

ENRIQUECIMENTO E ALOCAÇÃO DE ^{13}C EM PLANTAS DE EUCALIPTO⁽¹⁾

Daniel Nolasco Machado⁽²⁾, Roberto Ferreira Novais^(3,6), Ivo Ribeiro da Silva^(3,6), Marcelo Ehlers Loureiro^(4,6), João José Milagres⁽⁵⁾ & Emanuelle Mercês Barros Soares⁽³⁾

RESUMO

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. Quando não existe essa possibilidade, 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 magnitude e a homogeneidade do enriquecimento em ^{13}C em diferentes componentes da planta de eucalipto. No processo de marcação, três plantas de eucalipto, com 4 meses de idade, cultivadas em solução nutritiva foram expostas a uma atmosfera enriquecida com $^{13}\text{CO}_2$, em uma câmara de vidro (448 dm³), com temperatura em torno de 24 °C. A concentração de CO_2 e a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ foram monitoradas 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 em IRMS. O resultado foi expresso em partes por mil (‰) em relação ao padrão internacional de C denominado Pee-Dee Belemnite (PDB), obtendo-se a $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ delas: 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 os componentes das plantas foi homogêneo, embora com diferenças numéricas da ordem de 291 ‰ na $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$. As plantas de eucalipto mantiveram alta taxa de absorção de CO_2 e, conseqüentemente, alta taxa fotossintética em concentrações de CO_2 muito acima (180,4 mmol L⁻¹ – 7.934 ppmv) da encontrada na atmosfera (8,64 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 .

⁽¹⁾ Recebido para publicação em maio de 2009 e aprovado em março de 2011.

⁽²⁾ Mestre em Solos e Nutrição de Plantas, Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Av. PH. Rolfs s/n, CEP 36570-000 Viçosa (MG). E-mail: dnoasco10@yahoo.com.br

⁽³⁾ Professor do Departamento de Solos, UFV. E-mails: rfnovais@ufv.br; ivosilva@ufv.br; emanuelle.soares@ufv.br

⁽⁴⁾ Professor do Departamento de Biologia Vegetal, UFV. E-mail: mehlers@ufv.br

⁽⁵⁾ Mestre em Solos e Nutrição de Plantas, Departamento de Solos, UFV. E-mail: jmilagres@ufv.br

⁽⁶⁾ Bolsistas do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

O grau de enriquecimento com ^{13}C obtido indica que a técnica empregada permite o enriquecimento suficiente do material para traçar o C em estudos de decomposição e estabilização de *litter* de eucalipto em frações da MOS.

Termos de indexação: plantas C_3 , plantas C_4 , matéria orgânica do solo, isótopo estável, marcação.

SUMMARY: ^{13}C ENRICHMENT AND ALLOCATION IN EUCALYPT PLANTS

In the last decades the use of stable isotopes has gained importance in several research areas, e.g., for metabolic flux and pathway analysis and studies on effects of biotic and abiotic plant stresses and on soil organic matter (SOM). Studies on the alterations and dynamics of SOM based on the variation in natural ^{13}C abundance require variations in the C isotopic composition, which are not always observed. One alternative is to label the plant material with ^{13}C by $^{13}\text{CO}_2$ fixation, so that the C isotope ratio is different from that of native SOM. The objective of this study was to investigate the magnitude and homogeneity of ^{13}C labeling in the different plant parts of eucalypts. Three 4-month-old eucalypt plants grown in nutrient solution were labeled, using a pulse technique. Plants were exposed to a $^{13}\text{CO}_2$ enriched atmosphere in a 448 dm³ glass chamber, at around 24 °C. The CO_2 concentration and the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio were monitored by gas sample analysis in an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) during the pulse-labeling period (126 days, three $^{13}\text{CO}_2$ pulses per week). After the labeling period the plants were separated in leaves (leaf-source and leaf-sink), branches, bark, stem, and roots and analyzed in an IRMS. The results were expressed in parts per one thousand (‰) relative to the Pee-Dee Belemnite standard ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$). The $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ 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 291 ‰ between plant parts were observed. The eucalypt plants maintained a high CO_2 absorption, and consequently photosynthetic rates well above the normal atmospheric CO_2 concentration (8.64 mmol L⁻¹ – 380 ppmv), even at high CO_2 concentrations (180.4 mmol L⁻¹ – 7.934 ppmv). The ^{13}C fixed during the day was proportionally less respired at night in comparison to ^{12}C . The degree of ^{13}C enrichment obtained indicates that the technique allows a sufficient plant enrichment to trace C in studies of litter decomposition and eucalypt litter stabilization in SOM fractions.

