UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Efeitos do aquecimento e da elevada concentração atmosférica de CO₂ na
dinâmica de carbono e nitrogênio do solo e de duas forrageiras tropicais
(*Panicum maximum* e *Stylosanthes capitata*)**

LAÍS BATISTA CARMO SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
BIOLOGIA COMPARADA

RIBEIRÃO PRETO
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Efeitos do aquecimento e da elevada concentração atmosférica de CO₂ na
dinâmica de carbono e nitrogênio do solo e de duas forrageiras tropicais
(*Panicum maximum* e *Stylosanthes capitata*)**

VERSÃO CORRIGIDA

LAÍS BATISTA CARMO SILVA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez y Huaman

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
BIOLOGIA COMPARADA

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Laís Batista Carmo

Efeitos do aquecimento e da elevada concentração atmosférica de CO₂ na dinâmica de carbono e nitrogênio do solo e de duas forrageiras tropicais (*Panicum maximum* e *Stylosanthes capitata*). Ribeirão Preto, 2014.

126 p. .: il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Área de concentração:
Biologia Comparada; Botânica.

Orientador: Martinez y Huaman, Carlos Alberto

1. Aquecimento	2. CO ₂	3. Ciclo do C	4. Ciclo do N
5. Respiração do solo		6. Isótopos de C e N	

**“Imagination is more important than knowledge.
For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world,
stimulating progress, giving birth to evolution”
(Albert Einstein)**

Agradecimentos

Agradeço à FAPESP pela bolsa regular concedida (Processo n° FAPESP 2012/03439-0), pela bolsa de estágio no exterior BEPE (Processo FAPESP n° 2012/17755-1) e pelo apoio financeiro do Projeto Temático (Processo FAPESP n° 2008/58075-8);

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP/RP) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pela oportunidade de cursar o mestrado neste centro de pesquisa de excelência;

À Universidade de Illinois em Chicago, pela possibilidade única em cursar estágio em suas dependências e utilizar seus laboratórios, além dos momentos vivenciados em Chicago, das pessoas únicas que pude conhecer e conviver ao longo desses 4 inesquecíveis meses;

Ao Prof. Dr. Carlos Martinez, pela orientação ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Miquel Gonzalez-Meler (Pesquisador Visitante Especial CNPq Processo n° 400755/2013-0), pelo apoio profissional e motivação pessoal, agradeço não só sua prestatividade e orientação durante o estágio, mas também aos ensinamentos de vida que me transmitiu;

Aos Professores da UNESP-Jaboticabal, Dr. Newton La Scala Junior, pela ajuda oferecida e empréstimo do aparelho LI-8100A utilizado nos experimentos; e Dr. Wanderley José de Melo e técnicos, pelo suporte técnico em seu laboratório de análises enzimáticas do solo;

Aos Professores do Cena-USP, Dr. Plínio Barbosa de Camargo, Dr^a. Brigitte Josefine Feigl e técnicos, pelo treinamento realizado para aprendizado da metodologia isotópica;

Aos pesquisadores Bruce Kimball, Franco Miglietta, Alessandro Zaldei e Damiano Gianeli pelo auxílio na instalação dos sistemas FACE e T-FACE;

A todos que estiveram direta ou indiretamente envolvidos neste trabalho, desde o preparo do solo para plantio e da construção e implantação dos sistemas FACE e T-FACE até as análises experimentais realizadas e discussão de dados em grupo com todos os participantes do projeto temático;

A todos do Laboratório de Isótopos Estáveis da UIC, Charlie, Michelle, Doug, Jess, Kellen e Elena, que me receberam com muito carinho e paciência, me auxiliaram o quanto puderam e com os quais tive o prazer de partilhar aprendizados, almoços, laboratórios e reuniões, me proporcionando a visão global de outros aspectos da ciência;

Aos queridos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal da FFCLRP-USP que contribuíram não só para o meu trabalho, mas para todo meu desenvolvimento pessoal, com os quais pude compartilhar momentos de alegria, de frustração, de angústias e de muitas risadas e histórias que levarei comigo para sempre. À Andressa, por todo seu apoio diário e pela presença sempre certa nas “happy hours”, agradeço por ter não só como parceira de laboratório, mas pela amiga e companheira de viagens e aventuras que se tornou; à Daniele, por seus ensinamentos acadêmicos e científicos, e seu jeito único de reclamar, é grande a minha admiração por você como pessoa e cientista; à Letícia, por toda ajuda, risadas e convivência desde a graduação; ao Lucas, pelos momentos mais engraçados proporcionados até mesmo nos dias mais entediados; à Maria Teresa, por sua paciência e docilidade únicas, características únicas que espero ter absorvido um pouco; ao Matheus, pelo companheirismo durante todo esse tempo, foram tantas disciplinas, discussões e bobagens que construíram essa amizade verdadeira e admiração sem igual por você como pessoa e cientista; ao Eduardo, com quem tive o prazer, mas também a infelicidade de conviver apenas nos meus últimos meses, mas que foi incrivelmente suficiente para descobrir o amigo e profissional maravilhoso que é, obrigada por todos ensinamentos, e foram muitos. A todos desejo que o sucesso e a felicidade os acompanhem sempre;

Às amigas da graduação que tão facilmente viraram amigas para toda a vida. Camila Palma, Camila Devicaro, Maryna e Rafaella, a amizade de vocês talvez tenha sido o mais bonito fruto desses 4 anos de graduação, com certeza cultivarei nossa amizade com o maior carinho e sei que teremos muitos reencontros pela frente; à Damily, Geisa, Joana e Raquel,

obrigada pela amizade inesperada que, tão boa como surpreendente, pôde nos tornar ainda mais próximas, sei que a levaremos daqui para o resto da vida;

À minha família tão amada, pai, mãe e irmã. Lauro, Verenice e Laura, obrigada pela confiança em mim depositada e pelo apoio e amor incondicional ao longo de todo o mestrado. Sem tudo isto esta etapa dificilmente teria sido cumprida com sucesso. Às minhas amigas que desde sempre estiveram presentes em todo meu trajeto acadêmico mesmo que de longe, Marília, Helo, Deia, Lili, Isa e Marina, obrigada pela preocupação, pelo carinho e por sempre estarem ao meu lado, mesmo com a distância imposta todos esses anos;

Às amigas e familiares de Campinas e Muzambinho, os quais tiveram fundamental importância no meu desenvolvimento pessoal e sempre me apoiaram em todas minhas decisões e etapas de minha formação profissional.

RESUMO

A dinâmica do C e do N dentro do ecossistema engloba os processos fisiológicos que ocorrem na planta e no solo. Utilizando o sistema Trop-T-FACE no campus da USP de Ribeirão Preto, que combina os sistemas FACE (Free-air carbon dioxide enrichment) e T-FACE (Temperature free-air controlled enhancement), para enriquecimento e controle do CO₂ e da elevada temperatura (aquecimento), respectivamente, foram realizados dois experimentos com duas forrageiras tropicais, *Stylosanthes capitata* Vogel (leguminosa C₃) e *Panicum maximum* Jacq. (gramínea C₄). O primeiro experimento envolveu o aquecimento de 2°C no dossel de plantas *S. capitata* Vogel e resultou em uma intensificação do ciclo do N em curto prazo provavelmente devido à uma maior fixação biológica de N₂ pela leguminosa, além de maiores taxas respiratórias do solo e reduzidas taxas de atividade enzimática do solo. No segundo experimento, plantas de *S. capitata* e *P. maximum* foram submetidas a quatro tratamentos: controle, com condições de CO₂ e temperatura ambiente; aquecimento de 2°C e concentração de CO₂ ambiente (eT), temperatura ambiente e concentração de CO₂ elevada em 600 µmol mol⁻¹ (eC) e aquecimento de 2°C e concentração de CO₂ elevada em 600 µmol mol⁻¹ (eC+eT). Os resultados da respiração do solo indicaram um efeito do aquecimento sobre os processos biológicos do solo devido ao aumento das temperaturas do solo. Análises isotópicas das plantas mostraram, a partir do 3º dia de experimento, o decréscimo do δ¹³C em ambas espécies nos tratamentos com elevado CO₂ como consequência da incorporação do C novo assimilado. Quanto ao δ¹⁵N, este apresentou apenas valores positivos nas C₃, enquanto nas C₄ houve tanto valores negativos como positivos, mas ambos não indicaram um padrão muito claro quanto a diferenças entre tratamentos. Análises enzimáticas não revelaram alterações específicas no metabolismo do C no solo, mas foram encontradas alterações no metabolismo do N que indicam uma influência direta deste nutriente no potencial do solo em armazenar C.

Palavras-chave: mudanças climáticas, isótopos, carbono, nitrogênio, pastagem, respiração do solo, enzimas do solo.

ABSTRACT

The C and N dynamics may be interpreted as a flow within the ecosystem that encompasses the physiological processes that occur in plants and soil. In this study, we used of a new combined FACE and T-FACE system, to allow plants of *Stylosanthes capitata* Vogel (C₃) and *Panicum maximum* Jacq. (C₄) to be exposed to higher CO₂ concentrations and temperatures, respectively. The system named Trop-T-FACE was established at the Ribeirão Preto campus of the University of São Paulo (USP). Two experiments were conducted using this system; the first involved the warming of 2° C in the plant canopy of *Stylosanthes capitata* Vogel and resulted in an intensification of N short term cycle probably due to greater biological N₂ fixation by legumes, plus larger soil respiration rates and reduced rates of soil enzymatic activity. In the second experiment, plants of *S. capitata* and *P. maximum* were exposed to 4 treatments: a control (ambient temperature and ambient CO₂); **eT** (ambient CO₂ concentration and a canopy temperature of 2 °C greater than the ambient temperature), **eC** (600 μmol mol⁻¹ CO₂ and ambient temperature), and **eC + eT** (600 μmol mol⁻¹ CO₂ and a canopy temperature of 2 °C greater than the ambient temperature). Results from soil respiration indicated an effect of warming on soil respiration by effect of increment in soil temperature. Isotopic analysis showed, from the third day of the experiment, the decay of δ¹³C values in both species in the treatments with elevated CO₂ as a result of assimilation of the new C. Whereas δ¹⁵N showed only positive values in C₃, in C₄ we found negative and positive values, but both did not indicate a clear pattern among treatments. Enzymatic analyzes revealed no specific changes in C metabolism in the soil, but changes in N metabolism might indicate a direct influence of this nutrient in the potential of the soil to store C.

Keywords: climate change, isotope, carbon, nitrogen, pasture, soil respiration, soil enzymes.

TABELA DE FIGURAS

Figura 1. A: Dados obtidos das médias globais de frações molares de CO₂ obtidos a partir do Instituto de Oceanografia de Scripps (SIO) em Mauna Loa, Hawaii e Pólo Sul (vermelho) e das divisões globais de monitoramento NOAA/ESRL/GMD; B: Médias anuais globais da temperatura do ar na superfície terrestre e suas respectivas anomalias segundo quatro diferentes conjunto de dados (Berkeley, CRUTEM, GHCN e GISS). Gráficos modificados do relatório do IPCC de 2013.24

Figura 2. Ciclo do carbono e seus diversos componentes. Modificado de Buckeridge (2007).26

Figura 3. A respiração do solo, um dos principais processos que governam as transformações de carbono no solo, influencia no sequestro de carbono no solo e, consequentemente, no balanço global de carbono na superfície terrestre. Modificado de Bahn (2010).27

Figura 4. Ciclo do nitrogênio. Modificado de Buckeridge (2007).30

Figura 5. Ciclos do carbono e nitrogênio terrestres simulados pelo modelo O-CN, nos quais os números em preto representam os valores pré-industriais (1860s) e os números em cinza mostram as alterações provocadas pelas mudanças na concentração de CO₂, no clima, na deposição de N e aplicação de N fertilizante após os anos de 1990. Os estoques de C e N na vegetação e no solo são dados em Pg C e Tg N, respectivamente, e os valores em parênteses mostram as taxas anuais de aumento. Todos os fluxos são dados em Pg C ano⁻¹ or Tg N ano⁻¹ juntamente com o desvio padrão. NPP: produtividade primária líquida; Rh: respiração heterotrófica. Modelo modificado de Zafele et al., 2010.31

Figura 6. O aquecimento climático pode desencadear tanto um feedback negativo através da estimulação da mineralização de nutrientes, crescimento vegetal e sequestro de carbono como um *feedback* positivo via aumento da respiração do ecossistema liberando maiores quantidades de CO₂ na atmosfera. O processo de aclimação da respiração do solo ao

aquecimento pode ter um fraco efeito de *feedback* positivo através da ligação entre aquecimento, respiração e concentração atmosférica de CO₂. Modificado de Luo (2001)..... 35

Figura 7. Imagem via satélite da área experimental, circulada em preto (GOOGLE EARTH, 2014).47

Figura 8. Espécies utilizadas no estudo em consórcio, (A) *Stylosanthes capitata* Vogel e (B) *Panicum maximum* (Jacq) cv. Mombaça.....48

Figura 9. Vista da área experimental do Sistema Trop-T-FACE e suas respectivas parcelas experimentais e o contêiner para suporte técnico à direita ao fundo.....49

Figura 10. Aquecedor infravermelho de cerâmica do modelo FTE-750-240 (Mor Electric, USA) instalados em refletores de alumínio modelo Salamander ALEX (Mor Electric, USA).50

Figura 11. Termômetro infravermelho do modelo SI-1H1-L20 (Apogee Instruments, USA) instalado para monitorar a temperatura do dossel das plantas.50

Figura 12. Painel de energia elétrica da parcela aquecida, sendo todos painéis interligados à unidade central de controle e utilizados para o controle e distribuição da energia em cada parcela experimental.....51

Figura 13. Unidade central de controle e armazenamento de dados, que consiste de um datalogger CR1000, uma unidade de comunicação NL200 e um multiplexador AM 16/32. Todos são componentes fabricados pela Campbell Scientific (USA).51

Figura 14. Anéis de fumigação do sistema FACE combinado com os refletores de aquecimento do sistema T-FACE. A altura dos anéis e dos refletores pode ser ajustada acompanhando o crescimento das plantas. Na parte central a temperatura e a concentração de CO₂ são registradas por um termômetro e um sensor de CO₂ (IRGA) modelo GTM 220 (Vaisala, Finlândia), além de sensores de temperatura do solo e de umidade do solo (*ThetaProbe* ML-2X, Delta-T, UK) conectados a um *Datalogger* DL2 (Delta-T, UK).52

Figura 15. Tanque de CO₂ líquido de 12 toneladas instalado sobre uma base de concreto especialmente construída para suportar 30 toneladas. Observa-se a unidade vaporizadora conectada no lado direito do tanque. Por medidas de segurança a área do tanque foi cercada com malha e tem acesso restrito.52

Figura 16. Esquema do Sistema Trop-T-FACE mostrando a distribuição das parcelas experimentais e seus respectivos tratamentos de elevada concentração de CO₂, cujo controle provém dos sistemas FACE e de aquecimento do Sistema T-FACE no experimento instalado na USP/RP. Cada sistema foi controlado por programas específicos instalados em computadores individuais conectados a internet por fibra ótica localizados dentro de um container, especialmente adaptado para este fim. No sistema de CO₂, as parcelas com elevada concentração de CO₂ recebem alimentação de CO₂ puro a partir de um tanque criogênico de CO₂ de 12 toneladas. No sistema de aquecimento, cada parcela aquecida é controlada independentemente por meio de um painel elétrico conectado a sensores de temperatura e o datalogger central. A energia elétrica para o sistema T-FACE foi subministrada pela rede elétrica do *campus* da USP em Ribeirão Preto a partir de um transformador de 75 KVA.....54

Figura 17. Estação microclimática automática (WS-HP1) responsável pelo monitoramento e armazenamento de dados climáticos, como temperatura, umidade relativa, radiação e precipitação.....55

Figura 18. Aparelho utilizado na medição da respiração do solo (Automated Soil CO₂ system – LI-8100A).....56

Figura 19. Encapsulamento das amostras em cápsulas de estanho e armazenadas em microplacas, juntamente com o padrão Acetanilida e amostras em branco, após devidamente pesadas.....57

Figura 20. Analisador elementar (Elemental Analyzer Costech Analytical, ECS 4010, zero blank autosampler).58

Figura 21. Espectrômetro de massa (Isotope-Ratio Mass Spectrometer: continuous flow ThermoFinnigan Delta Plus XL equipped with Conflo III, Gas Bench II).58

Figura 22. Média das temperaturas do dossel registradas pelos termômetros infravermelhos em todas parcelas experimentais durante 30 dias (abril de 2013). 61

Figura 23. Caracterização da emissão de CO₂ do solo (A), temperatura (B) e umidade do solo (C), medidas em intervalos de 2 horas desde as 7 até às 21 horas. Cada ponto representa a média de 4 parcelas aleatórias ($\pm$ erro padrão). 63

Figura 24. Valores médios da emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **A:** Medições realizadas antes da aplicação do tratamento de aquecimento (PT) e 30 dias após o início do experimento (30-D) nas parcelas controle e aquecidas (eT). **B:** Medições realizadas durante o período experimental nos tratamentos controle e de aquecimento (eT) às 12 e 18 horas. Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p < 0,1$). 64

Figura 25. Valores médios da emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) às 12 horas (A) e 18 horas (B) nos tratamentos controle e de aquecimento (eT). As medições foram realizadas 6, 7 e 8 dias antes do experimento (números negativos) e nos três últimos dias de experimento (28°, 29° e 30° dia). 65

Figura 26. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade do solo (m^3m^{-3}) nos tratamentos controle e de aquecimento de 2°C (eT) às 12 e 18 horas antes e durante o experimento (A); e somente durante o experimento considerando as diferenças estatísticas entre tratamentos (B). Cada ponto representa a média ($\pm$ erro padrão) de cada tratamento naquele horário ($n=8$). Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p < 0,1$). 66

Figura 27. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a temperatura do solo ($^{\circ}\text{C}$) por dia e horário de medição. Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Não foi encontrada significância ($p > 0,1$). 68

Figura 28. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a umidade do solo (m^3m^{-3}) por dia e horário de medição. Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p < 0,1$). 69

Figura 29. Correlações entre a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade do solo (m^3m^{-3}) por dia e horário de medição. Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p < 0,1$).	70
Figura 30. Atividade máxima da enzima desidrogenase (g de trifenilformazan/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle e de aquecimento em $+2^{\circ}\text{C}$ (eT). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,1$).	71
Figura 31. Atividade máxima da enzima β -glicosidase (mg de p-nitrofenil/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle e de aquecimento em $+2^{\circ}\text{C}$ (eT). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,1$).	71
Figura 32. Atividade máxima da enzima urease (g de N- NH_4 /kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle e de aquecimento em $+2^{\circ}\text{C}$ (eT). Diferenças significativas são indicadas por asterisco ($p = 0,0598$).	72
Figura 33. Média das temperaturas do dossel registradas pelos termômetros infravermelhos em todas parcelas experimentais durante 17 dias do período experimental (01 a 17 de setembro de 2013).	82
Figura 34. Emissão de CO_2 do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nos tratamentos controle, de elevado CO_2 (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) nos dois horários ($n=4$). Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p < 0,1$).	83
Figura 35. Médias da emissão de CO_2 do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nos tratamentos controle, de elevado CO_2 (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) nos diferentes dias de medição ao longo de 25 dias em dois horários, 12 e 18 horas. Cada ponto representa a média ($\pm$ erro padrão) de cada tratamento naquele horário e tratamento ($n=4$). Diferenças significativas indicadas pelo valor $p < 0,1$ e valor F.	85
Figura 36. Médias da emissão de CO_2 do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nos tratamentos controle, de elevado CO_2 (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) ao longo de 25 dias, separadas por horário (12 e 18h). Cada ponto representa a média ($\pm$ erro padrão) de cada tratamento naquele dia e horário ($n=4$).	86

