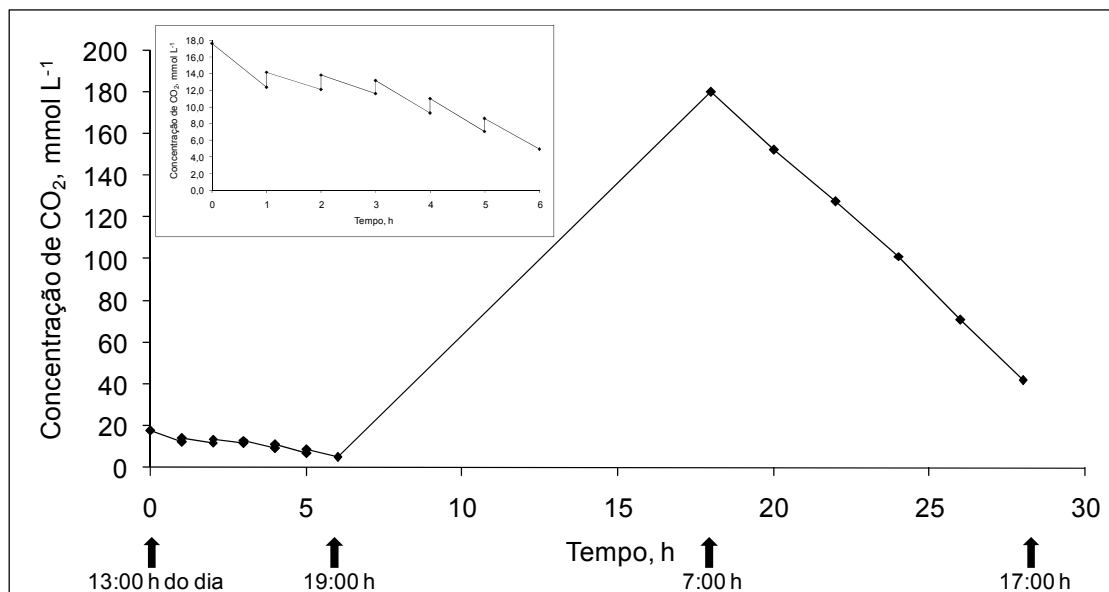


Figura 1. Concentrações de CO₂ (ppmv) na câmara ao longo do tempo de marcação. As setas pretas mostram a hora do dia ao longo do processo de marcação. Os pequenos picos sucessivos mostram o momento da adição do carbonato de sódio com 99 % de ¹³C. Em detalhe, a modificação na escala para mostrar as diferenças de concentração de CO₂ antes e após cada pulso nas primeiras 6 h de marcação do dia.

Um resultado interessante foi o fato de as plantas absorverem CO₂ mesmo com este em alta concentração na câmara (180,4 mmol L⁻¹). Quando a lâmpada foi ligada no dia posterior ao pulso de Na₂¹³CO₃, as plantas absorveram CO₂ a uma taxa de 13,9 mmol L⁻¹ h⁻¹, valor esse, 3,6 vezes maior do que o observado durante o processo de marcação que foi de 3,8 mmol L⁻¹ h⁻¹, quando a câmara apresentava uma concentração de CO₂ de aproximadamente 12,5 mmol L⁻¹. Estes resultados indicam que mesmo sendo a concentração de CO₂ aumentada cerca de 20 vezes em comparação a concentração atmosférica, pode não ter havido um fechamento estomático completo, de forma que o gradiente difusivo foi suficiente para suportar altas taxas fotossintéticas mesmo na presença de uma provável grande redução na abertura estomática, permitindo, ainda, um aumento expressivo da concentração de CO₂ nos espaços intercelulares e no interior das células-guarda, como observado por

outros autores (Herrick et al., 2004; Larcher, 2004). A abertura estomática é comandada pela pressão de turgor das células-guarda, que é determinada pelas concentrações de íons e solutos orgânicos. Para ocorrer o fechamento estomático, o potencial de membrana da célula-guarda tem que ser despolarizado, ou seja, ficar menos negativo (Assmann, 1999). Estudos eletrofisiológicos mostraram que elevada concentração de CO₂ aumenta a atividade dos canais de efluxo de K⁺, diminui a atividade dos canais de influxo de K⁺, aumenta a atividade dos canais aniônicos, estimulando a liberação de Cl⁻ das células guardas e aumento da concentração de Ca²⁺. (Webb et al., 1996; Brearley et al., 1997; Hanstein & Felle, 2002; Raschke et al., 2003). Essas mudanças coletivamente despolarizam o potencial de membrana das células-guarda e causam a redução da abertura estomática (Assmann, 1993). Herrick et al. (2004) observaram redução de 28 % na condutância estomática de plantas de *Liquidambar styraciflua* submetidas a uma atmosfera de 13 mmol L⁻¹ de CO₂, embora a limitação estomatal decrescesse com o aumento da concentração de CO₂. Esse resultado mostra que o aumento na taxa fotossintética com a elevada concentração de CO₂, mais que compensou a limitação difusional imposta pela redução da condutância estomática em alta concentração de CO₂ (Tissue et al., 1995).