Index terms: C_3 plants, C_4 plants, soil organic matter, stable isotope, labelling.

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. Nesse 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).

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 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, eles 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 -8 ‰, e nas plantas, de -9 a -34 ‰ (Smith & Epstein, 1971). 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 é, em geral, resultado de propriedades bioquímicas das enzimas na fixação primária de CO_2 e de 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 , seguidas das plantas C_4 (Smith & Epstein, 1971).

Desse modo, o uso da abundância natural do ^{13}C para identificar a origem do C do solo pressupõe que sua MOS 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 requerem 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. Essa 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 C_3 , como em áreas onde naturalmente não ocorrem espécies do tipo C_4 , ou em áreas onde o cultivo do eucalipto ou de outra espécie C_3 já é de longa data, o uso da variação na abundância natural do ^{13}C para estudar a MOS é muito dificultado. Uma das alternativas nesses casos 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.

A marcação de plantas por meio da exposição ao $^{13}\text{CO}_2$ passou a ser utilizada na década de 1980, pois era difícil obter autorização para uso de ^{14}C , ambientalmente perigoso (Alves et al., 2008). Estudos das transformações da palhada de arroz no solo após ser submetida a manejos distintos foram feitos com material duplamente marcado com ^{13}C e ^{15}N ; o resíduo enriquecido que foi adicionado ao solo apresentava $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}$ de 543 ‰ (Bird et al., 2002, 2003).

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

Para estudos das transformações e da 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, esse 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 ^{13}C 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 taxa similar

de enriquecimento nos diferentes componentes 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 nos diferentes componentes da planta, esses autores concluíram que a marcação da biomassa vegetal com ^{13}C pode ser importante em estudos de dinâmica e monitoramento do C no solo. Moore-Kucera & Dick (2008) marcaram mudas da arbórea “Douglas-fir” (*Pseudotsuga menziesii*) com pulsos de $^{13}\text{CO}_2$ (99 %) por oito semanas em câmara fechada resultando em enriquecimento relativamente uniforme entre os componentes da planta, atingindo 1,57 atomo % de ^{13}C nas acículas, 1,45 nos galhos e 1,36 nas raízes. As plantas controle apresentaram 1.084 atomo% de ^{13}C . Esse enriquecimento foi suficiente para traçar o ^{13}C em frações da MOS após a incorporação do *litter* marcado no solo.

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 aumento 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 e casca, para se obter maior acúmulo de MOS. Esses componentes das plantas são constituídos 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 contribuírem substancialmente para a formação da MOS (Stevenson, 1994; Simpson et al., 2003; Kelleher et al., 2006), torna-se necessário 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 estão disponíveis sobre o método necessário para obter esse alto nível de marcação; particularmente no caso do eucalipto, não foram encontrados estudos com esse propósito.

A determinação e o melhor entendimento do enriquecimento e alocação de ^{13}C nos componentes das plantas podem auxiliar no estudo da dinâmica desses compostos das plantas no solo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a homogeneidade de enriquecimento e alocação de ^{13}C nos componentes 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 (5 mm) de 448 dm^3 (Figura 1), a qual 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 $340\ \mu\text{mol cm}^{-2}$ fótons; entre a lâmpada e a câmara, era mantida uma lâmina de água de 4 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 h do dia, o que foi feito com 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