Figura 37. Médias da emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) ao longo do tempo com duas medições por dia (12 e 18h). Cada ponto representa a média ($\pm$ erro padrão) de cada tratamento naquele dia e horário (n=4). 87

Figura 38. Temperatura do solo ($^{\circ}\text{C}$) nos tratamentos controle, com elevado CO₂ (eC), com aquecimento de 2°C (eT) e com ambos (eC+eT) ao longo de 30 dias de experimento. .. 87

Figura 39. Média da temperatura do solo ($^{\circ}\text{C}$) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento de 2°C (eT) e ambos (eC+eT). Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p<0,1$). 88

Figura 40. Umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) nos tratamentos controle, com elevado CO₂ (eC), com aquecimento de 2°C (eT) e com ambos (eC+eT) ao longo dos 30 dias de experimento.. 88

Figura 41. Média da umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento de 2°C (eT) e ambos (eC+eT) registrada durante as medições de emissão de CO₂ do solo. Ausência de diferença estatística significativa ($p>0,1$). 89

Figura 42. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a temperatura do solo ($^{\circ}\text{C}$) por dia e horário de medição (15 $^{\circ}$, 22 $^{\circ}$ e 25 $^{\circ}$ dias de experimento). Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p<0,1$). 90

Figura 43. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) por dia e horário de medição (15 $^{\circ}$, 22 $^{\circ}$ e 25 $^{\circ}$ dias de experimento). Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p<0,1$). 91

Figura 44. Correlações entre a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) por dia e horário de medição (15 $^{\circ}$, 22 $^{\circ}$ e 25 $^{\circ}$ dias de experimento). Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Ausência de significância ($p>0,1$). 92

Figura 45. Atividade máxima da enzima β -glicosidase (mg de p-nitrofenil/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), elevado CO₂ (eC) e ambos (eT+eC). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,1$). 93

Figura 46. Atividade máxima da enzima desidrogenase (g de trifetilformazan/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle, aquecimento em 2°C (eT), elevado CO₂ (eC) e ambos (eT+eC). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,1$). 94

Figura 47. Atividade máxima da enzima urease (g de N-NH₄/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), elevado CO₂ (eC) e ambos (eT+eC). Diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas por letras minúsculas diferentes ($F_{Tp} = 0,0425$). 94

Figura 48 . Teores de C e N expressos em porcentagem (%) em amostras de folha de *S. capitata* e *P. maximum* nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), de elevado CO₂ (eC) e de aquecimento e elevado CO₂ (eC+eT) durante a primeira semana de experimento. A partir do dia zero, as coletas foram de seis em seis horas nos primeiros três dias, depois de doze em doze horas nos próximos quatro dias e por fim de dois em dois dias até o final do experimento. Cada círculo representa a média de cada tratamento naquele período (n=4). Em *P. maximum*, houve diferença significativa no teor de C ($F_{CO_2} p = 0,434$ e $F_T p = 0,439$) e em *S. capitata*, no teor de N ($F_{CO_2} p = 7,10^{-11}$ e $F_T p = 7,86^{-10}$). 95

Figura 49. Composição isotópica de C e N em amostras de folha de *S. capitata* e *P. maximum* nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), de elevado CO₂ (eC) e de aquecimento e elevado CO₂ (eC+eT) durante a primeira semana de experimento. A partir do dia zero, as coletas foram de seis em seis horas nos primeiros três dias, depois de doze em doze horas nos próximos quatro dias e por fim de dois em dois dias até o final do experimento. Cada círculo representa a média de cada tratamento naquele período (n=4). Em *P. maximum* houve diferença estatística significativa quanto ao $\delta^{13}C$ ($F_{CO_2} p = 2^{-16}$), assim como em *S. capitata* ($F_{CO_2} p = 2^{-16}$). 96

Figura 50. Gráfico que representa a resposta de emissão de CO₂ em relação aos dois níveis dos fatores temperatura (T) e CO₂ (C), sendo amb=ambiente e e=elevado (F_{CO2xT} p = 0,248).

.....97

Figura 51. Gráficos que representam a atividade enzimática do solo de β-glicosidase (F_{CO2xT} p = 0,379), desidrogenase (F_{CO2xT} p = 0,632) e urease (F_{CO2xT} p = 0,792) em relação aos dois níveis de temperatura (T) e CO₂ (C), sendo amb=ambiente e e=elevado.98

Figura 52. Gráficos que representam a resposta das variáveis relacionadas ao C e N em relação aos dois níveis dos fatores temperatura (T) e CO₂ (C), sendo amb=ambiente e e=elevado, nos parâmetros δ¹³C em folhas de *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,844) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,163), δ¹⁵N em *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,719) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,191), %C em *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,196) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,028) e %N em *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,153) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,143).O gráfico em função do valor do δ¹⁵N de *P. maximum* não mostrou a reta com linha contínua pela falta de padrão dos valores nos diferentes tratamentos..... 100

Figura 53. Esquema demonstrativo dos possíveis efeitos das mudanças climáticas futuras de acordo com os resultados obtidos nos experimentos I e II. O aquecimento climático e a elevada concentração de CO₂ podem desencadear tanto um *feedback* positivo reduzindo o sequestro de C em longo prazo por meio da estimulação da respiração do solo e crescimento vegetal com limitação de N, como um *feedback* negativo via aumento da disponibilidade de N por meio da fixação biológica. 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

C	Carbono
N	Nitrogênio
Ci	Concentração de CO ₂ intercelular
Ca	Concentração de CO ₂ atmosférica
IRGA	<i>Infrared gas analyser</i>
eC	Tratamento com temperatura ambiente e CO ₂ elevado (600 μmol mol ⁻¹)
eC+eT	Tratamento com aquecimento (+2°C) e CO ₂ elevado (600 μmol mol ⁻¹)
eT	Tratamento com aquecimento (+2°C) e CO ₂ ambiente
FACE	<i>Free Air CO₂ Enrichment</i> (enriquecimento de CO ₂ ao ar livre)
T-FACE	<i>Temperature-Free Air Controlled Enhancement</i> (aumento controlado da temperatura em ambiente aberto)
δ	Notação delta que representa a composição isotópica
R	Razão entre o isótopo leve e o pesado
‰	Partes por mil
%	porcentagem
cm	centímetro
m	metro
g	grama
kg	quilo
μmol	micromol
s	segundo
h	hora
°C	Graus Celsius
¹²C	Isótopo estável de carbono (número de massa = 12)
¹³C	Isótopo estável de carbono (número de massa = 13)
¹⁴N	Isótopo estável de nitrogênio (número de massa = 14)
¹⁵N	Isótopo estável de nitrogênio (número de massa = 15)
E_s	Emissão de CO ₂ do solo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1.1.1. Mudanças climáticas globais.....	24
1.1.2. Ciclo do carbono (C).....	25
1.1.2.1. Respiração do solo.....	26
1.1.3. Ciclo do Nitrogênio (N)	30
1.1.4. Atividade enzimática do solo	32
1.1.5. Efeitos do aquecimento e da elevada concentração de CO ₂ em plantas	34
1.1.6. Isótopos estáveis	36
2. HIPÓTESES	41
3. JUSTIFICATIVA	43
4. OBJETIVOS	45
4.1. Objetivos Gerais	45
4.2. Objetivos Específicos	45
5. MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1. Localização geográfica e caracterização da área	47
5.2. Material vegetal e cultivo	48
5.3. Sistemas experimentais.....	49
5.4. Delineamento Experimental	53
5.5. Monitoramento Microclimático.....	54
5.6. Emissão de CO ₂ do solo	55
5.7. Atividade enzimática do solo	56

5.8. Análises isotópicas	57
5.9. Análise estatística de dados	59
6.1. RESULTADOS (Experimento I)	61
6.1.1. Caracterização da emissão de CO ₂ , temperatura e umidade do solo	61
6.1.2. Análise enzimática do solo	70
6.1.3. Análise isotópica de C e N	72
6.2. DISCUSSÃO (Experimento I)	75
6.3. CONCLUSÃO (Experimento I)	80
7. RESULTADOS (Experimento II)	82
7.1.1. Emissão de CO ₂ , temperatura e umidade do solo	82
7.1.2. Relações entre a emissão de CO ₂ , a temperatura e a umidade do solo	89
7.1.3. Análise enzimática do solo	92
7.1.4. Análise isotópica de C e N	94
7.1.5. Interação dos fatores CO ₂ e temperatura	97
7.2. DISCUSSÃO (Experimento II)	102
7.3. CONCLUSÃO (Experimento II)	110
8. CONCLUSÃO GERAL	112
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas atuais estão alterando diversos padrões climáticos e, por isso, se analisadas em um panorama futuro, profundas modificações nos ecossistemas de todo o planeta serão observadas. Como as pastagens constituem um dos mais importantes e complexos ecossistemas terrestres para o ciclo do carbono, não só por ser a forma mais ampla do uso do solo, mas também por conter mais de 10% do carbono armazenado na biosfera, é de esperar que haja alterações significativas tanto no ciclo do carbono (C) como no ciclo do nitrogênio (N).

A revisão bibliográfica deste trabalho trata sobre as atuais afirmações encontradas na literatura a respeito da mudança climática global, sobre os ciclos do C e N e como estes interagem entre si, a importância dos processos no solo referente ao armazenamento e à emissão de carbono para a atmosfera, explanando o porquê do uso de isótopos estáveis ser cada vez mais difundido em tais análises ambientais.

Com o objetivo de compreender melhor como os ciclos do C e N podem ser afetados por altas temperaturas e concentrações atmosféricas de CO₂ mais elevadas, foram realizados dois experimentos em campo no intuito de revelar a resposta das plantas e do seu meio frente à condições ambientais que simulassem condições reais de aquecimento e enriquecimento em CO₂ do ar atmosférico no futuro.

Após a descrição da metodologia e dos materiais empregados em ambos os experimentos, como o funcionamento de um sistema pioneiro implantado nas localidades da USP de Ribeirão Preto (Trop-T-FACE), os resultados fornecem uma visão objetiva dos dados obtidos, e, juntamente com as informações encontradas na literatura, enriquecem a discussão deste trabalho na tentativa de compreender os efeitos da temperatura e do CO₂ nos processos fisiológicos realizados pela planta, bem como aqueles que ocorrem no solo pela ação de microrganismos. Por fim, a conclusão busca integrar os principais pontos que foram discutidos em ambos os experimentos, relacionados ao modo como o C do solo em pastagens pode ser influenciado pelo ciclo do N, e este, alterado pelos fatores ambientais que foram experimentalmente manipulados: temperatura e CO₂.

Este projeto está vinculado a um Projeto Temático da FAPESP dentro do Programa de Pesquisa sobre Mudanças Climáticas Globais (Processo nº 2008/58075-8), o qual se denomina “Experimento miniFACE para analisar os efeitos do elevado CO₂ e do aquecimento sobre a fotossíntese, expressão gênica, bioquímica, crescimento, dinâmica de nutrientes e

produtividade de duas espécies forrageiras tropicais contrastantes” sob coordenação do Prof. Carlos Alberto Martínez y Huamán.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Mudanças climáticas globais

As concentrações atmosféricas globais dos chamados gases de efeito estufa (GEE), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O), aumentaram significativamente em consequência das atividades humanas e atualmente ultrapassam em muito os valores pré-industriais. Os aumentos globais da concentração de CO_2 se devem principalmente ao uso de combustíveis fósseis e à mudança no uso da terra, enquanto os aumentos da concentração de CH_4 e N_2O são devidos principalmente à agricultura (IPCC, 2007).

Segundo dados do IPCC (2007), a concentração atmosférica global do CO_2 aumentou de um valor pré-industrial de cerca de 280 ppm para 380 ppm em 2005 (Figura 1A). Atualmente, a concentração atmosférica de CO_2 já superou a faixa de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e a taxa de aumento desse gás é maior que $2,5 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ao ano (IPCC, 2007; CO_2now , 2014). Estimativas indicam que, futuramente, se a liberação de GEEs permanecer neste ritmo acelerado, somando-se à inexistência de ações antrópicas que evitem a poluição atmosférica, a concentração atmosférica do CO_2 continuará aumentando até valores acima de $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ por volta do ano de 2100 (Towsend et al., 2006).

A maior liberação destes gases influencia diretamente a temperatura média do planeta, uma vez que GEEs como o CO_2 absorvem radiação infravermelha, contribuindo assim para o aquecimento do ar e a elevação de temperatura média da Terra em ritmo cada vez mais acelerado (Figura 1B) (Ricklefs, 2003; Towsend et al., 2006; Buckeridge, 2007).

Figura 1. A: Dados obtidos das médias globais de frações molares de CO_2 obtidos a partir do Instituto de Oceanografia de Scripps (SIO) em Mauna Loa, Hawaii e Pólo Sul (vermelho) e das divisões globais de monitoramento NOAA/ESRL/GMD; B: Médias anuais globais da temperatura do ar na

superfície terrestre e suas respectivas anomalias segundo quatro diferentes conjunto de dados (Berkeley, CRUTEM, GHCN e GISS). Gráficos modificados do relatório do IPCC de 2013.

As elevadas temperaturas provocadas por este efeito podem acarretar em diversas consequências na composição de espécies vegetais, sejam biomas preservados ou culturas agrícolas. As plantas podem ajudar a entender o que pode acontecer com a biodiversidade em nosso planeta, uma vez que a sua principal fonte de C é o CO₂, com o qual elas realizam o processo fotossintético. Os efeitos no ecossistema seriam recorrentes à medida que, a elevada concentração de CO₂ e o aquecimento médio da Terra, possivelmente provoque alterações no meio ambiente, como na disponibilidade de água e nutrientes, modificando a composição da estrutura vegetal e assim da biodiversidade global (Buckeridge, 2007).

Além da liberação de CO₂ devido às ações antrópicas, a quantidade do gás na atmosfera resulta também do balanço entre processos bioquímicos que o liberam e o retiram da atmosfera de forma natural, a partir de processos como a respiração de plantas e animais. Uma considerável parte do C que é recapturado da atmosfera se deve ao processo fotossintético realizado pelos vegetais, principal mecanismo de sequestro de carbono atmosférico, processo esse que, dentre muitos outros, justifica a enorme importância dada na conservação e preservação da vegetação na manutenção do ciclo do C (Ricklefs, 2003).

1.1.2. Ciclo do carbono (C)

Os quatro compartimentos de C na Terra são: oceanos, atmosfera, formações geológicas contendo C fóssil e mineral e ecossistemas terrestres (biota e solo) (Figura 2). O compartimento de C no solo é o maior nos ecossistemas terrestres, sendo constituído pelo C orgânico e mineral. O C pode ficar retido no solo devido a diversos processos, como a humificação, a agregação e a sedimentação, enquanto os processos responsáveis pelas perdas de C no solo são: a erosão, decomposição, volatilização e lixiviação. Dessa forma, a quantidade de C em cada compartimento está associada à sua interação com a biosfera, assim como o C do solo derivado de processos biológicos como a fotossíntese deriva a maioria do C presente no solo e o C utilizado pelas plantas é retornado à atmosfera pelo processo de respiração biológica (Machado, 2005).

Figura 2. Ciclo do carbono e seus diversos componentes. Modificado de Buckeridge (2007).

As reações de decomposição da matéria orgânica são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes para as plantas nos ecossistemas naturais e nos agroecossistemas manejados e não fertilizados (Bonde et al., 1992). A decomposição representa uma das atividades na qual a biomassa microbiana está envolvida, englobando de 2 a 3% do C na forma orgânica. Os microrganismos do solo regulam a maior parte das reações que ocorrem no ciclo do C no solo, por meio de processos como a respiração do solo (Pulrolnik, 2009). Como o foco do presente trabalho corresponde ao ciclo do C, uma vez assimilado e liberado pelo solo, é de suma importância entender como se dá o fluxo de saída de C do sistema por meio da respiração do solo.

1.1.2.1. Respiração do solo

Embora o fluxo de C seja bastante representativo no processo foliar de fixação (fotossíntese), a quantidade de C no solo representa mais de dois terços do total de C presente nos ecossistemas terrestres (Lin et al., 1999). O C do solo retorna à atmosfera pelo processo de respiração do solo, o qual representa um dos maiores fluxos de C no ecossistema terrestre, equivalente a aproximadamente 10% do C presente na atmosfera e até 10 vezes mais em relação ao fluxo de C proveniente da emissão de gases derivados de combustíveis fósseis (Taneva et al., 2006; Atarashi-Andon et al., 2012). Além disso, as transformações de C que ocorrem no solo são bem mais lentas do que na atmosfera, havendo, portanto, uma influência significativa dos processos do C no solo, e consequentemente da concentração atmosférica de CO₂, no sequestro de C e no aquecimento global. Assim, alterações ambientais que afetem a dinâmica de C no solo podem resultar em uma mitigação do aumento do CO₂ atmosférico

associada à promoção do armazenamento de C no solo, mas podem também exacerbar o aquecimento caso haja um declínio no conteúdo de C do solo e maior liberação de CO₂ para a atmosfera (Hungate et al., 2009).

A respiração do solo é dividida em respiração heterotrófica (microrganismos do solo) e autotrófica (raízes de plantas) (Figura 3). Essas fontes de CO₂ respondem diferentemente às variações ambientais, como alterações na temperatura e precipitação, sendo importante estimar a sua resposta individual à cada fator e à combinação de vários fatores. Sendo assim, até mesmo pequenas flutuações na respiração do solo devido à estes fatores podem alterar significativamente as concentrações de CO₂ atmosférico, ou seja, o solo adquire um potencial significativo na concentração de CO₂ atmosférico global (Atarashi-Andon et al., 2012).

Figura 3. A respiração do solo, um dos principais processos que governam as transformações de carbono no solo, influencia no sequestro de carbono no solo e, consequentemente, no balanço global de carbono na superfície terrestre. Modificado de Bahn (2010).

Considerando a grande variabilidade de fatores ambientais que influenciam os complexos processos e reações que ocorrem no ecossistema, o sistema subterrâneo é de fato mais difícil de ser avaliado do que a parte aérea que corresponde às folhas e caules da vegetação (Atarashi-Andon et al., 2012). Em ecossistemas de floresta, por exemplo, uma grande parte da produção primária bruta é alocada no sistema subterrâneo e cerca de 60% da produção primária líquida do solo é usada para respiração das raízes, contribuindo para a emissão de CO₂ do solo juntamente com uma proporção determinada por fontes heterotróficas (Grossiord et al., 2012).