A composição isotópica do CO₂ dentro câmara de marcação teve expressiva mudança ao longo do tempo, sempre aumentado após o pulso de Na₂¹³CO₃ durante o período iluminado, mas diminuindo substancialmente durante a noite. Isso deve ter ocorrido como resultado das reações de descaboxilação da respiração, indicando que foi respirado muito mais ¹²C do que ¹³C pelas plantas (Gillon et al., 1999) (Figura 2).

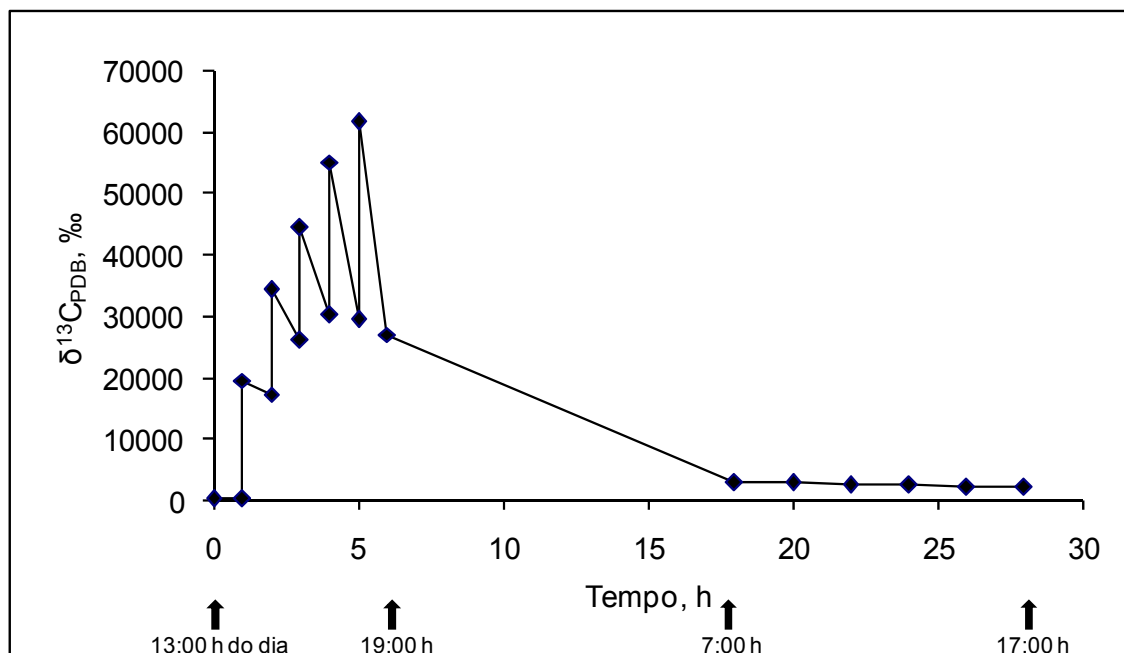


Figura 2. Evolução da composição isotópica do CO₂ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) na câmara ao longo do tempo de marcação. As setas pretas mostram a hora do dia ao longo do processo de marcação.

A maior respiração de ¹²C durante a noite pelas plantas pode ser devido ao fato de que boa parte dos substratos utilizados na respiração não seja os compostos formados e acumulados nas últimas horas, anteriores ao período noturno, quando ocorreu a marcação, mas do dia anterior, quando as plantas não tinham sido submetidas à presença do ¹³C. Se substratos respiratórios marcados tivessem sido utilizados em proporções semelhantes aos não marcados, mesmo considerando a discriminação enzimática, não haveria uma redução tão pronunciada na concentração do isótopo mais pesado (¹³C). Esse resultado corrobora com o encontrado por Nogués et al. (2004), que observaram em folhas de feijão marcadas com ¹³C e ¹⁴C, que amido e sacarose formados no dia anterior explicavam menos de 50 % do C perdido na forma de CO₂ na respiração noturna. Segundo revisão de Badeck et al. (2005), vários autores relataram que geralmente durante a respiração noturna o CO₂ liberado é enriquecido com ¹³C comparativamente com os produtos formados na fotossíntese. Isso reforça ainda mais a presença dos