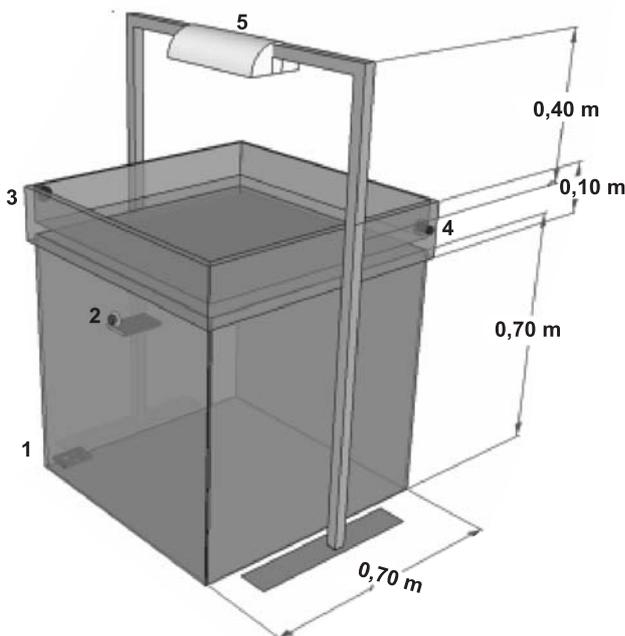


Figura 1. Representação esquemática da câmara usada na marcação das plantas. 1. Microcirculadores de ar; 2. Septo de borracha na lateral da câmara, para adição do ácido; 3 e 4. Entrada e saída de água; 5. Haste com lâmpada halógena.

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 30 a 60 min antes de iniciar os pulsos de $^{13}\text{CO}_2$, a fim de diminuir a concentração de CO_2 inicial da câmara de aproximadamente $13,64$ (600 ppmv) a $17,73\ \text{mmol L}^{-1}$ (780 ppmv) para $11,37\ \text{mmol L}^{-1}$ (500 ppmv). 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 10 mL de uma solução de $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ $0,18\ \text{mol L}^{-1}$, contendo 99 % em átomos de ^{13}C (Isotec Inc. Miamisburg, Ohio), com seringa cromatográfica, por meio do septo lateral, em um frasco com 50 mL de H_2SO_4 $3,8\ \text{mol L}^{-1}$. O CO_2 liberado 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; antes e após cada pulso foram coletadas amostras de ar da câmara. Uma hora após o quinto pulso, aproximadamente às 19 h do dia, a lâmpada foi desligada, iniciando-se o período escuro.

Doze horas após iniciado o período escuro, aproximadamente às 7 h do dia seguinte, foi coletada outra amostra de ar da câmara, e a lâmpada foi ligada novamente, deixando 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 % desse CO_2 fosse absorvido. Esse tempo variou de seis a dez horas, ao longo dos 126 dias. Com isso, parte do ^{13}C liberado na respiração noturna foi refixada. Após esse tempo, aproximadamente às 15 h do dia, as plantas eram retiradas da câmara de marcação e levadas para a casa de vegetação, permanecendo nesta até as 13 h do dia seguinte, quando eram trazidas de volta à câmara e reiniciada a marcação. Esse ciclo repetiu-se três vezes por semana durante 126 dias (18 semanas). As três plantas testemunha (sem marcação) foram mantidas na mesma casa de vegetação durante o período experimental.

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-se a variação na concentração de CO_2 e a composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) do CO_2 da câmara. Para essas amostras de ar, foi utilizado como referência o CO_2 atmosférico ($8,64\ \text{mmol L}^{-1} = 380\ \text{ppmv}$), determinado em amostras de 10 mL de ar do ambiente externo ao laboratório, sempre às 8 h da manhã, no início de cada semana.

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

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

em que R_{amostra} é a relação molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra analisada, e R_{PDB} , a relação molar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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, cujos fotoassimilados são exportados para outros órgãos da planta, como os tecidos meristemáticos e as folhas jovens/dreno ainda não completamente autotróficas) e folhas-dreno (folhas jovens que apresentavam até 20 % da área de uma folha-fonte completamente desenvolvida e com coloração verde-escuro) das plantas, para monitoramento da dinâmica do enriquecimento e posterior avaliação da eficiência deste. As folhas foram moídas, e o material resultante, 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-se a $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ delas.

Coleta e preparo das amostras de componentes 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 moído do tipo Wiley.

O resíduo moído dos componentes 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 $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.

Análise estatística

Os dados de enriquecimento de ^{13}C em cada componente 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 mmol L⁻¹ de CO₂ (Figura 2). Depois de uma hora na presença de luz, e a conseqüente absorção de CO₂ pelas plantas, a concentração diminuiu para 12,3 mmol L⁻¹ (absorção de 5,3 mmol L⁻¹). Nesse ponto foi efetuado o primeiro pulso, com uma solução de Na₂¹³CO₃ na câmara, elevando para 14,1 mmol L⁻¹ a concentração de CO₂. Daí em diante, a cada uma hora, era efetuado um pulso; antes e depois deste foram coletadas amostras de ar, para posterior análise. Ao longo do tempo de marcação foi observada absorção média de 3,8 mmol L⁻¹ h⁻¹ de CO₂ pelas plantas, com incremento médio de 1,7 mmol L⁻¹ por pulso.