De modo geral, a quantidade de CO₂ liberada é normalmente usada como indicadora da atividade heterotrófica e do processo de decomposição dos resíduos e da matéria orgânica do solo, dado que a emissão de CO₂ normalmente é considerada como o resultado final do metabolismo energético dos microrganismos. Geralmente admite-se que a taxa na qual o C é metabolizado durante a oxidação de compostos orgânicos é proporcional à biomassa de microrganismos do solo que participam destas reações (Tate, 2000; Pulrolnik, 2009). Assim, este processo corresponde à atividade geral da biomassa microbiana influenciada pelo clima, pelas propriedades bioquímicas e físicas do solo e pela cobertura vegetal, e a velocidade na qual ocorre depende da atuação seletiva dos microrganismos em diferentes substratos, sendo maior quando são substratos mais lábeis e fáceis de serem decompostos e menor quando são mais estáveis à decomposição (Mendes et al., 2009).

Alguma variabilidade presente nos fluxos de CO₂ também se deve a períodos e técnicas de medição. Os resultados refletem o impacto biológico nas taxas de emissão de CO₂ (E_s), sendo estes resultados diferentes nos mais diversos ecossistemas. Altas taxas de CO₂ normalmente estão associadas com uma produção primária líquida elevada como a encontrada em ambientes tropicais úmidos, enquanto baixas taxas são observadas em ecossistemas de regiões mais frias (Kim & Verma, 1992).

A distribuição do C fixado, bem como a liberação do CO₂ para a atmosfera depende de muitas variáveis como o tipo de clima, vegetação, relevo e o tipo de manejo do solo (La Scala et al., 2006; Britto et al., 2009). Esta grande variação mostra que a E_s pode ser influenciada tanto pelas mudanças na fisiologia da planta como pelos processos no sistema subterrâneo. Alterações nas taxas de decomposição da matéria orgânica no solo (Kuzyakov & Domanski, 2000) e os complexos efeitos interativos entre os componentes da respiração do solo podem atuar em diferentes escalas temporais, em curto ou em longo prazo (Taneva & Gonzalez-Meler, 2011).

Uma vez que a E_s reflete a atividade metabólica de microrganismos, plantas e animais (Mendes et al., 2009), o aquecimento global pode influenciar o funcionamento do ecossistema e isso pode ser verificado na E_s. A perda excessiva de C do solo para a atmosfera pode transformar o solo em uma fonte de CO₂ ao invés de sumidouro. O ponto de transformação de fonte para sumidouro é dependente da sensibilidade da respiração microbiana em longo prazo (Melillo et al., 2011). Isso porque, além da cobertura vegetal, os processos do C no solo são resultado da ação de microrganismos envolvidos em diversos processos como decomposição, ciclagem de nutrientes, transformações bioquímicas como nitrificação, desnitrificação,

fixação biológica de N e outros. Dessa forma, o C do solo está sujeito à ação da fauna microbiana, a qual pode ter sua biomassa composta de microrganismos produtores primários, decompositores ou armazenadores de C (Commission, 2010).

Essas alterações em curto prazo no solo envolvem o processo denominado efeito *priming*, no qual as taxas de decomposição do solo orgânico e substâncias minerais no solo tendem a ser estimuladas. Neste processo, as raízes têm sido apontadas tanto como estimuladoras (pela quebra dos agregados do solo devido ao seu crescimento e estimulação da microfauna da rizosfera pela exsudação) quanto como inibidoras (pela competição entre as raízes e a microfauna da rizosfera por substratos) (Kuzyakov & Cheng, 2001; Carrillo et al., 2011). A magnitude do efeito *priming* determina se mudanças no fluxo de C no solo, em resposta às variáveis ambientais, poderão alterar a capacidade de armazenamento de C (Chapin et al., 2009).

Como outro fator relevante para a predição de mudanças futuras nos ecossistemas se refere à composição vegetal, estudos têm mostrado o desempenho de áreas de pastagem quanto à manutenção do C armazenado no solo. Há indicações que as pastagens possam atuar como sumidouros de CO₂, provocando um aumento dos estoques de C orgânico no solo e reduzindo a quantidade de CO₂ atmosférico (Roscoe et al., 2006; Mendes et al., 2008; Pulrolnik, 2009). Dessa forma, dependendo do uso e manejo, o solo pode atuar como uma fonte de CO₂ para a atmosfera, ou como sumidouro, pelo acúmulo de C como matéria orgânica do solo (IPCC, 2001; Melillo et al., 2011).

No entanto, estudos recentes sugerem que o esperado aumento na E_s pode não persistir se a temperatura continuar a aumentar. Em um experimento de longa duração (10 anos), Melillo et al. (2011) mostraram um aumento de 28% na E_s nos primeiros seis anos de aquecimento, quando comparado aos solos do tratamento controle, seguidos por decréscimos consideráveis de CO₂ liberado nos anos subsequentes. Contudo, os processos microbiológicos específicos que causam esta resposta ao aquecimento global ainda não foram bem elucidados. Isso porque, além de uma série de reações e mecanismos complexos que envolvem as interações entre solo, microrganismos e plantas no ciclo do C, há também que se considerar os impactos de altas concentrações de CO₂ e do aquecimento na disponibilidade de N, cujo ciclo é totalmente integrado ao ciclo do C (Pataki et al., 2003; Van Groenigen et al., 2003; Amendolara, 2011).

1.1.3. Ciclo do Nitrogênio (N)

Uma vez que os processos do ciclo do C interferem diretamente nos processos do ciclo do N, e o contrário também ocorre, os ciclos do C e do N são integralmente dependentes entre si, sendo o N um dos maiores limitantes da produção primária. Dessa forma, o efeito do enriquecimento de CO₂ nos estoques de C do solo depende da disponibilidade de N, uma vez que altas taxas de crescimento vegetal podem ser sustentadas apenas com o aumento da eficiência do uso do N ou o aumento de sua absorção. O aumento da absorção de N pode resultar de uma maior absorção de N mineral existente no solo, de um aumento nas taxas de mineralização, e/ou de um aumento na fixação por organismos simbióticos ou de vida livre, tornando o N atmosférico disponível para utilização das plantas na sua forma inorgânica (Figura 4). Assim, com uma alta fertilização de N, a resposta do C em relação à adição de C ao solo superaria a respiração microbiológica, favorecendo o acúmulo de C no solo (Pataki et al., 2003; Luo et al., 2004; Chapin et al., 2009).

Figura 4. Ciclo do nitrogênio. Modificado de Buckeridge (2007).

Apesar de haver boas evidências de que a produtividade dos ecossistemas terrestres e armazenamento de C respondem positivamente ao aumento da concentração atmosférica de CO₂, é esperado que possíveis *feedbacks* no ciclo do N possam restringir fortemente essa produtividade no futuro. Reciprocamente, o aumento da degradação bacteriana da matéria

orgânica resultante de altas temperaturas pode, ao reduzir o teor de C do solo pelo aumento da respiração heterotrófica, aumentar a mineralização do N e assim, favorecer a produtividade da planta e o armazenamento de C nos ecossistemas terrestres.

A relação C/N, derivada de diversos processos biológicos (incluindo as ações antropogênicas desde a era industrial) (Figura 5), é importante para compreender a dinâmica e interdependência dos elementos C e N no ambiente. Quando esta relação é muito alta, há a indicação de que o material dificilmente é aproveitado pela atividade microbiana quando nenhuma fonte de N está disponível (Larcher, 2006). Dependendo das condições ambientais, a relação C/N do solo pode aumentar pelos teores de C e N do solo estarem intimamente relacionados aos processos fisiológicos realizados pelas plantas (Chen, 2006).

Figura 5. Ciclos do carbono e nitrogênio terrestres simulados pelo modelo O-CN, nos quais os números em preto representam os valores pré-industriais (1860s) e os números em cinza mostram as alterações provocadas pelas mudanças na concentração de CO₂, no clima, na deposição de N e aplicação de N fertilizante após os anos de 1990. Os estoques de C e N na vegetação e no solo são dados em Pg C e Tg N, respectivamente, e os valores em parênteses mostram as taxas anuais de aumento. Todos os fluxos são dados em Pg C ano⁻¹ or Tg N ano⁻¹ juntamente com o desvio padrão. NPP: produtividade primária líquida; Rh: respiração heterotrófica. Modelo modificado de Zahele et al., 2010.

Além da cobertura vegetal, a comunidade microbiana, composta por bactérias e fungos do solo, desempenha papéis centrais em vários ciclos biogeoquímicos, sendo responsáveis pela ciclagem de compostos de C e N. Os microrganismos do solo, considerados indicadores ecológicos sensíveis à degradação do solo (Turco et al., 1994; Mendes et al., 2012), podem responder de diferentes formas em relação à abundância e formas de N no solo.

As bactérias e fungos abrangem mais de 90% da biomassa microbiana do solo e sua atividade e funções dependem de condições ambientais (clima, propriedades químicas e físicas do solo e vegetação) e da quantidade e qualidade do substrato (Djukic et al., 2013).

Esses microrganismos influenciam os ecossistemas subterrâneos, além da estrutura e fertilidade do solo, contribuindo para a nutrição e crescimento da planta. Justamente por atuarem como importantes determinantes da diversidade da comunidade de plantas e da produtividade, eles influenciam diretamente no teor de N do solo e na qualidade e quantidade de entrada de C no solo (Bardgett et al., 2008).

Desde os tempos pré-industriais, os ciclos de C e N têm sofrido alterações em suas diferentes interações no ecossistema. Qualquer atividade antropogênica, como a poluição ou a mudança no uso da terra, que afete a fauna microbiana do solo pode alterar sua atividade e diversidade, acarretando em sérias consequências para os ecossistemas terrestres (Kirk et al., 2004).

Sendo a disponibilidade de N e o potencial de armazenamento de C no solo extremamente relevantes em ecossistemas terrestres, a atividade biológica dos microrganismos do solo revela-se um aspecto de grande importância a ser estudado.

1.1.4. Atividade enzimática do solo

Além da taxa de emissão de CO₂ dos solos, a atividade enzimática, por ser rapidamente alterada em resposta a variações nas propriedades do solo, também pode fornecer informações quanto ao metabolismo de microrganismos, plantas e animais e quanto ao comportamento dos solos (Roscoe et al., 2006; Pulrolnik et al., 2009; Zhou et al., 2013).

A atividade dos microrganismos do solo representa um papel fundamental no fluxo de C do solo. As transformações de C no solo são resultado da ação de microrganismos envolvidos em diversos processos como decomposição, ciclagem de nutrientes, transformações bioquímicas como nitrificação, desnitrificação, fixação biológica de N e outros.

Assim, inserido no contexto de mudanças climáticas e dinâmica do C e do N, o estudo da atividade enzimática dos processos envolvidos no ciclo destes elementos é de extrema relevância, pois há notável influência de muitas enzimas no crescimento celular e nas transformações de energia. A quantidade de enzimas presentes em um solo em particular, bem como suas reações cinéticas, deve refletir as propriedades metabólicas básicas de todos os sistemas celulares (Tabatabai & Warren, 2002).

No entanto, devido ao ambiente complexo no qual as transformações enzimáticas ocorrem, enquanto parte da matéria orgânica está disponível para ser prontamente transformada por meio da ação de enzimas do solo, outra parte, por ter uma estrutura química mais propícia a tal, é intrinsecamente mais resistente à biodegradação. Assim, estudos enzimáticos básicos devem considerar o ambiente extracelular complexo no qual ocorrem as transformações de C e N, variável quanto à sorção (interações da argila), às propriedades físicas (variações de temperatura e umidade) e às propriedades químicas (pH, metais pesados solúveis em água) (Tabatabai & Warren, 2002).

A atividade de enzimas do metabolismo do C e N geralmente é correlacionada com o C orgânico total do solo ou com os níveis de matéria orgânica prontamente metabolizada, sendo inibida por altas taxas concentrações de sal e metais. Assim, embora haja uma infinidade de enzimas envolvida nas mais diversas reações, apenas um número limitado delas é comumente utilizado em estudos. Muitas delas apresentam atividade catalítica extracelular, como a celulase. Outras, como a urease, catalisam reações tanto interna quanto externamente às células (Sardans et al., 2008).

As atividades enzimáticas mais estudadas envolvendo transformações do N têm sido associadas com a geração de amônia (amidases e urease), hidrólise de proteínas (proteases), fixação de N (nitrogenases) e perda de N do solo (redutases). Similar ao N, as enzimas associadas ao C têm sido relacionadas com a hidroxilação de anéis aromáticos (polifenil oxidases, lacases), incluindo a mineralização ou humificação de compostos, hidrólise de polissacarídeos (amilases, celulasas, xilanases) e uma variedade de lipases e esterases, além da enzima indicadora da atividade respiratória, a desidrogenase (Paolo et al., 2002).

Nesse estudo, foram consideradas a atividade de três enzimas principais envolvidas nos ciclos do C e N: a β -glicosidase, a desidrogenase e a urease. A desidrogenase é usada como medida para determinar a atividade microbiológica total do solo e os ensaios são não-específicos, ou seja, representam atividades de diversas enzimas. A quantidade do produto formado na reação é proporcional à respiração microbiana associada à atividade metabólica, não sendo, necessariamente, proporcional à biomassa microbiana presente nos solos (Burns & Dick, 2002; Figueiredo, Burity et al., 2010). A β -glicosidase é a enzima catalisadora da hidrólise da celulose (celobiose) e sua presença tem sido detectada em animais, plantas e microrganismos. Tem sido sugerido que a atividade da β -glicosidase está relacionada positivamente com o teor de matéria orgânica do solo, e é usada como um indicador sensível para efeitos da fertilização e queimadas na atividade biológica de solos (Burns & Dick, 2002;

Figueiredo et al., 2010). Já adentrando o ciclo do N, a urease é uma enzima responsável por catalisar a hidrólise da molécula de uréia, produzindo amônia e CO₂. Se sua atividade for alta, há uma rápida formação de amônia, a qual pode ser liberada para a atmosfera se não for incorporada ao solo. Se a sua atividade for baixa, a produção de amônia, N disponível para assimilação das plantas, pode ser prejudicada (Figueiredo et al., 2010). Essa atividade pode ser verificada com o propósito de relacionar o N total do solo à biomassa de C microbiana (Burns & Dick, 2002).

Além da atividade da comunidade microbiana no solo, a influência do aquecimento e do elevado CO₂ também atinge as plantas de diferentes formas.

1.1.5. Efeitos do aquecimento e da elevada concentração de CO₂ em plantas

De modo geral, os efeitos provocados pela elevada concentração atmosférica de CO₂ se referem principalmente a uma estimulação da produtividade primária em muitos ecossistemas, o que por sua vez, pode acarretar em um aumento na respiração das plantas, elevando a concentração de CO₂ na atmosfera (Gonzalez-Meler et al., 2004; Trueman & Gonzalez-Meler, 2005).

Estima-se que os possíveis efeitos deletérios do aquecimento climático sobre as plantas podem ser, em parte, compensados (ou até mesmo anulados) pelos efeitos benéficos do elevado CO₂ sobre o rendimento das culturas (maior taxa fotossintética e biomassa). As respostas das culturas aos elevados níveis de CO₂, bem como aos tipos de estresses abióticos como à seca, estresse salino, ou alta temperatura, são fenômenos complexos e que devem ser pesquisados em condições de campo, onde as interações entre esses fatores são mais reais (Ainsworth et al., 2008; Ruiz-Vera et al., 2013).

A estimulação da fotossíntese pelo aumento da concentração de CO₂ tem sido amplamente descrita em diversos estudos (Kimball et al., 2002; Long et al., 2004; Ainsworth & Long, 2005; Long et al., 2006; Ainsworth & Rogers, 2007; Ziska & Bunce, 2007; Li et al., 2008; Gonzalez-Meler et al., 2009). Sabe-se que o incremento do CO₂ estimula mais a fotossíntese das plantas que apresentam a via fotossintética C₃ do que as plantas com via fotossintética C₄ (Smith et al., 1987). Devido ao mecanismo de concentração de CO₂ nas células da bainha vascular, acreditava-se que as plantas C₄ não apresentariam um incremento significativo da fotossíntese com o aumento da concentração atmosférica de CO₂ (Bowes, 1993). Entretanto, alguns estudos mostraram que espécies C₄ (Ziska & Bunce, 1999; Ghannoum et al., 2001), inclusive a cana-de-açúcar (Souza et al., 2008), apresentam

significativas respostas fotossintéticas e de crescimento em elevada concentração de CO_2 . Por outro lado, Dukes et al. (1999), demonstraram que em comunidades mistas de C_3 e C_4 , sob elevado nível de CO_2 , ambas espécies se beneficiam igualmente.

Enquanto as crescentes concentrações de CO_2 atmosféricas podem alterar os padrões de precipitação e contribuir para um maior aquecimento atmosférico (Comission, 2011), este aquecimento poderá também acelerar a liberação de CO_2 e CH_4 para a atmosfera, ao promover uma maior quebra da matéria orgânica do solo por meio de uma maior estimulação da atividade microbiana. Assim, com o aumento da entrada de C no solo, haveria um efeito positivo da temperatura no crescimento e acúmulo de biomassa vegetal (Martinez et al., 2014).

Os efeitos diretos do aquecimento nos ecossistemas são bem mais complexos do que os efeitos do elevado CO_2 , uma vez que a temperatura altera drasticamente processos químicos e biológicos das plantas, enquanto a influência do CO_2 é mais limitada às folhas de plantas C_3 e C_4 (fotossíntese, abertura dos estômatos e respiração) (Shaver et al., 2000). Até mesmo ligeiras mudanças de temperatura são capazes de alterar significativamente não apenas a distribuição e estrutura destas plantas, mas também sua fisiologia (produtividade primária líquida, evapotranspiração, ciclagem de nutrientes e produtividade do ecossistema), o que certamente poderá atuar como um *feedback* no clima global (Figura 6) (Woodward et al., 1998; Martinez et al., 2014).

Figura 6. O aquecimento climático pode desencadear tanto um feedback negativo através da estimulação da mineralização de nutrientes, crescimento vegetal e sequestro de carbono como um

feedback positivo via aumento da respiração do ecossistema liberando maiores quantidades de CO₂ na atmosfera. O processo de aclimação da respiração do solo ao aquecimento pode ter um fraco efeito de *feedback* positivo através da ligação entre aquecimento, respiração e concentração atmosférica de CO₂. Modificado de Luo (2001).

Assim, dependendo do incremento na temperatura do ar, do bioma analisado, da localização geográfica e de vários outros fatores intrínsecos a cada ecossistema, o aquecimento global poderá alterar os padrões climáticos locais em diferentes intensidades (Carrillo et al., 2011). A fim de investigar e caracterizar as respostas do ecossistema estudado, os isótopos têm sido amplamente utilizados na área ambiental, pois torna-se possível traçar os ciclos de C e N, baseando-se na detecção das variações isotópicas de elementos como o C e N, tanto os seus isótopos radioativos como os estáveis.