efeitos do fracionamento entre ^{13}C e ^{12}C normalmente observados durante a respiração noturna (Ghashghaie et al., 2003; Klumpp et al., 2005) e, como no presente trabalho, a magnitude de liberação de $^{13}\text{CO}_2$ durante a respiração foi menor que a liberação de $^{12}\text{CO}_2$, pode-se inferir que a maior parte dos compostos prontamente formados durante a marcação, após 14:00 h, não foram utilizados como substratos na respiração noturna. Ainda segundo Badeck et al. (2005), a respiração noturna e, conseqüentemente, a formação de compostos na planta mais enriquecidos em ^{13}C vai depender de vários fatores como: (a) se o fracionamento entre os isótopos ocorre na respiração e átomos de C mais pesados são respirados preferencialmente, (b) se ocorre exportação diferencial de compostos pesados isotopicamente para outros órgãos ou (c) se as reações de carboxilação adicionam C para uma parte da planta com uma composição isotópica diferente da composição dos substratos respirados. Segundo Ghashghaie et al. (2003), o fracionamento isotópico na respiração noturna é de grande complexidade e influenciado, além dos fatores citados por Badeck et al. (2005), pela idade da planta, estágio de desenvolvimento, estação do ano, estresses ambientais, fotorrespiração, todos eles podendo modificar a composição isotópica de compostos da planta.

Com 14 dias de marcação observou-se enriquecimento significativo das folhas-fonte e -dreno das plantas, sendo que a composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) passou de -29,04 ‰ no tempo zero, para 135 ‰ nas folhas-fonte e 532 ‰ nas folhas-dreno. Após 42 dias de marcação, as folhas-fonte e -dreno apresentavam valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de 599 e 1.887, respectivamente (Figura 3). A maior $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ nas folhas-dreno pode indicar uma translocação momentânea de açúcares prontamente formados em maior nível das folhas-fonte para as folhas-dreno e, ou, também devido à maior atividade metabólica das folhas-dreno, tendo maior demanda em fotoassimilados, como já observado em outros trabalhos (Tcherkez et al., 2003; Kristiansen et al., 2004). Com 42 dias de marcação, tanto as folhas-fonte como folhas-dreno apresentaram o maior nível de enriquecimento, sendo que após esse período as plantas começaram a apresentar sintomas de estresse abiótico (Levitt, 1980),

tais como escurecimento das raízes, epinastia dos ramos, murcha de folhas, aparecimento de estruturas parecidas com lenticelas na região próxima da inserção do pecíolo ao galho, e crescimento desordenado de células na nervura principal, na parte abaxial das folhas. Com isso, o processo de marcação foi suspenso por 42 dias, período em que as plantas foram levadas para a casa de vegetação até a completa recuperação. No 84^o dia, quando o processo de marcação foi reiniciado, as folhas-fonte e -dreno apresentavam valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de 234 e -17 ‰, respectivamente. Esses valores indicam que houve a formação de novas estruturas foliares com mais ^{12}C , sendo que as reservas formadas com ^{13}C anteriormente, também foram utilizadas, ainda mantendo-se um nível acima do normal desse isótopo durante o período de recuperação das plantas. No 91^o dia, as folhas-fonte apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ menores (233 ‰), provavelmente devido ao fato de as folhas terem sido coletadas aleatoriamente nos ramos, podendo ter sido amostradas folhas que foram formadas na casa de vegetação durante o período de recuperação das plantas. Como não houve enriquecimento nesse período, as estruturas foliares formadas apresentaram um menor valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$. Ao final do processo de marcação, no 126^o dia, a $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de folhas-fonte e -dreno era de 304 e 651 ‰, respectivamente. Esses valores mostram que as plantas não conseguiram manter o mesmo nível de enriquecimento atingido até 42^o dia, podendo ser devido aos problemas surgidos no decorrer do processo, como também devido ao mais avançado estágio de desenvolvimento das plantas, aliado à formação de novas estruturas e modificações na composição bioquímica das plantas (Raymond, 2000; Silva et al., 2005). É importante salientar que, para uma boa marcação, que irá garantir resíduo vegetal enriquecido com ^{13}C , tanto compostos mais lábeis quanto estruturais e, conseqüentemente, mais recalcitrantes devem ser marcados na planta (Stevenson, 1994; Van Vuuren et al., 2000).