Ao fim de seis horas (cinco pulsos) de marcação, a lâmpada foi desligada, quando na câmara havia 4,9 mmol L⁻¹ de CO₂. Após 12 h, a lâmpada foi novamente ligada; nesse momento, a concentração de CO₂ na câmara subiu para 180,4 mmol L⁻¹ (7.934 ppmv), resultante da elevada taxa respiratória noturna.

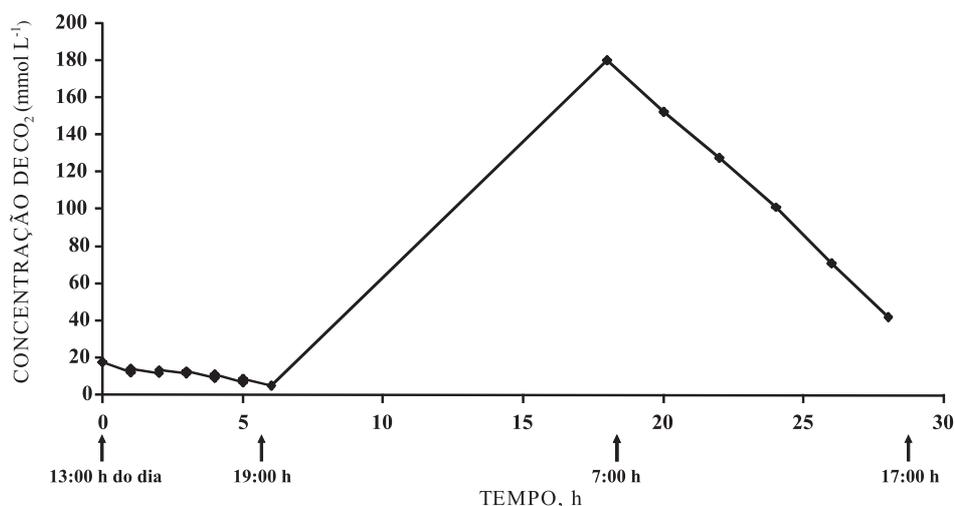


Figura 2. Concentrações de CO₂ na câmara ao longo do tempo de marcação. As setas pretas mostram a hora do dia ao longo do processo de marcação. Os pequenos picos sucessivos mostram o momento da adição do carbonato de sódio com 99 % em átomo de ^{13}C . Em detalhe, a modificação na escala para mostrar as diferenças de concentração de CO₂ antes e após cada pulso nas primeiras seis horas de marcação do dia.

Um resultado interessante foi o fato de as plantas absorverem CO_2 mesmo com este em alta concentração na câmara ($180,4 \text{ mmol L}^{-1}$). Quando a lâmpada foi ligada no dia posterior ao pulso de $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$, as plantas absorveram CO_2 a uma taxa de $13,9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, valor esse 3,6 vezes maior do que o observado durante o processo de marcação ($3,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), quando a câmara apresentava concentração de CO_2 de aproximadamente $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Esses resultados indicam que, mesmo sendo a concentração de CO_2 aumentada cerca de 20 vezes em comparação à concentração atmosférica, pode não ter havido fechamento estomático completo, de forma que o gradiente difusivo foi suficiente para suportar altas taxas fotossintéticas mesmo na presença de provável grande redução na abertura estomática, permitindo, ainda, aumento expressivo da concentração de CO_2 nos espaços intercelulares e no interior das células-guarda, como observado por outros autores (Herrick et al., 2004; Larcher, 2004). 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 CO_2 , embora a limitação estomatal decrescesse com o aumento da concentração de CO_2 . Esse resultado mostra que o aumento na taxa fotossintética com a elevada concentração de CO_2 mais que compensou a limitação difusional imposta pela redução da condutância estomática em alta concentração de CO_2 (Tissue et al., 1995).

A composição isotópica do CO_2 dentro câmara de marcação teve expressiva mudança ao longo do tempo, sempre aumentando após o pulso de $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ durante o período iluminado, mas diminuindo substancialmente durante a noite (Figura 3). Isso deve ter ocorrido como resultado das reações de descarboxilação da respiração, indicando que foi respirado muito mais ^{12}C do que ^{13}C pelas plantas (Gillon et al., 1999).