1.1.6. Isótopos estáveis

Isótopos são átomos de um elemento que diferem no número de nêutrons. Isótopos mais pesados, ou seja, com mais nêutrons, formam ligações químicas mais fortes, têm menores taxas de reação em reações enzimáticas, difundem mais lentamente e são mais freqüentemente encontrados em estados de fase de baixa energia nas reações de equilíbrio. Estas propriedades podem ser exploradas para investigar processos físicos e bioquímicos e são a base para as abordagens de isótopos estáveis em estudos ecológicos (Pataki et al., 2003). A composição isotópica é normalmente expressa como uma razão entre o isótopo mais pesado e o mais leve, sendo mais conveniente expressar esta razão isotópica da amostra em relação a um padrão da seguinte forma:

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000 \text{ ‰} \quad (1),$$

na qual R é a razão entre o isótopo pesado e o leve e o símbolo ‰ representa partes por mil. Os padrões utilizados são internacionais, tais como a formação da rocha PDB (Pee Dee Belemnite), utilizada para a proporção de carbono-13 (¹³C) e carbono-12 (R = 0,0112372) e o N₂ atmosférico (0‰) para nitrogênio-15 e nitrogênio-14.

Considerando os isótopos de C, o ¹²C é o mais leve e apresenta 98,89% em relação ao total de C na natureza, enquanto o ¹³C representa apenas 1,11%. Ambos são chamados estáveis porque essas proporções se mantêm relativamente constantes em qualquer resíduo

orgânico, ou seja, não sofrem decaimento. Com o surgimento de técnicas que permitiram a definição destas proporções, como os espectrômetros de massa, viu-se que, quando o C passa de um estado físico-químico para outro há uma discriminação diferenciada entre os dois isótopos, ou seja, dependendo do fenômeno, um dos isótopos muda de estado mais velozmente. Essa diferença, a princípio mínima (na casa dos milhares), proporciona uma variação na proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ possível de ser detectada (Alves, 2005).

Um grande número de fatores ambientais pode alterar processos fisiológicos vegetais e, assim, a discriminação dos isótopos de C. Mais especificamente, o estresse abiótico nas plantas, o qual pode afetar a taxa de fotossíntese, a condutância estomática e outros processos fisiológicos vegetais, pode influenciar também a concentração interna de CO_2 e assim a composição isotópica (^{13}C) do material vegetal. Assim, os isótopos estáveis de C são considerados um indicador de estresse, bem como do crescimento e do potencial hídrico da planta (Farquhar et al., 1982; Bowling et al., 2006).

A composição isotópica é uma função do fracionamento isotópico associado com diferentes características no processo de difusão do $^{13}\text{CO}_2$ em relação ao $^{12}\text{CO}_2$ do ar para o estômato (índice de fracionamento = 4,4‰) e o fracionamento líquido realizado pela Rubisco durante a reação de fixação de CO_2 na fotossíntese (índice de fracionamento = 27‰), sendo a taxa de concentração de CO_2 intercelular (C_i) para a atmosférica (C_a) e o valor do ^{13}C da atmosfera (-8‰):

$$\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{atm}} - a - (b-a) \cdot (C_i/C_a) \quad (2) \text{ (Farquhar et al., 1982).}$$

Em relação aos solos, estudos já realizados mostram que é possível conhecer a sua composição isotópica relacionando-os à cobertura vegetal presente (Martinelli et al., 2009). Há também pesquisas baseadas em florestas tropicais e pastagens de gramíneas que observaram mudanças na discriminação isotópica que ocorrem em resposta às mudanças ambientais sazonais e ao uso de terra (Ometto et al., 2002).

Plantas de metabolismo C_3 e C_4 discriminam os isótopos de maneira diferente, uma vez que apresentam diferentes enzimas no processo de fixação de C. A Rubisco (plantas C_3) apresenta uma menor afinidade pelo CO_2 do que a PEP carboxilase (plantas C_4) e, por esta razão, discrimina muito mais o isótopo pesado de carbono, ^{13}C , em relação ao isótopo leve, ^{12}C , do que a PEP, e assim, as plantas de ciclo C_3 acumulam menos ^{13}C (Pataki et al., 2003; Alves, 2005). O valor isotópico do C da matéria orgânica vegetal ($\delta^{13}\text{C}$) é uma medida integrada de discriminação fotossintética durante a fixação de CO_2 . O $\delta^{13}\text{C}$ considera as

variações da fonte de ar na origem do C assimilado pela planta. Por isso, em estudos de elevado CO₂, é particularmente importante considerar o valor isotópico da fonte de CO₂, uma vez que este é frequentemente bem discrepante dos valores do ambiente (Pataki et al., 2003).

Devido à heterogeneidade e complexidade dos ecossistemas terrestres, o fluxo de ¹³CO₂ é muito variável no espaço e no tempo, e por isso o fracionamento do ¹³C durante a fotossíntese depende dessas duas variáveis e também da composição da vegetação (C₃ e C₄). O δ¹³C do CO₂ respirado é também correspondente às variações do ¹³C atmosférico, já que o C respirado pode ter sido fixado quando o ¹³C era mais "antigo" que o da atmosfera atual (Scholze et al., 2008).

Assim, plantas que crescem sob altas concentrações atmosféricas de CO₂ enriquecido, o qual pode conter uma assinatura isotópica diferenciada, incorporam este C marcado em seus compostos, sendo possível identificar o C "novo" assimilado e o seu tempo de residência. Dessa forma, quanto maior for a diferença entre a composição isotópica do C das plantas e do solo, maior é o potencial de acerto na quantificação da entrada e saída de C do sistema (Pataki et al., 2003).

A discriminação isotópica discrepante entre plantas de ciclo fotossintético C₃ e C₄ permite investigar como adaptações em resposta a condições limitantes que levam a maiores relações ¹³C/¹²C é afetada em condições de altas temperaturas e alto CO₂, havendo importantes implicações no sequestro de C em longo prazo (Trueman & Gonzalez-Meler, 2005).

A mesma técnica baseada no uso de ¹⁵N possibilita uma melhor compreensão da dinâmica desse nutriente no sistema solo-planta-atmosfera. Também para o N, são necessárias duas diferentes fontes de N, como por exemplo no caso do uso de fertilizantes. Se uma planta cresce utilizando N de duas fontes (ex. solo e fertilizante), e uma delas for artificialmente enriquecida com ¹⁵N, é possível determinar a contribuição de cada fonte para a nutrição da planta. Também é possível a realização de análises da abundância natural dos isótopos estáveis de N, nas quais pode ser desvendada a quantidade de N fixada no material vegetal, e as respectivas diferenças entre plantas fixadoras e não fixadoras, uma vez que, por apresentarem diferentes fontes de N, também apresentam variações quanto às concentrações dos isótopos estáveis ¹⁴N e ¹⁵N (Van Groenigen et al., 2003; Alves, 2005; Ometto et al., 2006).

As razões entre estes dois isótopos são variáveis na natureza, em função dos fracionamentos isotópicos que ocorrem nos diversos processos químicos, físicos e biológicos

que envolvem o ciclo do N. Dessa forma, a composição isotópica de amostras de solo e tecidos de plantas é resultado de processos como a mineralização, a volatilização de amônia, a nitrificação, a desnitrificação, a troca de íons, a difusão, a absorção de N pelas plantas e micorrizas, a fixação biológica de N₂, a herbivoria e outros (Hungate et al., 2003; Martinelli, 2009; Figueiredo et al., 2010).

No solo, a composição isotópica do ¹⁵N do N total é determinada principalmente pelo sinal isotópico do N orgânico, uma vez que este não varia por até décadas, sendo assim muito estável. Já o N inorgânico e as formas simples de N orgânico, frações de N disponível para as plantas, possuem rápida taxa de conversão, variando em curtos espaços de tempo, como dias ou semanas. Dessa maneira, o $\delta^{15}\text{N}$ do N total do solo não é, em geral, uma boa aproximação do $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível para as plantas. Materiais biológicos, em geral, apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ variando entre -5 a +10‰, diferença essa que, mesmo pequena, pode ser detectada. No caso de duas plantas, uma fixadora de N₂ e outra não, compara-se os valores de abundância de ¹⁵N de ambas, pressupondo que as plantas não-fixadoras retiram todo o N do solo, apresentando assim maior abundância em ¹⁵N do que as fixadoras, que retiram parte de seu N do ar (Van Groenigen et al., 2003; Martinelli, 2009; Figueiredo et al., 2010; Yousfi et al., 2012).

Mudanças em quaisquer destes fatores como resultado do elevado CO₂ e do aquecimento provavelmente alteram o $\delta^{15}\text{N}$ disponível no solo para as plantas e, conseqüentemente, o $\delta^{15}\text{N}$ das próprias plantas (Pataki et al., 2003).

Sendo altamente relevante para o crescimento da vegetação e o funcionamento do ecossistema, a dinâmica do C e do N no solo e nas plantas permite, por meio de análises isotópicas de ¹³C e ¹⁵N, a investigação de uma série de mecanismos físico-químicos e interações biológicas entre os componentes deste ecossistema.

Por fim, esta revisão mostrou que as pastagens serão potencialmente afetadas pelas mudanças climáticas, especialmente no que concerne às respostas de processos fisiológicos que envolvem o C e o N, tanto nas plantas como nos microrganismos presentes no solo. Com as atuais técnicas disponíveis para a avaliação destas respostas e uma vez obtidos os resultados experimentais, é possível discutir e compreender como o aquecimento e o elevado CO₂ poderão influenciar na estimulação ou inibição dos processos envolvidos na saída e entrada de C e N no ecossistemas terrestres, entendimento esse essencial para prever o comportamento de tais ciclos nas condições ambientais impostas.

HIPÓTESES

2. HIPÓTESES

Para este trabalho, foram elaboradas hipóteses para elucidar os efeitos da elevada concentração de CO₂ e do aquecimento sobre os processos fisiológicos das espécies vegetais estudadas e sobre os processos do solo. São elas:

- O aquecimento aumenta a temperatura e umidade do solo, acelerando a atividade microbológica do solo e aumentando a emissão de CO₂ do solo.
- A elevada concentração de CO₂ aumenta a respiração do solo ao estimular o processo fotossintético e a atividade das raízes, limitando a disponibilidade de N no solo devido à competição entre as plantas e os microrganismos do solo.
- Alterações no ciclo do N no solo e na fixação biológica interferem em processos do ciclo do C, uma vez que altera a atividade enzimática do solo e a capacidade do solo em armazenar C.
- O CO₂ intensifica a resposta das variáveis analisadas à temperatura.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Devido à complexa interação entre diferentes espécies e seu ambiente, é difícil prever os efeitos das mudanças globais em pastagens tropicais C_3 e C_4 . Atualmente existe escassa informação sobre o impacto de duas variáveis ambientais analisadas em conjunto, como a temperatura e a concentração de CO_2 atmosférica, bem como a sua influência nas relações entre as plantas e os processos do solo, uma vez que a influência sobre o processo de fixação de CO_2 já se encontra bem relatado na literatura. Estudos como o proposto podem contribuir para o desenvolvimento de técnicas baseadas em estudos de isótopos estáveis de C e N, capazes de determinar as respostas fisiológicas de plantas C_3 e C_4 , e sua capacidade em assimilar o C excedente da atmosfera e do solo em armazenar este C “novo” assimilado.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

A proposta de pesquisa tem como objetivo principal determinar os efeitos do aquecimento ($+2^{\circ}\text{C}$) e do elevado nível de CO_2 ($600\ \mu\text{mol mol}^{-1}$) na dinâmica do fluxo de C e N de duas espécies de forrageiras tropicais brasileiras, *Panicum maximum* (Jacq.) (gramínea C_4) e *Stylosanthes capitata* Vogel (leguminosa C_3) cultivadas em um experimento em campo utilizando o sistema Trop-T-FACE.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar como os principais processos envolvidos no ciclo do C e N do solo, como a emissão de CO_2 do solo e a atividade enzimática de microrganismos, são afetados pelo aquecimento e pela elevada concentração de CO_2 .
- Verificar o uso da técnica da abundância natural de isótopos estáveis e dos valores de $\delta^{12}\text{C}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{14}\text{N}$ e $\delta^{15}\text{N}$ como traçadores e indicadores fisiológicos.
- Utilizar as análises isotópicas de amostras de folhas de *Panicum maximum* (gramínea C_4) e *Stylosanthes capitata* (leguminosa C_3) a fim de avaliar o C e N assimilados pela planta.
- Compreender como os ciclos interdependentes do C e N e como a interação entre a temperatura e o CO_2 podem influenciar no sequestro de C atmosférico.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Localização geográfica e caracterização da área

O experimento foi realizado no sistema Trop-T-FACE localizado em uma área interna do *campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto. A área experimental possui 2500 m², elevação de 578 m e coordenadas de 21° 10' 08,4'' S e 47° 51' 50,6'' O (Figura 7).

Figura 7. Imagem via satélite da área experimental, circulada em preto (GOOGLE EARTH, 2014).

Segundo a classificação de clima de Köppen, o clima da região é subtropical úmido (*Cwa* ou *Cfa*), com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos (Peel et al., 2007). Dados da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto indicam que a temperatura máxima média mensal da cidade no verão é de cerca de 30° C com um índice pluviométrico superior a 200 mm de chuva/mês e umidade relativa do ar em torno de 80%. Durante o inverno, a temperatura mínima com média mensal se encontra por volta de 13° C com precipitação média de 20 a 30 mm e umidade relativa do ar é de aproximadamente 60%.

De acordo com a classificação de taxonomia de solo da Embrapa Solos e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, de acordo com vários parâmetros e propriedades, o solo da região é um latossolo vermelho distrófico (Staff, 1999), um dos mais comuns das regiões tropicais no mundo (22,5%). São geralmente profundos e bem drenados, de propriedades uniformes ao longo do perfil, estrutura granular firme, baixo pH e coloração vermelha ou amarela (Paisani, 2013). Após análises químicas do solo, foram realizadas as

devidas adubação com N-P-K 8-30-8 (1 ton/ha) e correção do solo com a adição de calcário calcinado (2,5 ton/ha).

5.2. Material vegetal e cultivo

Foram plantadas duas espécies forrageiras amplamente utilizadas em pastagens tropicais: *Stylosanthes capitata* Vogel (Fabaceae), planta de tipo fotossintético C₃ e *Panicum maximum* (Jacq) cv. Mombaça (Poaceae), planta de tipo fotossintético C₄ (Figura 8).

Figura 8. Espécies utilizadas no estudo em consórcio, (A) *Stylosanthes capitata* Vogel e (B) *Panicum maximum* (Jacq) cv. Mombaça.

A gramínea *P. maximum* é bastante utilizada no Brasil como forrageira, dada sua alta produtividade e qualidade nutricional. As plantas exigem solos de média a alta fertilidade para uma boa produção de forragem, possuem tolerância a condições de baixa disponibilidade hídrica (Freitas, 2007; Rosanova, 2008; Machado, 2012).

No caso das leguminosas do gênero *Stylosanthes*, estas são conhecidas por apresentarem uma ampla adaptação a climas secos e a solos de baixa fertilidade. Sendo uma leguminosa altamente adaptada ao cerrado, *S. capitata* é uma forrageira rica em proteína, usada amplamente em consórcio com gramíneas a fim de aumentar a produtividade do pasto, uma vez que é capaz de estabelecer rizóbios, aumentando a disponibilidade de N no solo (Ayarza et al., 1997; Fernandes et al., 2005; Valentim et al., 2008; Chaves et al., 2013).

No experimento I, foram plantadas apenas sementes *S. capitata* para avaliar os efeitos do aquecimento (dezembro de 2012), enquanto que no experimento II, foram utilizados os mesmos indivíduos de *S. capitata* e também foram plantadas sementes de *P. maximum* (maio de 2013), com o propósito de analisar ambas as espécies em consórcio. No experimento II, 80 dias após o plantio, foi realizado o corte de uniformização de ambas as plantas, a uma altura

de 35 cm acima do nível do solo. O segundo corte foi realizado três semanas após, quando deram-se início aos tratamentos de elevado CO_2 e aquecimento (21 de agosto de 2013), que teve um mês de duração.

5.3. Sistemas experimentais

O estudo foi conduzido em sistema combinado T-FACE (*Temperature Free-Air Controlled Enhancement*) e FACE (*Free Air CO_2 Enrichment*), e por se localizar em um região tropical, foi denominado Trop-T-FACE (Figura 9).

Figura 9. Vista da área experimental do Sistema Trop-T-FACE e suas respectivas parcelas experimentais e o contêiner para suporte técnico à direita ao fundo.

O sistema de temperatura T-FACE, desenvolvido e instalado pelo pesquisador Bruce Kimball (Kimball, 2005; Kimball et al., 2008), consiste dos seguintes componentes: uma unidade central de controle e armazenamento de dados, 8 unidades de distribuição e controle de energia nas parcelas experimentais, 6 aquecedores infravermelhos de cerâmica em cada parcela aquecida (Figura 10), termômetros infravermelhos (Figura 11), fonte de energia elétrica (Figura 12) e computador para controle e armazenamento de dados.

Figura 10. Aquecedor infravermelho de cerâmica do modelo FTE-750-240 (Mor Electric, USA) instalados em refletores de alumínio modelo Salamander ALEX (Mor Electric, USA).

Figura 11. Termômetro infravermelho do modelo SI-1H1-L20 (Apogee Instruments, USA) instalado para monitorar a temperatura do dossel das plantas.

Figura 12. Painel de energia elétrica da parcela aquecida, sendo todos painéis interligados à unidade central de controle e utilizados para o controle e distribuição da energia em cada parcela experimental.

O controle do sistema T-FACE foi realizado por um computador exclusivo dotado do software *LoggerNet*, o qual estabelece comunicação com a unidade central de controle e armazenamento de dados, que consiste de um *datalogger* CR1000, uma unidade de comunicação NL200 e um multiplexador AM 16/32 (Campbell Scientific, USA) (Figura 13). O programa permite a visualização em tempo real da temperatura do dossel das plantas das parcelas controle, parcelas aquecidas e a diferença entre ambas, cujo alvo foi de 2°C.

Figura 13. Unidade central de controle e armazenamento de dados, que consiste de um datalogger CR1000, uma unidade de comunicação NL200 e um multiplexador AM 16/32. Todos são componentes fabricados pela Campbell Scientific (USA).

O sistema FACE é uma modificação do sistema POPFACE de injeção de CO₂ puro, desenvolvido por Miglietta et al. (2001). Consiste dos seguintes componentes: uma unidade

de controle; 8 anéis de fumigação; sensores de CO₂ (IRGAs) para monitoramento da concentração de CO₂ em cada parcela (Figura 14); computador conectado a internet com software específico para o controle do sistema; tanque de CO₂ com instalação centralizada para o controle da pressão, fluxo e distribuição do CO₂ para as parcelas experimentais (Figura 15).

Figura 14. Anéis de fumigação do sistema FACE combinado com os refletores de aquecimento do sistema T-FACE. A altura dos anéis e dos refletores pode ser ajustada acompanhando o crescimento das plantas. Na parte central a temperatura e a concentração de CO₂ são registradas por um termômetro e um sensor de CO₂ (IRGA) modelo GTM 220 (Vaisala, Finlândia), além de sensores de temperatura do solo e de umidade do solo (*ThetaProbe* ML-2X, Delta-T, UK) conectados a um *Datalogger* DL2 (Delta-T, UK).