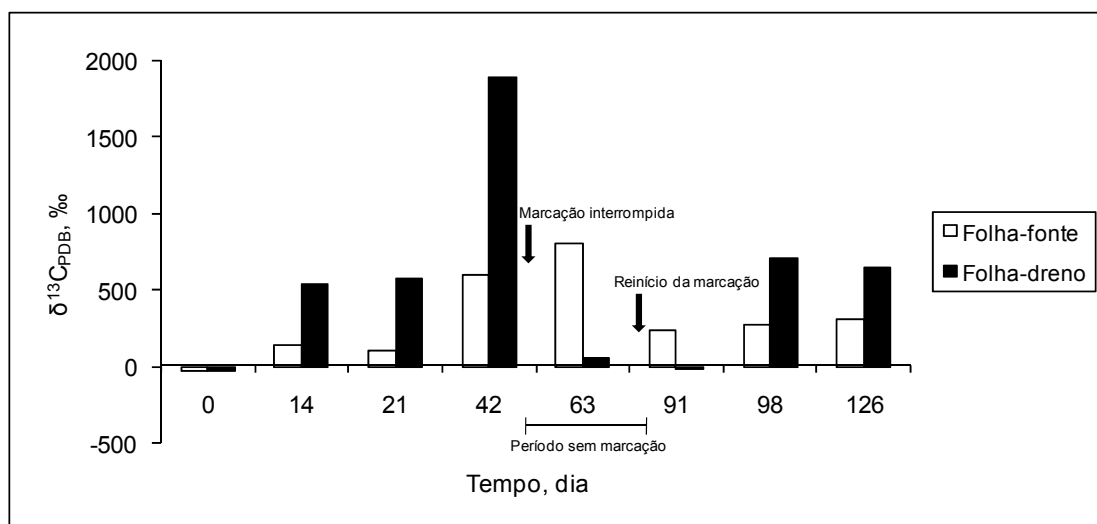


Figura 3. Médias de composição isotópica de ^{13}C de folhas-fonte e -dreno ao longo do processo de marcação. As setas pretas indicam quando foi interrompido e reiniciado o processo de marcação.

Os resultados de enriquecimento das plantas com ^{13}C mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as partes da planta (Quadro 1). Todavia, em trabalhos como os de Gleixner et al. (1993); Terwilliger & Huang (1996); Scartazza et al. (1998); Badeck et al. (2005); variações de 2 ‰ na $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ entre compostos e órgãos de plantas são consideradas como diferenças significativas. Desse modo, diferenças como as encontradas no presente trabalho de até 291 ‰ entre partes de plantas, mesmo não sendo significativas, dado o coeficiente de variação de 17 %, devem ser avaliadas com cautela.

A diferença numérica encontrada no enriquecimento entre as raízes e outras partes da planta de eucalipto (Quadro 1) de certo modo corroboram com os resultados encontrados por Bird et al. (2003), que observaram que raízes de arroz tiveram menor enriquecimento (443 ‰) comparado com a parte aérea (777 ‰). Essa diferença pode ser devido ao fracionamento isotópico entre ^{13}C e ^{12}C que ocorre durante a respiração noturna (Ghashghaie et al., 2003; Badeck et al., 2005) e também devido fracionamento natural que ocorre nas rotas metabólicas, onde, dependendo da posição em que o ^{13}C se encontra nos compostos, pode ou não ser perdido na forma de CO_2 (Gillon et al., 1999). A

tendência para o menor enriquecimento e alocação de ^{13}C no lenho, folhas-fonte, galho e casca, pode ser devido, indiretamente, ao maior crescimento dessas partes quando do estresse abiótico ocorrido, pois no 42º dia as plantas foram levadas para a casa de vegetação onde, depois de 42 dias de recuperação (84º dia), apresentaram expressivo crescimento. Nesse período as plantas não foram submetidas ao processo de marcação e, conseqüentemente, as novas estruturas formadas não apresentavam a mesma $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de quando estavam sendo marcadas. O maior enriquecimento numérico das folhas-dreno deve estar relacionado ao fato de que, no 126º dia de marcação, as folhas foram coletadas 4 h após os pulsos de ^{13}C . Dessa forma, os fotoassimilados que foram formados com mais ^{13}C pouco tempo antes da coleta das folhas-fonte, podem ter sido translocados para as folhas dreno (Kozlowski & Pallardy, 1997; Taiz & Zeiger, 2004), conferindo um maior teor deste isótopo nestas folhas.