A maior respiração de ^{12}C durante a noite pelas plantas pode ser devido ao fato de que boa parte dos

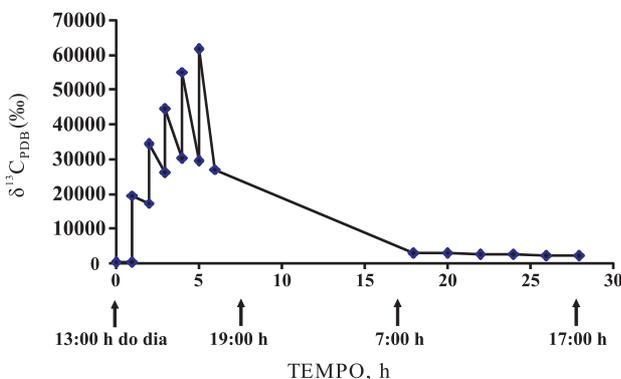


Figura 3. Evolução da composição isotópica do CO_2 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$) na câmara ao longo do tempo de marcação. As setas pretas mostram a hora do dia ao longo do processo de marcação.

substratos utilizados na respiração não sejam 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 ^{13}C . Se substratos respiratórios marcados tivessem sido utilizados em proporções semelhantes às dos não marcados, mesmo considerando a discriminação enzimática, não haveria redução tão pronunciada na concentração do isótopo mais pesado (^{13}C). Esse resultado corrobora o encontrado por Nogués et al. (2004), os quais observaram, em folhas de feijão marcadas com ^{13}C e ^{14}C , que amido e sacarose formados no dia anterior explicavam menos de 50 % do C perdido na forma de CO_2 na respiração noturna.

Segundo revisão de Badeck et al. (2005), vários autores relataram que, geralmente, durante a respiração noturna o CO_2 liberado é enriquecido com ^{13}C , comparativamente aos 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); 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 14h, não foram utilizados como substratos na respiração noturna.

Com 14 dias de marcação observou-se enriquecimento significativo das folhas-fonte e folhas-dreno das plantas; 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 4). A maior $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ nas folhas-dreno pode indicar 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 as folhas-dreno apresentaram o maior nível de enriquecimento; após esse período, as plantas começaram a apresentar sintomas de estresse abiótico (Levitt, 1980), 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 84º dia, quando o processo de marcação foi reiniciado, as folhas-fonte e dreno apresentavam

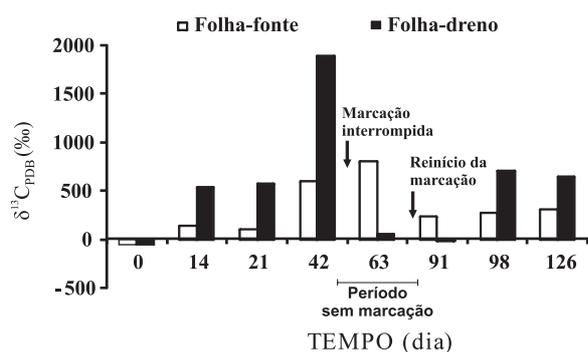


Figura 4. Médias de composição isotópica de ^{13}C de folhas-fonte e folhas-dreno ao longo do processo de marcação. As setas pretas indicam quando foi interrompido e reiniciado o processo de marcação.

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 (como o ^{12}C é o que domina na atmosfera não enriquecida da casa de vegetação, as folhas novas que cresceram nesse ambiente são mais pobres em ^{13}C , ou seja, $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ mais negativo); as reservas formadas com ^{13}C anteriormente também foram utilizadas durante o período em que permaneceram na casa de vegetação (diluindo o ^{13}C previamente fixado nas marcações), porém ainda mantendo-se um nível acima do normal desse isótopo durante o período de recuperação das plantas.

No 91º dia, as folhas-fonte apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ menores (233 ‰), provavelmente pelo fato de elas 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 menor valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.

No final do processo de marcação, no 126º 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 enri-

quecimento atingido até o 42º dia, podendo ser devido aos problemas surgidos no decorrer do processo, bem como ao mais avançado estágio de desenvolvimento das plantas, aliado à formação de novas estruturas e modificações na sua composição bioquímica (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).