Figura 15. Tanque de CO₂ líquido de 12 toneladas instalado sobre uma base de concreto especialmente construída para suportar 30 toneladas. Observa-se a unidade vaporizadora conectada no lado direito do tanque. Por medidas de segurança a área do tanque foi cercada com malha e tem acesso restrito.

Durante o período experimental, o sistema T-FACE de aquecimento foi mantido em funcionamento por 24 horas, enquanto que o tratamento com elevada concentração de CO₂ foi mantido somente durante o período diurno (das 6 às 18 horas).

5.4. Delineamento Experimental

Foram realizados dois experimentos. No experimento I, plantas de *S. capitata* cresceram em 16 parcelas, sendo oito delas submetidas ao aquecimento de 2°C (eT) acima da temperatura do dossel das plantas das parcelas controle.

No experimento II, as plantas de *S. capitata* e *P. maximum* cresceram em consórcio e submetidas aos tratamentos com aquecimento de 2°C e com elevado CO₂. Em ambos os experimentos, as sementes foram plantadas dentro de anéis de 2 m de diâmetro e distantes 5 m entre si, a fim de evitar contaminação cruzada. Os tratamentos aplicados no experimento II foram então denominados:

- controle: concentração de CO₂ ambiente e temperatura ambiente
- eT: concentração de CO₂ ambiente e aquecimento (+2°C)
- eC: concentração de CO₂ elevada (600 µmol mol⁻¹) e temperatura ambiente,
- eT + eC: concentração de CO₂ elevada (600 µmol mol⁻¹) e aquecimento (+2°C)

Com quatro repetições de cada tratamento, as 16 parcelas foram divididas em quatro blocos casualizados, cada um contendo uma repetição de cada tratamento (Figura 16).

Figura 16. Esquema do Sistema Trop-T-FACE mostrando a distribuição das parcelas experimentais e seus respectivos tratamentos de elevada concentração de CO₂, cujo controle provém dos sistemas FACE e de aquecimento do Sistema T-FACE no experimento instalado na USP/RP. Cada sistema foi controlado por programas específicos instalados em computadores individuais conectados a internet por fibra ótica localizados dentro de um container, especialmente adaptado para este fim. No sistema de CO₂, as parcelas com elevada concentração de CO₂ recebem alimentação de CO₂ puro a partir de um tanque criogênico de CO₂ de 12 toneladas. No sistema de aquecimento, cada parcela aquecida é controlada independentemente por meio de um painel elétrico conectado a sensores de temperatura e o datalogger central. A energia elétrica para o sistema T-FACE foi subministrada pela rede elétrica do *campus* da USP em Ribeirão Preto a partir de um transformador de 75 KVA.

5.5. Monitoramento Microclimático

O conteúdo de água do solo e a temperatura do solo de cada anel foram continuamente monitorados com sensores *Theta Probe* de umidade do solo (ML2x) e de temperatura (ST2), respectivamente conectados a um *Data Logger DL2e* (Delta-T Devices, UK). Uma estação microclimática automática (WS-HP1) monitorou e armazenou os dados climáticos (Figura 17). No experimento I não houve irrigação, enquanto no experimento II as plantas, cultivadas ao ar livre durante a estação de seca, foram submetidas a irrigação controlada durante o período experimental, mantendo o conteúdo de água do solo entre 0,40 e 0,55 m³ m⁻³.

Figura 17. Estação microclimática automática (WS-HP1) responsável pelo monitoramento e armazenamento de dados climáticos, como temperatura, umidade relativa, radiação e precipitação.

5.6. Emissão de CO₂ do solo

Em cada parcela experimental foram fixados dois anéis de plástico PVC de 10 cm de comprimento e 20 cm de diâmetro (modificados a partir de tubos de encanamento de água pela Oficina de Precisão da FFCLRP) no dia anterior à primeira medição de cada experimento. A profundidade dos anéis no solo foi determinada de acordo com a distância entre a superfície do solo e o topo do anel (de 3 a 5 cm). A emissão de CO₂ do solo foi mensurada utilizando-se o sistema LI-8100A (LI-COR, USA) – *Automated Soil CO₂ flux system* (Figura 18), no qual a câmara foi disposta nos referidos anéis de PVC, localizados dentro de cada anel de fumigação do sistema FACE. Com o uso desse equipamento é possível medir o fluxo líquido de CO₂ do solo que representa a taxa de respiração do solo, expresso em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Tal sistema previne a excessiva pressão de CO₂ dentro da câmara, sendo a taxa de aumento da concentração de CO₂ monitorada e, assim, o fluxo de saída de CO₂ do solo é então computado a partir de uma série de cálculos computacionais. Cada medição teve duração de 1 minuto e 30 segundos. A umidade e temperatura do solo foram monitoradas utilizando-se os sensores *Theta Probe* de umidade do solo (ML2x) e de temperatura (ST2) a uma profundidade de 10 e 20 cm, respectivamente.

Figura 18. Aparelho utilizado na medição da respiração do solo (Automated Soil CO₂ system – LI-8100A).

No experimento I, as avaliações foram feitas por três dias consecutivos, previamente ao início do experimento (a partir de oito dias antes) e após 30 dias de aquecimento, totalizando seis dias de medição, em dois diferentes horários, às 12 e 18 horas.

No experimento II, as avaliações foram realizadas em seis dias, abrangendo desde o primeiro dia de experimento (21/08/2013) até o 25º dia (15/09/2013), com um, dois, oito, quinze, 22 e 25 dias após o início dos tratamentos. Em todos os dias foram realizadas duas medições por dia, em dois horários diferentes, também às 12 e 18 horas, totalizando doze avaliações.

5.7. Atividade enzimática do solo

Foram retiradas três amostras de cada parcela (15 cm de diâmetro, 10 cm de profundidade), as quais foram misturadas para se obter uma amostra homogênea de cada parcela. Assim que retiradas, as amostras foram armazenadas em gelo até o momento de sua análise em laboratório, a qual foi realizada em parceria com o Prof. Wanderley José de Melo, responsável pelo Laboratório de Fertilidade do solo e Nutrição de plantas da UNESP-Jaboticabal. Foram analisadas as atividades de três enzimas envolvidas nos ciclos do C e N: a desidrogenase, a β -glicosidase e a urease. Os reagentes utilizados foram, respectivamente, cloreto de trifeniltetrazólio, o p-nitrofenil- β -glicosídeo e uréia, cujos produtos foram

quantificados por espectrofotometria na região do visível. Todas as análises foram realizadas segundo o protocolo proposto por Figueiredo e colaboradores (2010).

5.8. Análises isotópicas

Para saber como o C derivado da planta C_3 ou C_4 foi afetado pelo CO_2 foi analisada a composição isotópica das plantas e do solo utilizando a metodologia descrita por Trueman e Gonzalez-Meler (2005).

Foram analisados os isótopos estáveis de C e N: ^{12}C e ^{13}C e ^{14}N e ^{15}N , em amostras de solo e de folhas de *S. capitata* no experimento I e apenas de folhas de *S. capitata* e *P. maximum* no experimento II. A amostragem das plantas foi realizada coletando-se de duas a três folhas novas por planta por parcela. As amostras de solo foram coletadas entre 0 e 50 cm por tratamento no início, durante e no final do experimento, separando as raízes do solo e a matéria orgânica particulada (MOP).

A preparação e processamento de todas as amostras envolveu a secagem em estufa a $70^\circ C$ e a moagem do material. Em seguida, as amostras foram pesadas e armazenadas em cápsulas de estanho (2,0 mg de folha e 30 mg de solo), bem como o padrão utilizado, Acetanilida (0,9 mg) (Figura 19).

Figura 19. Encapsulamento das amostras em cápsulas de estanho e armazenadas em microplacas, juntamente com o padrão Acetanilida e amostras em branco, após devidamente pesadas.

O $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ das folhas e do solo foram quantificados por meio do uso de um analisador *Elemental Costech* (Figura 20) acoplado ao espectrômetro de massa *Finnegan DELTA+XL Isotope Ratio Mass Spectrometer* (Figura 21).

Figura 20. Analisador elementar (Elemental Analyzer Costech Analytical, ECS 4010, zero blank autosampler).

Figura 21. Espectrômetro de massa (Isotope-Ratio Mass Spectrometer: continuous flow ThermoFinnigan Delta Plus XL equipped with Conflo III, Gas Bench II).

Para esses estudos, as razões isotópicas ($R = {}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C}$) da amostra vegetal (R_{sample}) e do padrão (R_{standard}) foram determinadas usando um espectrômetro de massa (*Isotope-Ratio Mass Spectrometer*). Os valores de R foram convertidos para $\delta^{13}\text{C}$ usando a relação: $\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000\text{‰}$. Os padrões de abundância isotópica do C e do N são obtidos a partir do padrão internacional, sendo eles, respectivamente: PDB, uma pedra calcária da formação *Pee Dee Belmenite* na Carolina do Sul, EUA, e concentração de N_2 atmosférico.

Estas análises foram realizadas na Universidade de Illinois, Chicago, EUA, sob a supervisão do Prof. Miquel Gonzalez-Meler.

5.9. Análise estatística de dados

Foram aplicadas análises de variância (ANOVA) a partir de um delineamento experimental em blocos casualizados. No experimento I, cada tratamento apresentou oito repetições (controle e eT); e no experimento II, cada tratamento apresentou quatro repetições (controle, eC, eT e eC+eT), totalizando 16 unidades experimentais. O programa estatístico utilizado foi o R (R Core Team, 2013), sendo testadas as variáveis-resposta (emissão de CO₂ do solo, as composições isotópicas, teores de C e N e atividade enzimática) segundo o efeito do CO₂, da temperatura, dos blocos e da interação entre CO₂ e temperatura. Nas análises com resultado significativo da interação, foi realizado o teste de comparações múltiplas *a posteriori* de Student-Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de 10%.

RESULTADOS:

EXPERIMENTO I

EFEITOS DO AQUECIMENTO NA DINÂMICA DE CARBONO E NITROGÊNIO
DO SOLO E DE *Stylosanthes capitata* (C₃)

6.1. RESULTADOS (Experimento I)

Neste experimento, foi utilizado o sistema de aquecimento (T-FACE), possibilitando o aquecimento do ar do dossel das plantas de *Stylosanthes capitata* em 2°C acima da temperatura do dossel das parcelas controle (Figura 22).

Figura 22. Média das temperaturas do dossel registradas pelos termômetros infravermelhos em todas parcelas experimentais durante 30 dias (abril de 2013).

6.1.1. Caracterização da emissão de CO₂, temperatura e umidade do solo

Foram realizadas medições prévias ao tratamento de aquecimento (6 a 8 dias), de modo a caracterizar a variação diurna da respiração do solo, bem como a temperatura e umidade do solo (Figura 23). Observou-se que respiração do solo é maior no período das sete até às quinze horas. Após esse horário, a E_s é menor. Por outro lado, a temperatura do solo aumenta progressivamente ao longo do dia até alcançar valores máximos por volta das 19 horas. A umidade do solo se mantém alta na parte da manhã e sofre redução ao final da tarde.

Quando comparadas às medições realizadas nos últimos dias experimentais com tratamento de aquecimento, ou seja, após 30 dias (30-D), havendo um total de oito parcelas em cada (Figura 24A), observou-se que as parcelas aquecidas se mostraram significativamente diferentes das controle somente durante o tratamento com aquecimento (com o sistema T-FACE ligado). A variação da resposta da respiração do solo em função do horário de medição também foi analisada. Os resultados mostram que o aquecimento aumentou a respiração do solo principalmente às 18 horas, com uma porcentagem de 12,5%

($p = 0,00363$), enquanto às 12 horas foi observado um aumento não significativo de 4,2% ($p > 0,1$) na E_s em parcelas aquecidas (Figura 24B). As maiores taxas respiratórias foram observadas às 12 horas, mas as maiores diferenças entre tratamentos foram encontradas às 18 horas. Esses dados, ao serem analisados em conjunto com os dados de temperatura e umidade do solo, revelaram maiores temperaturas e menores umidades nas parcelas aquecidas (Figura 26).

Figura 23. Caracterização da emissão de CO_2 do solo (A), temperatura (B) e umidade do solo (C), medidas em intervalos de 2 horas desde as 7 até às 21 horas. Cada ponto representa a média de 4 parcelas aleatórias ($\pm$ erro padrão).

Figura 24. Valores médios da emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **A**: Medições realizadas antes da aplicação do tratamento de aquecimento (PT) e 30 dias após o início do experimento (30-D) nas parcelas controle e aquecidas (eT). **B**: Medições realizadas durante o período experimental nos tratamentos controle e de aquecimento (eT) às 12 e 18 horas. Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p < 0,1$).

As medições deste período (três dias antes do início e nos últimos três dias de experimento) estão detalhadas nos gráficos abaixo (Figura 25).

Figura 25. Valores médios da emissão de CO₂ do solo (μmol m⁻² s⁻¹) às 12 horas (A) e 18 horas (B) nos tratamentos controle e de aquecimento (eT). As medições foram realizadas 6, 7 e 8 dias antes do experimento (números negativos) e nos três últimos dias de experimento (28°, 29° e 30° dia).

Enquanto previamente ao experimento não foram detectadas discrepâncias entre os tratamentos (Figura 25A), ao final do experimento, diferenças significativas da respiração do solo entre o tratamento controle e de aquecimento foram observadas às 18 horas (Figura 25B). O aquecimento da temperatura do dossel em 2°C (Figura 22) provocou alterações nas condições abióticas do solo, tanto na umidade como na temperatura do solo. É possível notar um aumento da temperatura do solo das parcelas aquecidas em aproximadamente 1°C comparadas às parcelas controle (Figura 26B), e a tendência de uma menor umidade do solo nas parcelas aquecidas do que nas controle (Figura 26B) às 12 e 18 horas.

Figura 26. Temperatura (°C) e umidade do solo (m^3m^{-3}) nos tratamentos controle e de aquecimento de 2°C (eT) às 12 e 18 horas antes e durante o experimento (A); e somente durante o experimento considerando as diferenças estatísticas entre tratamentos (B). Cada ponto representa a média ($\pm$ erro padrão) de cada tratamento naquele horário ($n=8$). Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p<0,1$).

- Relação entre a emissão de CO₂, temperatura e umidade do solo

Para compreensão entre a relação da emissão de CO₂ do solo, com a temperatura e a umidade do solo durante o período experimental com aquecimento, regressões lineares evidenciaram as correlações obtidas nos diferentes dias e horários de medição. Apesar de não significativo, observa-se a tendência quanto à correlação positiva entre a E_s e a temperatura do solo (Figura 27). Entre a E_s e a umidade do solo (Figura 28) e entre a temperatura do solo e a umidade do solo (Figura 29) foram encontradas correlações negativas significativas.

Figura 27. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a temperatura do solo ($^{\circ}\text{C}$) por dia e horário de medição. Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Não foi encontrada significância ($p>0,1$).

Figura 28. Correlações entre a emissão de CO_2 do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a umidade do solo (m^3m^{-3}) por dia e horário de medição. Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p < 0,1$).

Figura 29. Correlações entre a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) por dia e horário de medição. Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p < 0,1$).

6.1.2. Análise enzimática do solo

Uma vez que os microrganismos do solo têm a capacidade de responder rapidamente às alterações na temperatura do solo, é possível verificar o efeito da temperatura por meio de alterações na atividade enzimática nas parcelas aquecidas em comparação às parcelas controle. As análises da desidrogenase (Figura 30), da β -glicosidase (Figura 31) e da urease

(Figura 32) não mostraram uma redução significativa das parcelas aquecidas comparadas às controle.

Figura 30. Atividade máxima da enzima desidrogenase (g de trifetilformazan/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle e de aquecimento em +2°C (eT). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,1$).

Figura 31. Atividade máxima da enzima β-glicosidase (mg de p-nitrofenil/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle e de aquecimento em +2°C (eT). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,1$).

Figura 32. Atividade máxima da enzima urease (g de N-NH₄/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle e de aquecimento em +2°C (eT). Diferenças significativas são indicadas por asterisco ($p=0,0598$).

6.1.3. Análise isotópica de C e N

As análises isotópicas de C e N nas folhas e no solo permitiram a investigação da abundância e das transformações de tais elementos por efeito do aquecimento. Foram comparados dados isotópicos das plantas e do solo em pré-tratamento (PT) e ao final do período de 30 dias de aquecimento (30-D). Na avaliação realizada em 30-D pode-se observar aumento significativo no %N das folhas por efeito do aquecimento ($p = 0,0111$) e uma redução do valor ¹⁵N ($p = 0,0023$). No entanto, não foram observados efeitos do aquecimento no %C de solo e %C de folhas, nem no %N do solo (Tabela 1 e Figuras 33 a 38).

Tabela 1. Dados isotópicos de carbono e nitrogênio em folhas de *S. capitata*. PT = avaliação realizada em pré-tratamento; 30D = avaliação realizada após 30 dias de aquecimento. Tratamentos controle (C) e +2°C acima do controle (eT). Diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,1$) são indicadas por asterico (n=8). Análises realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis da Universidade Illinois em Chicago, EUA.

		%C	%C	%N	%N
		<i>Folha</i>	<i>Solo</i>	<i>Folha</i>	<i>Solo</i>
PT	C	39,62±0,26	1,7±0,05	1,67±0,11	0,14±0,0
	eT	40,31±0,58	1,68±0,05	1,39±0,13	0,14±0,0
30D	C	42,50±0,16	1,66±0,07	2,87±0,06	0,13±0,01
	eT	42,33±0,12	1,67±0,07	3,18±0,09*	0,13±0,01
		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
		<i>Folha</i>	<i>Solo</i>	<i>Folha</i>	<i>Solo</i>
PT	C	-29,04±0,09	-16,28±0,15	3,25±0,28	9,13±0,21
	eT	-29,08±0,10	-16,46±0,29	3,01±0,21	8,84±0,16
30D	C	-29,04±0,19	-16,43±0,23	3,36±0,17	7,56±0,23
	eT	-29,22±0,12	-16,86±0,12	2,17±0,27*	6,96±0,01

A composição isotópica das folhas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) também são indicadores importantes do metabolismo de C e de N em resposta ao aquecimento (Tabela 1). Apesar do incremento observado na temperatura do solo, foi observada a ausência de diferenças significativas entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas folhas.

O efeito do aquecimento foi verificado no $\delta^{15}\text{N}$ das folhas. As parcelas aquecidas apresentaram uma diferença de 1‰ na composição isotópica de ^{15}N das folhas de *S. capitata* e um maior teor de N no tecido foliar em comparação às parcelas controle. Nas amostras de solo não foram encontradas diferenças significativas tanto nos dados relativos ao C como ao N.