Quadro 1. Composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) das partes das plantas de eucalipto enriquecidas com ^{13}C

Parte da planta	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$
	‰
Folha-dreno	828,1 a
Casca	691,7 a
Galho	672,5 a
Folha-fonte	645,7 a
Lenho	636,0 a
Raiz	536,6 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

Estudos em relação a períodos curtos de marcação devem ser realizados com o objetivo de se avaliar a magnitude da alocação e aumento da $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ após poucas horas de marcação, nas folhas e nos compostos bioquímicos, podendo-se estabelecer diferenças no fluxo metabólico entre folhas-fonte e -dreno. É também necessária a avaliação de períodos mais longos de marcação para observação do tempo de incorporação de ^{13}C em órgãos e compostos estruturais da planta como um todo, auxiliando numa maior segurança em relação à técnica de marcação para obtenção de resíduos enriquecidos com ^{13}C , para estudos diversos como da MOS.

As plantas não marcadas não apresentaram diferenças na composição isotópica entre suas partes, com valores bem próximos (Quadro 2).

Quadro 2. Composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) das partes das plantas de eucalipto não-marcadas

Parte da planta	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$
	‰
Folha	-31,4 a
Raiz	-32,2 a
Lenho	-32,8 a
Galho	-33,3 a
Casca	-33,3 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

A $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ nas partes das plantas enriquecidas com ^{13}C foi em média de 668 ‰ em 126 dias de marcação. Stewart et al. (2009) conseguiram uma $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de 738 ‰ em resíduo de trigo, não mencionando o tempo de marcação. Mas essa composição isotópica foi medida de uma solução resultante de extração em água quente, que pode ter predominância de compostos como açúcares e ácidos orgânicos de baixo peso molecular que, quando adicionados ao solo, por exemplo, seriam mais lábeis e de mais fácil degradação no solo (Stevenson, 1994; Santos et al., 2008). Portanto, resultados como esse devem ser analisados com cautela, pois a maior proporção de ^{13}C alocada nesses compostos pode ser consumida rapidamente pela microbiota do solo (Moreira & Siqueira, 2008), diminuindo a marcação da MOS.

Um alto nível de marcação de resíduos de plantas, como o encontrado no presente trabalho, é desejável, para distinguir o resíduo adicionado do material presente no solo (Balesdent et al., 1987). Desse modo, o fracionamento isotópico e, ou, perda de ^{13}C na decomposição dos resíduos, tenderiam a ser, proporcionalmente, menos expressivos, pois, os compostos bioquímicos formados durante o processo de marcação apresentariam esqueletos carbônicos com maior proporção de ^{13}C , alterando de maneira menos significativa a composição isotópica da MOS, mantendo sua marcação.

Com o objetivo de obter maior eficiência no enriquecimento de ^{13}C nas plantas, estudos devem ser realizados efetuando-se o processo de marcação na parte da manhã, nas primeiras horas do dia, quando a taxa fotossintética é maior (Larcher, 2004), havendo uma maior possibilidade de que o ^{13}C prontamente fixado seja translocado para outras partes da planta e incorporado na biomassa vegetal, tornando menos expressivo os efeitos da quantidade de ^{13}C liberado durante a respiração noturna na forma de $^{13}\text{CO}_2$.

O sistema portátil de enriquecimento de plantas utilizado por Palta & Fillery (1999) e Bird et al. (2003) apresenta o inconveniente de necessitar de um IRGA para monitorar a concentração de CO_2 durante todo o processo e um sistema de fluxo para injeção e homogeneização

do CO₂. O sistema utilizado no presente trabalho utiliza uma câmara simples de vidro, com um pequeno ventilador para homogeneização do CO₂, sendo este monitorado pelo próprio espectrômetro de massas que é utilizado para análise do material vegetal.

O processo de marcação de plantas utilizado neste trabalho levantou alguns pontos interessantes, sendo que o primeiro seria a maior tolerância das plantas de eucalipto em manter uma alta taxa de absorção de CO₂ e, conseqüentemente, uma alta taxa fotossintética a concentrações de CO₂ muito acima (180,4 mmol L⁻¹ – 7.934 ppmv) do encontrado na atmosfera (8,64 mmol L⁻¹ – 380 ppmv). Sendo que em trabalho de revisão, Long et al. (2004) observaram em folhas de plantas C₃, diminuição da capacidade carboxilativa da fotossíntese em concentrações de CO₂ em torno de 15,9 mmol L⁻¹ (700 ppmv), decrescendo a atividade fotossintética por uma possível diminuição na expressão de genes relacionados ao processo fotossintético. O segundo ponto seria os resultados encontrados em relação a respiração noturna das plantas de eucalipto, mostrando que os compostos prontamente formados durante o dia na fotossíntese, podem não ser a maior parte dos substratos utilizados durante a noite.