Os resultados de enriquecimento das plantas com ^{13}C mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os componentes da planta (Quadro 1). Todavia, em trabalhos como os de Gleixner et al. (1993); Terwilliger & Huang (1996); Scartazza et al. (1998) e 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 componentes 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 outros componentes da planta de eucalipto (Quadro 1) de certo modo corrobora os resultados encontrados por Bird et al. (2003), os quais observaram que raízes de arroz tiveram menor enriquecimento (443 ‰), em comparação 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 ao 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 de menor enriquecimento e alocação de ^{13}C em lenho, folhas-fonte, galho e casca pode ser devido, indiretamente, ao maior crescimento desses componentes 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

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

Componente das plantas não marcadas	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$	Componente das plantas enriquecidas	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$
	‰		‰
Casca	-33,3 a	Casca	691,7 a
Galho	-33,3 a	Galho	672,5 a
Lenho	-32,8 a	Lenho	636,0 a
Raiz	-32,2 a	Raiz	536,6 a
Folha	-31,4 a	Folha-fonte	645,7 a
		Folha-dreno	828,1 a

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

(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 quatro horas 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 (Kozłowski & Pallardy, 1997; Taiz & Zeiger, 2004), conferindo maior teor desse isótopo nessas folhas.

As plantas não marcadas não apresentaram diferenças na composição isotópica entre seus componentes, com valores bem próximos (Quadro 1).

A $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ nos componentes 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. Contudo, 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 (Stevenson, 1994). 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 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, a 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.

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 de um sistema de fluxo para injeção e homogeneização do CO_2 . O sistema empregado no presente trabalho utiliza uma câmara simples de vidro, com um pequeno ventilador para homogeneização do CO_2 , sendo este monitorado pelo próprio espectrômetro de massas que é utilizado para análise do material vegetal.

CONCLUSÕES

1. O padrão de alocação e enriquecimento de ^{13}C entre os componentes das plantas de eucalipto foi

homogêneo, embora com diferenças numéricas máximas da ordem de 291 ‰ na $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.

2. As plantas de eucalipto mantiveram alta taxa de absorção de CO_2 e, conseqüentemente, alta taxa fotossintética em concentração de CO_2 muito acima (180,4 mmol L^{-1} – 7.934 ppmv) da encontrada na atmosfera (8,64 mmol L^{-1} – 380 ppmv).

3. O ^{13}C fixado durante o dia foi liberado em menor escala na respiração noturna, em comparação com o ^{12}C .

4. A técnica de marcação empregada mostrou-se relativamente simples e eficiente no enriquecimento das plantas de eucalipto com ^{13}C , porém apresenta como limitante, além do custo relativamente elevado do ^{13}C , a dificuldade de monitorar continuamente o ^{13}C da atmosfera da câmara. Melhorias poderão ser conseguidas no futuro com o uso de espectrômetros de *cavity ring down*, o que tornará possível monitorar em tempo real não apenas a concentração, mas também a razão isotópica do C na câmara.

LITERATURA CITADA

- 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. Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. 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.
- 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 cronossequência 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.
- 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 do solo no agrossistema de cana-de-açúcar. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 1986. (Tese de Doutorado)
- 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.
- 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. Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre, Metropole, 2008. p.19-26.
- 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.
- 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.
- KLUMPP, K.; SCHAUFLELE, 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.
- 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.
- 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.
- MOORE-KUCERA, J. & DICK, R.P. A pulse-chase method to ^{13}C -carbon-label Douglas-Fir seedlings for decomposition studies. *Soil Sci.*, 173:46-53, 2008.

- 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)
- 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. *Austr. 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 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 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 CO_2 in French bean. *Plant Physiol.*, 131:237-244, 2003.
- TERWILLIGER, V.J. & HUANG, J. Heterotrophic whole plant tissues show more ^{13}C 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 CO_2 on C_3 and C_4 annuals. II. Photosynthesis and leaf biochemistry. *Oecologia*, 101:21-28, 1995.
- van VUUREN, M.M.I.; ROBINSON, D. & SCRIMGEOUR, C.M. Decomposition of ^{13}C -labelled wheat root systems following growth at different CO_2 concentrations. *Soil Biol. Biochem.*, 32:403-413, 2000.
- VITAL, M.H.F. Impacto ambiental de florestas de eucalipto. *R. BNDES*, 14:235-276, 2007.