DISCUSSÃO: EXPERIMENTO I

6.2. DISCUSSÃO (Experimento I)

Qualquer alteração no ciclo do C nos ecossistemas pode significar *feedbacks* positivos ou negativos no aquecimento global. Há muitas evidências na literatura científica que o aquecimento provoca impactos no ciclo do C pelas modificações na estrutura e funcionamento dos ecossistemas terrestres (Luo et al., 2001). Estudos recentes têm mostrado que experimentos com aquecimento têm levado ao aumento da fotossíntese das folhas e da produtividade primária do ecossistema, bem como causado um acúmulo de biomassa e a elevação das taxas respiratórias do solo (Lin et al., 2010; Wu et al., 2011). A emissão de CO₂ foi, de fato, mais elevada nas parcelas aquecidas, provavelmente por estar acoplado ao processo fotossintético de entrada de C no sistema ou até mesmo pelos processos biológicos do solo. No entanto, tanto os processos ligados aos componentes heterotróficos como aos autotróficos relacionados ao ciclo do C no solo (decomposição, atividade microbiana e respiração das raízes), bem como suas respostas ao aquecimento, ainda permanecem obscuros em todos os tipos de ecossistemas, principalmente naqueles localizados em regiões tropicais (Lin et al., 2010; Lu et al., 2013).

A temperatura e umidade do solo são os fatores mais comumente relacionados à variação temporal do fluxo de CO₂ dos solos, influenciando a taxa respiratória do solo submetido ao aquecimento, como pôde ser observado nos resultados. Isso porque uma baixa umidade pode inibir a produção de CO₂ nos solos e a temperatura do solo geralmente intensifica os processos do ciclo de C, incluindo a respiração do solo (Mikkelsen et al., 2008; Lu et al., 2013; Yang et al., 2013). Em um experimento em região árida, uma interação entre temperatura e umidade explicou a variação sazonal nos fluxos CO₂ do solo, cujos incrementos foram atribuídos ao efeito da temperatura sendo manifestada somente na presença de uma umidade suficiente para permitir uma produção elevada de pelas raízes e pela comunidade microbiana do solo (Wildung et al., 1975; Davidson et al., 2000).

Em regiões tropicais, como em uma pastagem na Amazônia, as variações sazonais na respiração do solo foram explicadas pela temperatura e umidade do solo ou somente pela umidade do solo (Davidson et al., 2000; Gaumont-Guay et al., 2006; Tian et al., 2011; Atarashi-Andoh et al., 2012; Zhao et al., 2013). Também foi encontrada uma forte tendência em aumentar a E_s em função da temperatura em pastagens tropicais (Davidson et al. 2000, Wood et al., 2012). Assim, tanto a entrada como a saída de CO₂ no ecossistema seriam estimuladas pelo aquecimento experimental, indicando que essas altas taxas podem decorrer

de efeitos hídricos, os quais já foram demonstrados como produtores de pulsos de atividades microbianas e taxas de produção de CO₂ (Davidson et al., 2000).

O aumento no fluxo de C derivado da assimilação das plantas por fotossíntese pode ter causado uma estimulação na respiração do solo, verificada pelo aumento da taxa respiratória nas parcelas aquecidas, como observado nos resultados. Se o aquecimento de fato induz alterações na alocação de C no solo, diferentes padrões de alocação nos tecidos subterrâneos podem explicar um importante mecanismo compensatório realizado pelas plantas quando expostas à mudanças ambientais (Reich et al., 2006; Yin et al., 2013).

Assume-se que o declínio da atividade enzimática da urease obtido poderia ser devido à menor umidade verificada no solo das parcelas aquecidas, o que pode ter restringido o acesso da biomassa microbiana aos compostos de substratos, além de uma alteração na quantidade ou qualidade nutricional da matéria orgânica do solo, impedindo assim a ocorrência do esperado efeito *priming* sob altas temperaturas (Sardans et al., 2008). Assim, tanto o aquecimento do ar (dossel das plantas) como do solo pode ter causado uma redução na decomposição microbiana via efeitos indiretos da temperatura na umidade, como já encontrado em outros estudos (Davidson & Janssens 2006; Belay-Tedla et al., 2009; Liu et al., 2009; Wood et al., 2012).

Outra possibilidade está relacionada à capacidade de aclimação da comunidade bacteriana às novas condições ambientais. Uma vez estimulada pelo aquecimento, a atividade microbiana responderia a um aumento da respiração do solo inicial induzido pela temperatura. Contudo, a elevada atividade enzimática não se manteria após um período de aclimação, havendo o retorno da atividade microbiana às taxas iniciais, devido à uma limitação de substrato, ou ainda por uma alteração na comunidade microbiana (Allison et al., 2010).

Assim, desde que haja altas taxas de precipitação durante a época de crescimento, o aquecimento tende a aumentar a atividade enzimática do solo. No entanto, os efeitos da umidade e da temperatura podem ser diferentes dependendo da especificidade das enzimas presentes no solo, uma vez que algumas são mais sensíveis às alterações na temperatura e outras à umidade (Sardans et al., 2008). Isto já foi observado em estudos prévios em outros ecossistemas, os quais também encontraram efeitos da menor umidade nos solos induzida pelo aquecimento, e consequentemente, a redução na biomassa e atividade microbiana (Ainsworth et al., 2003; Liu et al., 2009; Schindlbacher et al., 2011; Vanhala et al., 2011; Fu et al., 2012). Assim, a aclimação bioquímica de microrganismos do solo poderia reduzir significativamente o potencial estimulatório do aquecimento nas taxas de decomposição do solo (Allison et al., 2010; Kuzyakov & Gavrichkova, 2010).

Quaisquer alterações na alocação, na concentração e na dinâmica de C influencia a composição isotópica da amostra. Normalmente, é esperado um efeito negativo da temperatura no $\delta^{13}\text{C}$ das folhas das plantas (Libby, 1972), o que está de acordo com outros trabalhos mais recentes. Estes trabalhos indicam uma menor discriminação do $^{13}\text{CO}_2$ no processo de assimilação sob condições de solo seco (Sanaullah, 2014). Neste experimento, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ não se mostraram estatisticamente diferentes entre o tratamento de aquecimento e o controle.

Há também estudos divergentes em outras espécies que demonstram correlações positivas entre o $\delta^{13}\text{C}$ e a temperatura (Saurer et al., 1995; Anderson et al., 1998). No entanto, geralmente é difícil separar o efeito isolado da temperatura das outras variáveis climáticas interrelacionadas, porque podem afetar diversas respostas, como a umidade do solo (Saurer et al., 1995; Anderson et al., 1998; Ferrio et al., 2003; Zhao et al., 2013). Neste trabalho, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das folhas possivelmente indicam a ausência de efeitos pronunciados na abertura dos estômatos ou na difusão do CO_2 para o interior da folha. Consequentemente, a fisiologia da planta parece não ter sofrido alterações severas devido à falta de água, evidenciando a ausência de um estresse hídrico durante o período experimental.

A temperatura pode afetar diversos aspectos do ciclo do N, processos que incluem a fixação do N, nitrificação e desnitrificação (Sierra, 2002; Houlton et al., 2008; Bai et al., 2013; Kuster et al., 2013). Enquanto não há trabalhos publicados sobre o aquecimento em campo nos trópicos, trabalhos realizados em ecossistemas temperados em altas latitudes têm mostrado incrementos significativos (em até mais de 40%) na taxa de mineralização de N em resposta ao aquecimento (Rustad et al., 2001).

Houlton et al. (2008) encontrou que a entrada de N derivado da fixação atmosférica pode decrescer em temperaturas acima de 26°C . Elevadas temperaturas no ar e no solo também podem aumentar a demanda de N ao acelerarem a taxa de crescimento vegetal como um todo (Saxe et al., 2001; Way & Oren, 2010). Assim, se a perda de N aumenta em função do aquecimento e a entrada de N no sistema permanece inalterada, a estimulação do ciclo do N pelo aquecimento pode eventualmente provocar a perda de N total nos ecossistemas terrestres.

Da mesma forma, se a entrada de C no solo aumenta mais do que a de N, a diminuição do N disponível no solo para a planta devido à uma maior imobilização do N também pode ocorrer (Bai et al., 2013; Kuster et al., 2013). Se esta resposta se mantiver em ecossistemas tropicais, assim como nos temperados, o aquecimento pode resultar em menores taxas de entrada de N no solo (Kuster et al., 2013).

No presente estudo, nota-se que o incremento de 1°C na temperatura do solo durante o período experimental foi suficiente para evidenciar diferenças entre os fluxos de N entre os tratamentos controle e aquecimento, uma vez que as parcelas aquecidas apresentaram um decréscimo na umidade do solo. Outros estudos reportam que a umidade é geralmente reduzida nos tratamentos de aquecimento em florestas, pastagens de gramíneas e plantas cultivadas (Bai et al., 2013). Isso porque o estresse hídrico pode limitar a difusão de substâncias e restringir a atividade microbiana, além de elevar as taxas de respiração e provocar um aumento nos gradientes de O₂, favorecendo a desnitrificação, o processo respiratório da redução do nitrato (Castaldi, 2000; Smith *et al.* 2003; Bai et al., 2013).

O valor do $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas podem estar na faixa entre -10‰ e +10‰, pressuposição especialmente relevante para espécies que compartilham o mesmo ambiente e apresentam biologicamente diferenças significativas por volta de ~1‰ (Liu et al., 2010). A diferença de 1‰ na composição isotópica de ^{15}N das folhas de *S. capitata* em parcelas aquecidas (~2,17‰) comparada às parcelas controle (~3,36‰) evidenciou uma maior proporção na fixação do N₂ (~15%). Também foi observado um maior teor de N no tecido foliar das plantas nas parcelas aquecidas (3,18%) quando comparado às parcelas controle (2,89%).

Os fatores ambientais considerados como os principais responsáveis por influenciar os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das folhas são a temperatura e a precipitação (Liu et al., 2010). Estudos recentes têm mostrado que um aumento na temperatura do ar e do solo pode promover um aumento significativo na concentração de nitratos no solo, enquanto haveria apenas um leve efeito na concentração de amônia e a ausência de efeitos no teor total de N, o que poderia ser interpretado como uma via de perda de N pelo aumento da disponibilidade de nitrato em resposta ao aquecimento (Liu et al. 2010; Turner & Henry, 2010; Kuster et al., 2013).

Os dados isotópicos confirmam a tendência da amônia apresentar geralmente maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ do que os nitratos (Liu et al., 2010), uma vez que o $\delta^{15}\text{N}$ das folhas das parcelas aquecidas foi menor do que no tratamento controle, sugerindo que a concentração de nitrato no solo aumentou com o aquecimento. O decréscimo significativo de 1‰ na composição isotópica de ^{15}N (considerando um intervalo de 0‰ a 7‰ característico de ambientes naturais) indica uma maior proporção de fixação biológica de N (~15%) pelas leguminosas, o que pode ter contribuído para os elevados teores de N nas folhas de *S. capitata* em parcelas aquecidas. Assim, o aumento da atividade de fixação de N sugere que o aumento na atividade das raízes pode ter causado o aumento observado nas taxas respiratórias do solo.

CONCLUSÃO:

EXPERIMENTO I

6.3. CONCLUSÃO (Experimento I)

O aquecimento em 2°C propiciou o aumento da temperatura do solo e a redução da umidade do solo. Tendo ambos os fatores um papel importante na regulação da emissão de CO₂, foi observado um aumento na respiração do solo. A atividade enzimática do solo, demonstrada principalmente pela enzima relacionada ao ciclo do N, sofreu decréscimo por efeito do aquecimento. O decréscimo significativo de 1‰ na composição isotópica de ¹⁵N, sugere uma maior proporção de fixação biológica de N pela leguminosa, o que contribuiu para os maiores teores de N encontrados nas folhas de *S. capitata* das parcelas aquecidas. Assim, sugere-se que o aumento observado nas taxas respiratórias do solo seja devido ao aumento na taxa de fixação de N da leguminosa, e, conseqüentemente, ao aumento na atividade de suas raízes.

RESULTADOS:

EXPERIMENTO II

EFEITOS DO AQUECIMENTO E DA ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE CO₂
NA DINÂMICA DE CARBONO E NITROGÊNIO DO SOLO E DE
Panicum maximum (C₄) e *Stylosanthes capitata* (C₃)

7. RESULTADOS (Experimento II)

Assim como no experimento I, durante o experimento II os dados da temperatura do dossel das plantas evidenciaram o aquecimento do ar nas parcelas submetidas aos tratamentos eT e eC+eT (Figura 33).

Figura 33. Média das temperaturas do dossel registradas pelos termômetros infravermelhos em todas as parcelas experimentais durante 17 dias do período experimental (01 a 17 de setembro de 2013).

7.1.1. Emissão de CO₂, temperatura e umidade do solo

A Tabela 2 mostra os valores médios da emissão de CO₂, por dia e horário nos diferentes tratamentos. A média de tais valores independentemente do dia e horário de medição se encontrada representa na figura 34. Esses dados também foram plotados em diversos gráficos para uma melhor visualização da variação dessa resposta ao longo do tempo e de acordo com cada tratamento (Figura 35).

Figura 34. Emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) nos dois horários (n=4). Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p < 0,1$).

De modo geral, ao longo do experimento houve diferença significativa quanto à emissão de CO₂ do solo nos dois tratamentos nos quais o aquecimento estava presente (eT e eC+eT) em comparação com os tratamentos sem aquecimento (controle e eC) (Figura 34). Quando a análise foi separada por dias e horários de medição, foi encontrada uma diferença significativa apenas no último dia de tratamento às 18 horas ($p = 0,02136$) (Figura 35). Além disso, observou-se que o horário de medição (12 e 18 horas) não foi significativo no padrão das respostas (Figura 35 e Figura 36).

Quando separados por dias e horários de medição, os dados de emissão de CO₂ do solo apresentaram certas variações nos dias de medição entre todos os dias, sendo que o menor valor foi de $0,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 1º dia e o maior de $7,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 8º dia. Em relação aos horários de medição houve uma variação que alcançou $5,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ às 12 horas e $6,89 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ às 18 horas. Assim, ao longo do experimento, foi verificado que a respiração do solo se manteve relativamente uniforme entre os tratamentos, sendo que nos tratamentos eT e eC+eT houve um aumento significativo nas taxas de emissão de CO₂ ao final do período experimental (Figura 35).

Figura 35. Médias da emissão de CO₂ do solo (μmol m⁻² s⁻¹) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) nos diferentes dias de medição ao longo de 25 dias em dois horários, 12 e 18 horas. Cada ponto representa a média (± erro padrão) de cada tratamento naquele horário e tratamento (n=4). Diferenças significativas indicadas pelo valor p<0,1 e valor F.

Figura 36. Médias da emissão de CO₂ do solo (μmol m⁻² s⁻¹) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) ao longo de 25 dias, separadas por horário (12 e 18h). Cada ponto representa a média (± erro padrão) de cada tratamento naquele dia e horário (n=4).

A fim de melhor ilustrar o comportamento das respostas de respiração do solo ao longo de todo experimento, foram consideradas ambas as medições de cada dia (Figura 37). Desde o 1º até o 25º dia experimental é possível notar uma tendência ao aumento nas taxas de emissão de CO₂ do solo em todos os tratamentos ao longo do tempo, mas principalmente nos tratamentos com aquecimento, eT e eC+eT.

Figura 37. Médias da emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento (eT) e ambos (eC+eT) ao longo do tempo com duas medições por dia (12 e 18h). Cada ponto representa a média ($\pm$ erro padrão) de cada tratamento naquele dia e horário (n=4).

Ao longo do experimento, a emissão de CO₂ do solo foi mensurada juntamente com a temperatura e umidade do solo, cujas variações entre tratamentos ao longo do período experimental encontram-se detalhadas nas Figuras 38 a 41.

Figura 38. Temperatura do solo (°C) nos tratamentos controle, com elevado CO₂ (eC), com aquecimento de 2°C (eT) e com ambos (eC+eT) ao longo de 30 dias de experimento.

Figura 39. Média da temperatura do solo (°C) nos tratamentos controle, de elevado CO₂ (eC), de aquecimento de 2°C (eT) e ambos (eC+eT). Diferenças significativas são indicadas por letras minúsculas diferentes ($p < 0,1$).

Figura 40. Umidade do solo (m³ m⁻³) nos tratamentos controle, com elevado CO₂ (eC), com aquecimento de 2°C (eT) e com ambos (eC+eT) ao longo dos 30 dias de experimento.

Figura 41. Média da umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) nos tratamentos controle, de elevado CO_2 (eC), de aquecimento de 2°C (eT) e ambos (eC+eT) registrada durante as medições de emissão de CO_2 do solo. Ausência de diferença estatística significativa ($p>0,1$).

Enquanto a temperatura do solo referente aos tratamentos com elevada temperatura (eT e eC+eT) mostrou ser significativamente diferente dos outros (Figura 39), a umidade do solo abrangeu valores aproximados de 0,40 a 0,55, não apresentando um padrão ou resposta específica quanto aos diferentes tratamentos (Figura 41).

7.1.2. Relações entre a emissão de CO_2 , a temperatura e a umidade do solo

Foram analisadas as possíveis correlações entre as três variáveis analisadas nas três últimas medições, que correspondem ao 15°, 22° e 25° dias de experimento (Figuras 42 a 44). Há evidência de correlação positiva entre a emissão de CO_2 e a temperatura do solo (Figura 42), enquanto que entre a emissão de CO_2 e a umidade do solo apenas um dia e um horário mostraram uma correlação negativa significativa (Figura 43). Em relação à temperatura e à umidade do solo, não foi encontrada significância nas correlações, apesar de uma clara tendência na redução da umidade conforme o aumento da temperatura (Figura 44).

Figura 42. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a temperatura do solo ($^{\circ}\text{C}$) por dia e horário de medição (15°, 22° e 25° dias de experimento). Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p < 0,1$).

Figura 43. Correlações entre a emissão de CO₂ do solo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a umidade do solo ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) por dia e horário de medição (15°, 22° e 25° dias de experimento). Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Significância indicada nos gráficos pelo valor p ($p < 0,1$).

Figura 44. Correlações entre a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade do solo (m^3m^{-3}) por dia e horário de medição (15°, 22° e 25° dias de experimento). Cada ponto representa a média obtida por parcela experimental. Ausência de significância ($p > 0,1$).

7.1.3. Análise enzimática do solo

A partir de amostras de solo foram verificadas as atividades enzimáticas das enzimas β -glicosidase (Figura 45), desidrogenase (Figura 46) e urease (Figura 47), relacionadas ao ciclo do C e do N no solo:

As enzimas envolvidas no ciclo do C (hidrólise da celulose e reações oxidativas de substratos orgânicos) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A β -glicosidase apresentou valores próximos a 200 mg de p-nitrofenil/kg de solo seco por hora em todos os tratamentos, enquanto a desidrogenase apresentou valores próximos a 1,0 g de trifetilformazan/kg de solo seco por hora. A urease, enzima responsável pela disponibilização do N no solo (hidrólise da uréia), apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 47). Os fatores CO_2 e temperatura influenciaram nas taxas da atividade máxima, elevando-a em ambos os tratamentos eC e eT em aproximadamente 111% comparados ao controle (9 g de $\text{N-NH}_4/\text{kg}$ de solo seco por hora). O mesmo ocorreu com o tratamento combinado com aquecimento e elevado CO_2 , sendo este o tratamento que apresentou uma maior atividade máxima desta enzima, chegando a um aumento de 200% em relação ao controle.