CONCLUSÕES

- O padrão de alocação e enriquecimento de ^{13}C entre as partes das plantas de eucalipto foi homogêneo, embora com diferenças numéricas da ordem de 291 ‰ na $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.
- As plantas de eucalipto mantiveram uma alta taxa de absorção de CO_2 e, conseqüentemente, uma alta taxa fotossintética em concentrações de CO_2 muito acima ($180,4 \text{ mmol L}^{-1}$ – 7.934 ppmv) do encontrado na atmosfera ($8,64 \text{ mmol L}^{-1}$ – 380 ppmv).
- O ^{13}C fixado durante o dia foi liberado em menor escala na respiração noturna em comparação com o ^{12}C

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.J.R.; OLIVEIRA, O.C.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. Métodos isotópicos. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P. & CAMARGO, F.A.O., eds. 2.ed. Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, Metropole, 2008. p.229-241.
- ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C.P.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e do nitrogênio no sistema solo-planta. In: AQUINO, A.M. & ASSIS, R.L., eds. Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília, Embrapa-SCT, 2005. p.343-350.
- ANDREUX, F.; CERRI, C.C.; VOSE, P.B. & VITORELLO, V.A. Potential of stable isotope, ^{15}N and ^{13}C , methods for determining input and turnover in soils. In: HARRISON, A.F.; INESON, P. & HEAL, O.W., eds. Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. New York, Elsevier Applied Sciences, 1990. p.259-275.
- ANDREWS, J.A.; HARRISON, K.G.; MATAMALA, R. & SCHLESINGER, W.H. Separation of root respiration from total soil respiration using carbon-13 labeling during Free-Air Carbon Dioxide Enrichment (FACE). *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:1429-1435, 1999.
- ASSMANN, S.M. Signal transduction in guard cells. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 9:345-375, 1993.
- ASSMANN, S.M. The cellular basis of guard cell sensing of rising CO_2 . *Plant, Cell Environ.*, 22:629-637, 1999.

- BADECK, F.W.; TCHERKEZ, G.; NOGUES, S.; PIEL, C. & GHASHGHAIE, J. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – a widespread phenomenon. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 19:1381-1391, 2005.
- BALESDENT, J.; MARIOTTI, A. & GUILLET, B. Natural ^{13}C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biol. Biochem.*, 19:25-30, 1987.
- BALIEIRO, F.C.; PEREIRA, M.G.; ALVES, B.; RESENDE, A.S. & FRANCO, A.A. Soil carbon and nitrogen in pasture soil reforested with Eucalyptus and Guachapele. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1253-1260, 2008.
- BENNER, R.; FOGEL, M.L.; SPRAGUE, E.K. & HODSON, R.E. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature*, 329:708-710, 1987.
- BERNOUX, M.; FEIGL, B.J.; CERRI, C.C.; GERALDES, A.P.A. & FERNANDES, S.A.P. Carbono e nitrogênio em solo de uma cronosseqüência de floresta tropical–pastagem de Paragominas. *Sci. Agríc.*, 56:1-11, 1999.
- BIRD, J.A.; VAN KESSEL, C. & HORWATH, W.R. Nitrogen dynamics in humic fractions under alternative straw management in temperate rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 66:478-488, 2002.
- BIRD, J.A.; VAN KESSEL, C. & HORWATH, W.R. Stabilization of ^{13}C -carbon and immobilization of ^{15}N -nitrogen from rice straw in humic fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 67:806-815, 2003.
- BREARLEY, J.; VENIS, M.A. & BLATT, M.R. The effect of elevated CO_2 concentrations on K^+ and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta*, 203:145-154, 1997.
- BROMAND, S.; WHALEN, J.K.; JANZEN, H.H.; SCHJOERRING, J.K. & ELLERT, B.H. A pulse-labelling method to generate C-13-enriched plant materials. *Plant Soil*, 235:253-257, 2001.
- CERRI, C.C. Dinâmica da matéria orgânica em solos de pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS DE PASTAGEM, Jaboticabal, 1989. *Anais. Jaboticabal*, 1989. p.135-147.