Figura 45. Atividade máxima da enzima β -glicosidase (mg de p-nitrofenil/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), elevado CO_2 (eC) e ambos (eT+eC). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,1$).

Figura 46. Atividade máxima da enzima desidrogenase (g de trifetilformazan/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle, aquecimento em 2°C (eT), elevado CO₂ (eC) e ambos (eT+eC). Ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,1$).

Figura 47. Atividade máxima da enzima urease (g de N-NH₄/kg de solo seco por hora) nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), elevado CO₂ (eC) e ambos (eT+eC). Diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas por letras minúsculas diferentes ($F_T p = 0,0425$).

7.1.4. Análise isotópica de C e N

Foram analisadas as folhas de *S. capitata* e *P. maximum*. Diferenças significativas foram observadas nos teores de C em *P. maximum* e principalmente nos teores de N em *S. capitata* nos tratamentos com elevado CO₂, que decaíram ao longo do tempo. Mas, de modo geral, o teor de C se manteve constante, com um total de 40 a 43% e o teor de N englobou uma faixa de 2,5 a 5% da biomassa das folhas de ambas as espécies (Figura 48).

Figura 48 . Teores de C e N expressos em porcentagem (%) em amostras de folha de *S. capitata* e *P. maximum* nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), de elevado CO₂ (eC) e de aquecimento e elevado CO₂ (eC+eT) durante a primeira semana de experimento. A partir do dia zero, as coletas foram de seis em seis horas nos primeiros três dias, depois de doze em doze horas nos próximos quatro dias e por fim de dois em dois dias até o final do experimento. Cada círculo representa a média de cada tratamento naquele período (n=4). Em *P. maximum*, houve diferença significativa no teor de C ($F_{CO_2} p = 0,434$ e $F_T p = 0,439$) e em *S. capitata*, no teor de N ($F_{CO_2} p = 7,10^{-11}$ e $F_T p = 7,86^{-10}$).

Os dados obtidos a partir da análise isotópica de $\delta^{13}C$ demonstram a composição isotópica de C discrepante entre as espécies *S. capitata* (C₃) e *P. maximum* (C₄). Os valores normalmente encontrados em plantas C₃ estão na faixa de -25‰ e -30‰, o equivalente ao valor obtido experimentalmente (Figura 49). Nas plantas C₄, por sua vez, observam-se valores que variam entre -10‰ e -15‰, evidenciando uma menor discriminação isotópica de ^{13}C do que em plantas C₃. Nota-se que os valores $\delta^{13}C$ de ambas as espécies diminuem de modo significativo nos tratamentos onde a concentração de CO₂ atmosférica foi de 600 ppm.

Com relação aos valores $\delta^{15}\text{N}$, estes variaram bastante entre os tratamentos nas espécies vegetais estudadas (Figura 49). Em *S. capitata*, o $\delta^{15}\text{N}$ apresentou valores positivos em todas as análises (de 2 a 5‰), enquanto em *P. maximum*, além de menores valores em relação à *S. capitata*, também foram encontrados valores negativos (de -1 a 3‰). De modo geral, não foi identificado um padrão quanto a variabilidade destes valores entre os tratamentos aplicados, tamanha a complexidade que envolve a composição isotópica do N nas plantas terrestres e a ausência de informações adicionais relacionadas ao ciclo do N.

Figura 49. Composição isotópica de C e N em amostras de folha de *S. capitata* e *P. maximum* nos tratamentos controle, de aquecimento em 2°C (eT), de elevado CO₂ (eC) e de aquecimento e elevado CO₂ (eC+eT) durante a primeira semana de experimento. A partir do dia zero, as coletas foram de seis em seis horas nos primeiros três dias, depois de doze em doze horas nos próximos quatro dias e por fim de dois em dois dias até o final do experimento. Cada círculo representa a média de cada tratamento naquele período (n=4). Em *P. maximum* houve diferença estatística significativa quanto ao $\delta^{13}\text{C}$ ($F_{\text{CO}_2} p = 2^{-16}$), assim como em *S. capitata* ($F_{\text{CO}_2} p = 2^{-16}$).

7.1.5. Interação dos fatores CO₂ e temperatura

A representação gráfica da interação entre os fatores CO₂ e temperatura é de extrema valia para a compreensão do modo como ambos interagem entre si dependendo da variável resposta analisada. Foram analisadas as variáveis: emissão de CO₂ do solo (Figura 50), atividade enzimática do solo (Figura 51) e os valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, %C e %N das duas espécies vegetais (Figura 52).

A relação entre os fatores CO₂ e temperatura em função das taxas respiratórias do solo mostra que, quando não há CO₂ elevado, a resposta à temperatura elevada é evidentemente maior. Com a presença do tratamento de elevado CO₂, essa resposta à elevada temperatura é ainda mais intensa, indicando uma possível dependência da resposta à temperatura em relação à concentração de CO₂ atmosférico na emissão de CO₂ do solo (Figura 50).

Figura 50. Gráfico que representa a resposta de emissão de CO₂ em relação aos dois níveis dos fatores temperatura (T) e CO₂ (C), sendo amb=ambiente e e=elevado ($F_{\text{CO}_2 \times \text{T}}$ $p = 0,248$).

De acordo com os gráficos obtidos a partir dos dados enzimáticos, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas significativas na interação entre os fatores, pode-se observar graficamente a influência de ambos na atividade das enzimas analisadas (Figura 51). No caso da β -glicosidase, há uma tendência de interação entre os fatores porque não houve diferença entre os tratamentos controle e aquecimento sob CO₂ ambiente, mas houve diferença sob elevado CO₂. Em relação à desidrogenase também há a indicação de interação, uma vez que há uma queda na atividade quando o CO₂ é elevado, porém esta atividade é

sustentada em altas taxas quando sob elevada temperatura. Por fim, a urease apresenta maior atividade tanto nos tratamentos com aquecimento, quanto sob elevado CO_2 , mas aparentemente esta atividade aumenta de maneira independente, não evidenciando uma interação entre temperatura e CO_2 .

Figura 51. Gráficos que representam a atividade enzimática do solo de β -glicosidase ($F_{\text{CO}_2 \times \text{T}} p = 0,379$), desidrogenase ($F_{\text{CO}_2 \times \text{T}} p = 0,632$) e urease ($F_{\text{CO}_2 \times \text{T}} p = 0,792$) em relação aos dois níveis de temperatura (T) e CO_2 (C), sendo amb=ambiente e e=elevado.

Em relação aos dados isotópicos de C e N encontrados em ambas as espécies vegetais, os fatores CO_2 e temperatura apresentaram diferentes formas de interação na maioria dos parâmetros analisados, os quais não se restringiram apenas à interações aditivas (Figura 52). Observa-se que o CO_2 intensificou as respostas à temperatura em ambos os tratamentos quando as variáveis analisadas foram o teor de C nas C_4 e o teor de N e o $\delta^{15}\text{N}$ em C_3 . Por

outro lado, o CO₂ inverteu a resposta à temperatura em ambos tratamentos quando foram analisadas o teor de N em C₄ e de C em C₃. Tanto em C₃ como em C₄, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ decresceram proporcionalmente nas duas espécies quando sob elevado CO₂. Dessa forma, em *S. capitata*, há indicação da interação entre o CO₂ com a temperatura quanto aos parâmetros $\delta^{15}\text{N}$ e %C, enquanto em *P. maximum*, quanto aos parâmetros %C e %N.

Figura 52. Gráficos que representam a resposta das variáveis relacionadas ao C e N em relação aos dois níveis dos fatores temperatura (T) e CO₂ (C), sendo amb=ambiente e e=elevado, nos parâmetros δ¹³C em folhas de *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,844) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,163), δ¹⁵N em *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,719) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,191), %C em *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,196) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,028) e %N em *P. maximum* (F_{CO2xT} p = 0,153) e *S. capitata* (F_{CO2xT} p = 0,143). O gráfico em função do valor do δ¹⁵N de *P. maximum* não mostrou a reta com linha contínua pela falta de padrão dos valores nos diferentes tratamentos.

DISCUSSÃO: EXPERIMENTO II

7.2. DISCUSSÃO (Experimento II)

As hipóteses levantadas por este trabalho foram corroboradas com os resultados deste capítulo, sendo que o aquecimento intensificou a atividade das raízes e microrganismos do solo (efeito *priming*), contribuindo para o aumento da E_s . A elevada concentração de CO_2 associada ao aquecimento também mostrou um aumento nas taxas de respiração do solo, alterando os parâmetros relacionados ao N, e consequentemente, sua disponibilidade no solo.

Do mesmo modo como pôde ser observado no experimento I, as temperaturas do solo deste experimento II também apresentaram um incremento de $1^\circ C$ nas parcelas submetidas ao tratamento de aquecimento. No entanto, a umidade do solo se manteve relativamente uniforme durante todo o experimento provavelmente devido à água adicional proveniente da irrigação, evitando a ocorrência de um possível estresse hídrico nas espécies vegetais.

Dessa forma, as respostas ao aquecimento se deram primeiramente pela respiração do solo, possivelmente em associação com o crescimento de raízes e a decomposição da matéria orgânica do solo (Bardgett et al., 2008; Allison et al., 2010; Lu et al., 2013). Segundo os resultados referentes às taxas respiratórias do solo, juntamente com a análise isotópica de C e N, nota-se que, os efeitos diretos do aquecimento se relacionam com a temperatura do solo e os efeitos indiretos com o ciclo do N e sua disponibilidade no solo, com uma forte influência no ciclo do C, assim como já observado em outros trabalhos (Wood et al., 2012; Novem Auyeung et al., 2013).

A E_s foi significativamente maior nos tratamentos com aquecimento (eT e eC+eT), o que está de acordo com a literatura relacionada, uma vez que o fator temperatura é um importante controlador da dinâmica de liberação de CO_2 dos solos, especialmente por estimular a respiração das raízes (Kuzyakov, 2001). Em uma metanálise com 32 experimentos com aquecimento foi visto que a respiração do solo aumentou cerca de 20% em função de temperaturas mais elevadas (Field, 2007), enquanto no presente trabalho houve um aumento superior a 30% em ambos os tratamentos com aquecimento.

Assim, os resultados encontrados na respiração do solo indicam que o efeito da temperatura foi predominante, pois propiciou uma diferença significativa nos tratamentos eT e eC+eT, especialmente nas últimas medições ao longo do tempo. Além da temperatura, houve indicação de uma influência do CO_2 nos tratamentos com aquecimento, uma vez que o CO_2 intensificou a atividade respiratória do solo nos tratamentos com aquecimento, apontando uma possível interação positiva entre temperatura e CO_2 .

Uma das possíveis explicações para os resultados encontrados nas taxas respiratórias do solo está associada à taxa fotossintética das plantas. Medições da taxa de assimilação líquida de CO₂ em *P. maximum* realizadas neste mesmo experimento indicaram um aumento significativo na taxa fotossintética nas plantas submetidas ao aquecimento e ao elevado CO₂ em relação ao controle (Bianconi, 2014). Isso porque a sensibilidade da produção de CO₂ à fotossíntese parece provocar o acoplamento entre processos da parte aérea e subterrânea da planta, uma vez que os produtos assimilados pela fotossíntese são transportados para as raízes e microrganismos da rizosfera apenas poucas horas após serem fixados como CO₂ (Kuzyakov, 2001). Além disso, o CO₂ derivado das raízes é o principal componente da taxa total de CO₂ respirado pelo solo quando este possui cobertura vegetal. Outro estudo também aponta que a atividade fotossintética da planta influencia não somente o componente autotrófico do solo, mas também os componentes heterotróficos, em diferentes escalas (Gomez-Casanovas, 2012).

Assim, a interrelação entre a fotossíntese e a atividade microbiológica do solo sugere que os exsudatos produzidos pela raiz podem ser os agentes responsáveis pela estimulação da decomposição da rizosfera pelos microrganismos (efeito *priming*), assim como a renovação de C das raízes e a quebra de agregados do solo pelas raízes, podendo tornar as respostas da respiração do solo às taxas fotossintéticas até mais sensíveis do que à temperatura do solo (Kuzyakov, 2001; Chapin, 2009). Apesar de já reconhecida a estimulação da exsudação das raízes em plantas sob aquecimento, não se sabe ainda quantificar como o aquecimento influencia na decomposição da matéria orgânica e no ciclo do N (Yin et al., 2013).

Há trabalhos que mostraram que, após a fumigação de CO₂, pode não haver diferenças significativas possivelmente devido à limitação de N no sistema pela competição entre plantas e microrganismos (Bowes, 1993; Wood, 1994; Lichter, 2005). Assim, durante este curto período de tempo, uma tendência na redução das taxas respiratórias do solo sob elevado CO₂ indica possíveis alterações no ciclo de nutrientes, as quais, em um cenário com elevadas concentrações atmosféricas de CO₂, podem restringir a decomposição da matéria orgânica, acumulando o C excedente no solo.

Consistente com o incremento de biomassa das raízes observado neste mesmo experimento (Bianconi, 2014) associado a um possível aumento na exsudação das raízes, o aquecimento teria intensificado o ciclo do N, acelerando as reações enzimáticas e propiciando maiores taxas de mineralização, nitrificação e desnitrificação de N, o que já foi encontrado em outro estudo (Yin, 2013). A resposta da comunidade microbiana ao aquecimento também é muito variável, podendo diferir entre solos até mesmo de diferentes latitudes (Bekku et al.,

2003). Assim, o efeito *priming* provocado pela entrada de C adicional oriundo da planta e a disponibilidade de N no solo respondem de maneira diferenciada segundo os grupos funcionais.

Mais recentemente, tem sido sugerido que o efeito *priming* na decomposição da matéria orgânica e na mineralização do N pode ser entendido como a causa do aumento no fornecimento de N para a planta sob elevado CO₂, mas ainda não está claro se tais efeitos persistem após o período inicial de perturbação do solo e como se relacionam com a produtividade da planta e a atividade das raízes (Reich et al., 2006; Dijkstra & Cheng, 2007). De qualquer forma, a estimulação da decomposição da matéria orgânica e a intensificação no ciclo do N têm se revelado um importante mecanismo para explicar um aumento na produtividade em alto CO₂ (Yin et al., 2013).

Quanto às análises isotópicas de C e N nas folhas das espécies estudadas, os resultados mostram que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados estão de acordo com a literatura, segundo a qual há, de fato, uma discriminação diferenciada dos átomos de ^{13}C devido aos diferentes caminhos bioquímicos da fotossíntese tomados por plantas C₃ e C₄ (Martinelli et al., 2009), conforme verificado por meio das diferentes composições isotópicas encontradas em *S. capitata* e *P. maximum*.

Além disso, diferentemente do experimento I, no experimento II já há uma indicação de que ajustes fisiológicos começaram a ser realizados por ambas as espécies, uma vez que houve redução do $\delta^{13}\text{C}$ logo após o início da injeção de CO₂. Em outros trabalhos, essa variação têm sido relacionada a outros parâmetros, como a eficiência do uso da água, a condutância estomática e as concentrações externa e interna de CO₂ nas folhas (Della Coletta, Nardoto et al., 2009; Seibt, 2008). Uma simplificação da relação entre o $\delta^{13}\text{C}$ e a condutância estomática, seria que, quanto maior a condutância, menor a discriminação e quanto menor a condutância, maior a discriminação, ou seja, menos ^{13}C . A menor discriminação de ^{13}C pode ter decorrido em função da menor condutância estomática das folhas, a qual pode ter sido provocada pela maior quantidade de CO₂ disponível para o processo fotossintético (Swap et al., 2004; Bianconi, 2014).

Sabe-se que há, de fato, uma diminuição no valor do $\delta^{13}\text{C}$ (menos negativo) da planta sob condições de elevado CO₂ (Libby, 1972; Seibt, 2008). Isso também ocorre porque o aumento na concentração de CO₂ para 600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ no ar atmosférico diminui o $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ do ar, tornando-o mais negativo. Como a fonte de CO₂ é mais empobrecida em ^{13}C em relação ao ar, ou seja, há uma menor discriminação do ^{13}C , uma vez que a fonte (tanque de

CO₂) apresenta $\delta^{13}\text{C}$ de -33‰ e o ar apresenta $\delta^{13}\text{C}$ de -8‰. Isso significa que, em altas concentrações de CO₂, o ar das plantas é resultante da mistura entre tais composições isotópicas, com $\delta^{13}\text{C}$ aproximado de -21‰. Assim, o C fixado antes e após o início do experimento apresenta uma diferença de aproximadamente 13‰, se mostrando um excelente marcador ao permitir a mensuração do C “novo” assimilado que é direcionado para a biomassa ou liberado pelo processo de respiração (Ehleringer et al., 2002; Taneva et al., 2006).

Sendo assim, mesmo possuindo vias fotossintéticas diferentes e, portanto, discriminação isotópica diferenciada do ^{13}C , as plantas tanto C₃ como C₄ mostraram valores de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos nas folhas, decrescendo por volta do 3º dia do experimento. Devido ao fato destas análises apontarem um decréscimo semelhante nos tratamentos com elevado CO₂ (eC e eC+eT), mas não no tratamento controle e com aquecimento (eT), há a indicação de que a temperatura não interferiu nesta resposta específica ao CO₂, uma vez que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ se mostraram mais negativos ao longo do tempo nos tratamentos com elevado CO₂. De qualquer modo, o tipo de amostragem realizado e o curto período de tempo para repetição do experimento não possibilitou uma análise mais profunda e consistente sobre o comportamento detalhado do $\delta^{13}\text{C}$ em ambas as espécies sob elevado CO₂.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ se mostraram bem variáveis entre os tratamentos e ao longo do tempo. Como no experimento I, uma inferência possível de ser feita a respeito da diferença do valor isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas C₃ e C₄ está relacionada à ocorrência do processo de fixação de N atmosférico pelas leguminosas C₃. Nas plantas C₃, o $\delta^{15}\text{N}$ varia entre zero ($\delta^{15}\text{N}$ da atmosfera) e o valor isotópico do solo, os quais são normalmente positivos. Por esta razão, o $\delta^{15}\text{N}$ destas plantas fixadoras de N também é sempre positivo. Assim, por simples comparação com as plantas não fixadoras de N, o valor isotópico de ^{15}N das leguminosas diferiu das não-leguminosas, indicando diferenças quanto ao metabolismo de N entre ambas.

Em outro estudo realizado em ambiente tropical, as plantas C₄ também apresentaram o $\delta^{15}\text{N}$ menor do que as C₃ (Aranibar et al., 2008). Neste trabalho, são indicadas possíveis diferenças no ciclo do N entre ambas, como na absorção de N pela planta na forma de nitrato ou amônia. Estes dois tipos de planta poderiam utilizar preferencialmente um ou outro tipo de fonte de N, podendo inclusive influenciar na composição isotópica dos solos (Aranibar et al., 2008). De qualquer forma, é aceito que ecossistemas ricos em nutrientes tendem a ser mais enriquecidos com ^{15}N quando o ciclo de N está mais aberto a perdas, como por desnitrificação ou lixiviação (Swap et al., 2004).