- CERRI, C.C.; ANDREUX, F.G. Changes in organic carbon content in oxisols cultivated with sugar cane and pastures based on ^{13}C natural abundance measurement. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 14., Kyoto, 1990. Anais. Kyoto, ISSS, 1990. v.4. p.98-103.
- CERRI, C.C.; MORAES, J.F.L. & VOLKOFF, B. Dinâmica do carbono orgânico em solos vinculados à pastagens da Amazônia brasileira. Invest. Agr., 1:95-102, 1992.
- CHONÉ, T.; ANDREUX, F.; CORREA, J.C.; VOLKOFF, B. & CERRI, C.C. Changes in organic matter in an Oxisol from the central Amazonian forest during eighth-years as pasture, determined by ^{13}C isotopic composition. In: BERTHELIN, J., ed. Diversity of environmental biogeochemistry. Amsterdam, Elsevier, 1991. p.397-405.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphate of intact maize roots. J. Agric. Food Chem., 23:458-460, 1975.
- FARIA, G.E.; BARROS, N.F.; SILVA, I.R.; NOVAIS, R.F. & PAIVA, A.O. Carbono orgânico total e frações da matéria orgânica em diferentes distâncias da cepa de eucalipto. Cerne, 14:259-266, 2008.
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R. & HUBICK, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Molec. Biol., 40:503-537, 1989.
- FERNANDES, F.A.; CERRI, C.C. & FERNANDES, A.H.B.M. ^{13}C e a dinâmica do carbono orgânico do solo em pastagem cultivada no Pantanal Sul-Mato-Grossense. Corumbá, Embrapa Pantanal, 2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 74)
- GHASHGHAIE, J.; BADECK, F.; LANIGAN, G.; NOGUES, S.; TCHERKEZ, G.; DELEENS, E.; CORNIC, G. & GRIFFITHS, H. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C_3 plants. Phytochem. Rev., 2:145-161, 2003.
- GILLON, J.S.; BORLAND, A.M.; HARWOOD, K.G.; ROBERTS, A.; BROADMEADOW, M.S.J. & GRIFFITHS, H. Carbon isotope discrimination in terrestrial plants: Carboxylations and decarboxylations. In: GRIFFITHS, H., ed. Stable isotopes: Integration of biological, ecological and geochemical processes. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1998. p.111-132.

- GLEIXNER, G.; DANIER, H.J.; WERNER, R.A. & SCHMIDT, H.L. Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiol.* 102:1287-1290, 1993.
- GUERRA, J.G.M.; SANTOS, G.A.; SILVA, L.S. & CAMARGO, F.A.O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P. & CAMARGO, F. A. O., eds. 2.ed. Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, Metropole, 2008. p.19-26.
- HANSTEIN, S.M. & FELLE, H.H. CO_2 -triggered chloride release from guard cells in intact fava bean leaves. Kinetics of the onset of stomatal closure. *Plant Physiol.*, 130:940-950, 2002.
- HERRICK, J.D.; MAHERALI, H. & THOMAS, R.B. Reduced stomatal conductance in sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) sustained over long-term CO_2 enrichment. *New Phytol.*, 162:387-396, 2004.
- INADA, K. Action spectra for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell Physiol.*, 17:355-365, 1976.
- KELLEHER, B.P.; SIMPSON, M.J. & SIMPSON, A.J. Assessing the fate and transformation of plant residues in the terrestrial environment using HR-MAS NMR spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 70:4080-94, 2006.
- KELLEHER, B.P. & SIMPSON, A.J. Humic substances in soil: Are they really chemically distinct. *Environ. Sci. Technol.*, 40:4605-4611, 2006.
- KLUMPP, K.; SCHAUFELE, R.; LOTSCHER, M.; LATTANZI, F.A.; FENEIS, W. & SCHNYDER, H. C-isotope composition of CO_2 respired by shoots and roots: fractionation during dark respiration? *Plant, Cell Environ.*, 28:241-250, 2005.
- KÖGEL-KNABNER I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 34:139-62, 2002.
- KOZLOWSKI, T.T. & PALLARDY, S.G. Physiology of woody plants. 2.ed. San Diego, Academic Press, 1997. 411p.
- KRISTIANSEN, S.M.; BRANDT, M.; HANSEN, E.M.; MAGID, J. & CHRISTENSEN, B.T. ^{13}C signature of CO_2 evolved from incubated maize residues. *Soil Biol. Biochem.*, 36:99-105, 2004.

- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos, RiMA Artes e Textos, 2004. 531p.
- LEVITT, J. *Responses of plants to environmental stresses: Water, radiation, salt and other stresses*. New York, Academic Press, 1980. v.2. 607p.
- LIMA, A.M.N.; SILVA, I.R.; NEVES, J.C.L.; NOVAIS, R.B.; BARROS, N.F.; MENDONÇA, E.S.; DEMOLINARI, M.S.M. & LEITE, F.P. Frações da matéria orgânica do solo após três décadas de cultivo de eucalipto no Vale do Rio Doce-MG. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1053-1063, 2008.
- LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A. & ORT, D.R. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants FACE the future. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55:591-628, 2004.
- MAGALHÃES, A. Fotossíntese. In: FERRI, M., coord. *Fisiologia vegetal*. 2.ed. São Paulo, EPU, 1985. p.117-168.
- MARCELIS, L.F.M. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *J. Exper. Bot.*, 47:1281-1291, 1996.
- MENDHAM, D.S.; HEAGNEY, E.C.; CORBEELS, M.; O'CONNELL, A.M.; GROVE, T.S. & McMURTRIE, R.E. Soil particulate organic matter effects on nitrogen availability after afforestation with *Eucalyptus globulus*. *Soil Biol. Biochem.*, 36:1067-1074, 2004.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- NOGUÉS, S.; TCHERKEZ, G.; CORNIC, G. & GHASHGHAIE, J. Respiratory carbon metabolism following illumination in intact french bean leaves using $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope labelling. *Plant Physiol.*, 136:3245-3254, 2004.
- O'LEARY, M.H. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20:553-567, 1981.
- PALTA, J.A. & FILLERY, I.R. Using enriched ^{15}N and ^{13}C to study source-sink relationships of crop plants. In: UNKOVICH, M., ed. *Application of stable isotope techniques to study plant physiology, plant water uptake and nutrient cycling in terrestrial ecosystems*. Melbourne, Center for Legumes in Mediterranean Agriculture, 1999. p.149-157.

- PEGORARO, R.F. Sequestro de carbono e alterações bioquímicas da matéria orgânica de solos cultivados com eucalipto. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2007. (Tese de Doutorado)
- RASCHKE, K.; SHABAHANG, M. & WOLF, R. The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: Their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta*, 217:639-650, 2003.
- RATCLIFFE, R.G. & SHACHAR-HILL, Y. Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. *Plant J.*, 45:490-511, 2006.
- RAYMOND, C.A. Tree breeding issues for solid wood products. In: THE FUTURE OF EUCALYPTS FOR WOOD PRODUCTS, 2000, Launceston. Proceedings. Launceston, IUFRO, 2000. p.265-270.
- SCARTAZZA, A.; LAUTERI, M.; GUIDO, M.C. & BRUGNOLI, E. Carbon isotope discrimination in leaf and stem sugars, water use efficiency and mesophyll conductance during different developmental stages in rice subjected to drought. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25:489-498, 1998.
- SILVA, J.C.; MATOS, J.L.M.; OLIVEIRA, J.T.S. & EVANGELISTA, W.V. Influência da idade e da posição ao longo do tronco na madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. *R. Árvore*, 29:455-460, 2005.
- SIMPSON, A.J.; KINGERY, W.L. & HATCHER, P.G. The identification of plant derived structures in humic materials using three-dimensional NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 37:337-342, 2003.
- SMITH, B.N. & EPSTEIN, S. Two categories of ¹³C/¹²C ratios for higher plants. *Plant Physiol.*, 47:380-384, 1971.
- STEVENSON, F.J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. New York, John Wiley & Sons, 1994. 496p.
- STEWART, C.E.; PAUSTIAN, K.; CONANT, R.T.; PLANTE, A.F. & SIX, J. Soil carbon saturation: Implications for measurable carbon pool dynamics in long-term incubations. *Soil Biol. Biochem.*, 41:357-366, 2009.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed, 2004. 719p.

- TCHERKEZ, G.; NOGUES, S.; BLETON, J.; CORNIC, G.; BADECK, F. & GHASHGHAIE, J. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO₂ in French bean. *Plant Physiol.*, 131:237-244, 2003.
- TERWILLIGER, V.J. & HUANG, J. Heterotrophic whole plant tissues show more ¹³C enrichment than their carbon sources. *Phytochemistry*, 43:1183-1188, 1996.
- TISSUE, D.T.; GRIFFIN, K.L.; THOMAS, R.B. & STRAIN, B.R. Effects of low and elevated CO₂ on C₃ and C₄ annuals. II. Photosynthesis and leaf biochemistry. *Oecologia*, 101:21-28, 1995.
- VAN VUUREN, M.M.I.; ROBINSON, D. & SCRIMGEOUR, C.M. Decomposition of ¹³C-labelled wheat root systems following growth at different CO₂ concentrations. *Soil Biol. Biochem.*, 32:403-413, 2000.
- VITAL, M.H.F. Impacto ambiental de florestas de eucalipto. R. BNDES, 14:235-276, 2007.
- WEBB, A.A.R.; MCAINSH, M.R.; MANSFIELD, T.A. & HETHERINGTON, A.M. Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *Plant J.*, 9:297-304, 1996.
- WHELAN, T.; SACKETT, W.M. & BENEDICT, C.R. Carbon isotope discrimination in a plant possessing the C₄ dicarboxylic acid pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 41:1205-1210, 1970.