Sob o foco do elevado CO₂ neste estudo, também não foram encontrados diferentes padrões do $\delta^{15}\text{N}$ entre plantas C₃ e C₄ como sugere a revisão feita com outros experimentos FACE (Bassiridad et al., 2003). Uma possível causa para o decaimento do $\delta^{15}\text{N}$ em um ambiente rico em CO₂ seria uma maior entrada de N no sistema proveniente da fixação de N₂ atmosférico, sendo as espécies C₃ fixadoras mais responsivas ao CO₂ que as C₄ (Bassiridad et al., 2003).

O teor de C nas plantas apresentou valores próximos de 40% de C nas folhas de ambas as plantas, uma vez que, durante o processo fotossintético, estas assimilam o CO₂ atmosférico incorporando o C em sua biomassa tanto em C₃ como em C₄. No entanto, de acordo com a literatura, o elevado CO₂ atmosférico pode intensificar principalmente a resposta de crescimento de plantas C₃, especialmente devido ao fato destas não possuírem o mecanismo fotossintético de concentração interna de CO₂ como as espécies C₄ (Long, 2006; Xu, 2013). De fato, análises quantitativas de diferentes estudos mostraram que o elevado CO₂ estimula o rendimento e a biomassa de plantas C₃ não-leguminosas, leguminosas e de plantas C₄ em 11-31%, 14-54%, e 18-27%, respectivamente (Lam et al., 2012). Como os tratamentos com aquecimento demonstraram uma maior taxa da assimilação de CO₂ do que o controle (Bianconi, 2014), acredita-se que o fator temperatura tenha sido o principal estimulador do crescimento vegetal e produção de biomassa, interagindo positivamente com o fator CO₂ de modo a aumentar o teor de C foliar nos tratamentos com elevado CO₂.

Outro efeito relacionado ao elevado CO₂, como já mencionado anteriormente, seria o estímulo do crescimento e biomassa das raízes, conforme observado no mesmo experimento (Bianconi, 2014). Esta resposta estaria possivelmente ligada a três efeitos. O primeiro seria a maior demanda de recurso nutricional no solo como resultado do crescimento das plantas, seguido pela maior quantidade de C disponível para ser alocado para as raízes e, por fim, uma disponibilidade de recursos limitada como resultado da competição entre as plantas e da atividade microbiana (Iversen, 2010). Todos estes fatores acarretam na capacidade das raízes em afetar as atividades microbianas, ao exsudarem substâncias ricas em C orgânico facilmente metabolizadas pelos microrganismos e também ao alterar a físico-química do solo (pH, estrutura do solo, fluxo de água); regulando assim a emissão de CO₂ do solo (Kuzyakov, 2001).

Apesar do ciclo do C estar envolvido diretamente nas respostas metabólicas do solo, a disponibilidade de N é um fator que limita fortemente a resposta da produtividade ao elevado CO₂. Por isso, as leguminosas, em especial, são capazes de alcançar um grande aumento na

produtividade e manter sua taxa C/N no tecido sob elevado CO₂ ao conseguirem alocar o C adicional nos nódulos fixadores de N, ampliando a disponibilidade deste nutriente para investimento no seu crescimento total (Lam et al., 2012; Leakey & Lau, 2012). Embora as plantas C₃ disponham da fonte adicional de N₂ atmosférico e tenham dado indícios de utilizar esta outra fonte de acordo com os dados isotópicos de ¹⁵N, a tendência no acúmulo de N no tecido foliar vegetal ao longo do experimento não se mostrou significativamente discrepante entre as duas espécies. Isso talvez porque, considerando os diversos processos que atuam na acumulação líquida de N, como a fixação biológica, a retenção de N atmosférico depositado, a redução da perda de N gasoso e líquido e o crescimento estendido das raízes que para zonas livres de raízes para absorção de N, é de fato difícil prever o seu acúmulo no tecido foliar (Luo et al., 2006). Como não foi possível a verificação da ocorrência da nodulação, considerou-se também a possibilidade de não ter havido a formação de nódulos simbióticos, uma vez que capacidade de nodulação desta espécie é considerada baixa segundo o livro “*Stylosanthes no Brasil*” (Ferreira, 1979).

Dentre todos os tratamentos, aquele com elevado CO₂ (eC) apresentou uma tendência na redução do teor de N nas folhas, aliada a uma possível interação do CO₂ com temperatura, uma vez que nos tratamentos de aquecimento houve uma maior proporção de N foliar do que no tratamento controle em C₃. Porém, tanto em C₃ quanto em C₄, o CO₂ tendeu a reduzir a resposta positiva da concentração do N foliar à temperatura mais elevada. Uma vez que a absorção de nutrientes é maior em condições de elevado CO₂, essas plantas podem ter aumentado a eficiência no uso do N e, conseqüentemente, passaram a concentrar menos N no tecido foliar (Bowes, 1993). Assim, se o elevado CO₂ diminui a disponibilidade de N e/ou aumenta os níveis de C na biomassa, pode haver um menor teor de N na folha, levando a um *feedback* negativo na capacidade fotossintética (Reich et al., 2006).

Outro processo relacionado ao ciclo do N é a decomposição. Como a atividade de enzimas dos ciclos do C e N geralmente é correlacionada com o C orgânico total do solo ou com os níveis de matéria orgânica, as análises enzimáticas realizadas puderam revelar principalmente os processos de mineralização de N. No presente estudo não houve evidências de alterações na atividade das enzimas ligadas diretamente ao ciclo do C, a β -glicosidase e a desidrogenase. No entanto, a urease mostrou-se elevada em todos os tratamentos exceto o controle, apontando um metabolismo diferenciado do N do solo em resposta ao CO₂ e ao aquecimento. Em estudo recente, níveis reduzidos de mineralização de N indicaram que o N pode ser um fator limitante na decomposição da matéria orgânica em ambientes com uma

grande entrada de C, seja pelo aumento do CO₂ ou pelo próprio clima (Chapin, 2009). Assim, a atividade microbiológica elevada seria resultado do aumento de entrada de C, o que poderia limitar o armazenamento de C no solo em longo prazo caso a disponibilidade de N se torne baixa (Wood, 1994).

Como a regulação da capacidade das plantas em absorver N pode ter uma grande influência no sequestro de C esperava-se que, uma vez acelerada a cinética desse processo sob alto CO₂, os solos pudessem adquirir uma maior capacidade de armazenar C. Os dados obtidos reforçam a hipótese já reconhecida na literatura, denominada “Limitação Progressiva de N” (*Progressive Nitrogen Limitation*), a qual sugere que há a perda de N disponível em alto CO₂, ou seja, sem uma entrada adicional de N ou uma redução na perda de N, a disponibilidade de N ao longo do tempo decresce, levando a menor absorção de N (Luo, 2004; Arndal, 2013). Assim, os efeitos benéficos diretos proporcionados pelas altas concentrações de CO₂ atmosférico e pelo aquecimento no crescimento vegetal e no armazenamento de C no solo podem ser neutralizados caso haja uma limitação do N em ecossistemas tropicais naturais sob essas condições.

CONCLUSÃO:

EXPERIMENTO II

7.3. CONCLUSÃO (Experimento II)

As respostas ao aquecimento se mostraram evidentes nos dados de respiração do solo, possivelmente em associação com o crescimento de raízes e a decomposição da matéria orgânica do solo (efeito *priming*), ambos estimulados pelo aumento da temperatura do solo. Os menores valores de $\delta^{13}\text{C}$ evidenciaram que as respostas ao CO_2 estão associadas principalmente com processos fisiológicos da parte aérea das plantas, como a fotossíntese e crescimento vegetal, sendo estes (assim como o $\delta^{15}\text{N}$) importantes traçadores e indicadores fisiológicos em estudos ambientais. Em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$, não foram encontradas diferenças significativas tanto nas plantas C_3 como nas C_4 , possivelmente devido à amostragem e ao curto intervalo de tempo do estudo. A tendência na redução do teor de N causada pelo elevado CO_2 nas folhas de ambas as espécies e o aumento deste pelo aquecimento, além do aumento observado da atividade enzimática da urease, indicam que os efeitos das mudanças climáticas futuras no balanço global de C terrestre estão relacionados primariamente ao ciclo do N.

CONCLUSÃO GERAL

8. CONCLUSÃO GERAL

Assim como os efeitos diretos provocados pelos tratamentos de aquecimento e de elevado CO_2 , os efeitos indiretos também têm grande potencial em influenciar processos fisiológicos das plantas. São esses a temperatura, umidade e disponibilidade de N no solo, os quais se diferem quanto à sua sensibilidade ao CO_2 e à temperatura. Por afetarem diferentes processos fisiológicos de diferentes formas, dependendo da variável analisada a interação entre CO_2 e temperatura pode ocorrer de modo discrepante, compensando (*feedback* negativo) ou intensificando (*feedback* positivo) os efeitos relacionados ao sequestro de C (Figura 59).

Figura 53. Esquema demonstrativo dos possíveis efeitos das mudanças climáticas futuras de acordo com os resultados obtidos nos experimentos I e II. O aquecimento climático e a elevada concentração de CO_2 podem desencadear tanto um *feedback* positivo reduzindo o sequestro de C em longo prazo por meio da estimulação da respiração do solo e crescimento vegetal com limitação de N, como um *feedback* negativo via aumento da disponibilidade de N por meio da fixação biológica.

Ambos os experimentos demonstraram que até mesmo sutis mudanças na temperatura do ar podem alterar a temperatura e umidade do solo e, dessa forma, processos fisiológicos intrínsecos realizados por ambas as espécies forrageiras estudadas e pelos microrganismos do solo podem ser alterados de forma significativa. Diferentemente do experimento I, no experimento II a irrigação do solo pode ter deixado de evidenciar as respostas ao aquecimento

devido à não interferência da menor umidade do solo (como foi encontrada no experimento I) nos processos do solo, como a tendência ao aumento da atividade enzimática verificada no experimento II.

Como observado nas análises enzimáticas (urease) tanto no experimento I como no II, o ciclo do N responde mais rapidamente aos fatores ambientais, alterando os processos realizados no solo. Assim, o N mostrou ter papel fundamental no desenvolvimento das plantas e na manutenção da vida no solo, e por isso, pode interferir no ciclo do C de modo drástico, o que deverá ser verificado apenas em estudos de longo prazo. Dependendo das espécies que compõem a cobertura vegetal, pode haver uma limitação do N no solo, impedindo que haja um efeito benéfico no crescimento e produtividade das plantas devido à uma entrada adicional de C no ecossistema.

Além da importância ecológica, este estudo abre espaço para futuros estudos que possam abordar de modo relevante as implicações sócio-econômicas da mudança climática global em espécies vegetais economicamente importantes, considerando-se que o entendimento de tais processos pode acarretar no desenvolvimento de estratégias que permitam a maior produtividade de plantas utilizadas tanto como forragem como na indústria alimentícia e produção de bioenergia.

PERSPECTIVAS FUTURAS

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Enquanto muitos estudos têm examinado como as transformações de N do solo respondem ou ao aquecimento ou aos diferentes padrões de precipitação, muito poucos examinaram tais respostas à diferentes combinações destes fatores. Dado que a respiração do solo é uma combinação resultante do metabolismo das plantas e dos microrganismos e que cada um deles responde de forma discrepante e única, é essencial analisar ambos fatores abióticos (temperatura e umidade) afetando a respiração do solo total e parcial. Isso requer o isolamento de processos ligados às raízes e aos microrganismos, assim como o monitoramento contínuo da temperatura, da umidade e da produção de CO₂, uma vez que alterações no ciclo global da água em resposta ao aquecimento durante o século 21 não serão uniformes, de acordo com o último relatório divulgado pelo IPCC (2013).

Enquanto o tratamento de aquecimento se mostrou como um cenário mais brando, o tratamento de seca pode intensificar as respostas do ecossistema, sendo estas mais drásticas do que outros cenários de mudanças climáticas. Perspectivas futuras que envolvam a investigação de como as transformações de N respondem a multifatores ambientais em longo prazo indica que novos estudos neste sentido são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, E. A., DAVEY, P. A., HYMUS, G. J., OSBORNE, C. P., ROGERS, A., BLUM, H., NÖSBERGER, J. & LONG, S. P. 2003. Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilization levels under Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant, Cell & Environment*, 26, 705-714.

AINSWORTH, E. A. & LONG, S. P. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist*, 165, 351-372.

AINSWORTH, E. A. & ROGERS, A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell & Environment*, 30, 258-270.

AINSWORTH, E. A., BEIER, C., CALFAPIETRA, C., CEULEMANS, R., DURAND-TARDIF, M., FARQUHAR, G. D., GODBOLD, D. L., HENDREY, G. R., HICKLER, T., KADUK, J., KARNOSKY, D. F., KIMBALL, B. A., KOERNER, C., KOORNNEEF, M., LAFARGE, T., LEAKEY, A. D. B., LEWIN, K. F., LONG, S. P., MANDERSCHIED, R., MCNEIL, D. L., MIES, T. A., MIGLIETTA, F., MORGAN, J. A., NAGY, J., NORBY, R. J., NORTON, R. M., PERCY, K. E., ROGERS, A., SOUSSANA, J. F., STITT, M., WEIGEL, H. J. & WHITE, J. W. 2008. Next generation of elevated CO₂ experiments with crops: a critical investment for feeding the future world. *Plant Cell and Environment*, 31, 1317-1324.

ALLISON, S. D., WALLENSTEIN, M. D. & BRADFORD, M. A. 2010. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geoscience*, 3, 336-340.

ALVES, B. J. R. Z., L.; JANTALIA, C.P.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. (2005). "Emprego de isótopos estáveis para o estudo do C e do N no sistema solo-planta." *Embrapa-SCT*(Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável): p.343-350.

AMENDOLARA, T. (2011). "Soil Microorganisms and Global Climate Change." <http://www.goucher.edu/academics/verge/past-issues/verge-8/amendolara>.

ANDERSON, W. T., BERNASCONI, S. M., MCKENZIE, J. A. & SAURER, M. 1998. Oxygen and carbon isotopic record of climatic variability in tree ring cellulose (*Picea abies*): An example from central Switzerland (1913-1995). *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, 103, 31625-31636.

ARANIBAR, J. N., ANDERSON, I. C., EPSTEIN, H. E., FERAL, C. J. W., SWAP, R. J., RAMONTSO, J. & MACKO, S. A. 2008. Nitrogen isotope composition of soils, C₃ and C₄ plants along land use gradients in southern Africa. *Journal of Arid Environments*, 72, 326-337.

ARNDAL, M. F., SCHMIDT, I. K., KONGSTAD, J., BEIER, C. & MICHELSEN, A. 2013. Root growth and N dynamics in response to multi-year experimental warming, summer drought and elevated CO₂ in a mixed heathland-grass ecosystem. *Functional Plant Biology*, 41, 1-10.

ATARASHI-ANDOH, M., KOARASHI, J., ISHIZUKA, S. & HIRAI, K. 2012. Seasonal patterns and control factors of CO₂ effluxes from surface litter, soil organic carbon, and root-derived carbon estimated using radiocarbon signatures. *Agricultural and Forest Meteorology*, 152, 149-158.

AYARZA, M., VILELA, L., ALVES, B. J. R., OLIVEIRA, O. C. D., URQUIAGA, S. & BODDEY, R. M. 1997. Introdução de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão em pastagem de *Brachiaria ruziziensis*: influência na produção animal e vegetal. *Embrapa Agrobiologia*, Boletim Técnico 1, 16p.

- BAHN, M., JANSSENS, I. A., REICHSTEIN, M., SMITH, P. & TRUMBORE, S. E. 2010. Soil respiration across scales: towards an integration of patterns and processes. *New Phytologist*, 186, 292-296.
- BAI, E., LI, S., XU, W., LI, W., DAI, W. & JIANG, P. 2013. A meta-analysis of experimental warming effects on terrestrial nitrogen pools and dynamics. *New Phytologist*, 199, 441-451.
- BARDGETT, R. D., FREEMAN, C. & OSTLE, N. J. 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME Journal*, 2, 805-814.
- BASSIRIRAD, H., CONSTABLE, J. V. H., LUSSENHOP, J., KIMBALL, B. A., NORBY, R. J., OECHEL, W. C., REICH, P. B., SCHLESINGER, W. H., ZITZER, S., SEHTIYA, H. L. & SILIM, S. 2003. Widespread foliage $\delta^{15}\text{N}$ depletion under elevated CO_2 : inferences for the nitrogen cycle. *Global Change Biology*, 9, 1582-1590.
- BEKKU, Y. S., NAKATSUBO, T., KUME, A., ADACHI, M. & KOIZUMI, H. 2003. Effect of warming on the temperature dependence of soil respiration rate in arctic, temperate and tropical soils. *Applied Soil Ecology*, 22, 205-210.
- BELAY-TEDLA, A., ZHOU, X., SU, B., WAN, S. & LUO, Y. 2009. Labile, recalcitrant, and microbial carbon and nitrogen pools of a tallgrass prairie soil in the US Great Plains subjected to experimental warming and clipping. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 110-116.
- BIANCONI, M. (2014). "Trocas gasosas foliares e crescimento de uma forrageira C4 tropical no contexto das mudanças climáticas: respostas ao elevado CO_2 e ao aquecimento". Dissertação de mestrado.
- BOWES, G. (1993). "Facing the Inevitable: Plants and Increasing Atmospheric CO_2 ." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44(1): 309-332.
- BOWLING, D. R., PATAKI, D. E. & RANDERSON, J. T. 2008. Carbon isotopes in terrestrial ecosystem pools and CO_2 fluxes. *New Phytologist*, 178, 24-40.
- BUCKERIDGE, M. S. M., L. C.; MACHADO, M. R (2007). "Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de C nas plantas podem afetar o ecossistema?" *Embrapa Florestas* (Fenologia - Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos): Cap 12: 213-230.
- CARRILLO, Y., PENDALL, E., DIJKSTRA, F. A., MORGAN, J. A. & NEWCOMB, J. M. 2011. Response of soil organic matter pools to elevated CO_2 and warming in a semi-arid grassland. *Plant and Soil*, 347, 339-350.
- CASTALDI, S. 2000. Responses of nitrous oxide, dinitrogen and carbon dioxide production and oxygen consumption to temperature in forest and agricultural light-textured soils determined by model experiment. *Biology and Fertility of Soils*, 32, 67-72.
- CHAPIN, F. S., MCFARLAND, J., MCGUIRE, A. D., EUSKIRCHEN, E. S., RUESS, R. W. & KIELLAND, K. 2009. The changing global carbon cycle: linking plant-soil carbon dynamics to global consequences. *Journal of Ecology*, 97, 840-850.
- CHAVES, J. D. S., BARAÚNA, A. C., MOSQUEIRA, C. A., GIANLUPPI, V., SILVA, K. D. & ZILLI, J. E. 2013. Identificação e ocorrência de nodulação em espécies nativas e introduzidas de estilósantes no Cerrado de Roraima. *Embrapa Roraima - Artigos em anais de congresso (ALICE)*, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 34., 2013, Florianópolis. Ciência do solo: para quê e para quem: anais. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013.

- COMMISSION, E. (2011). "SOIL: the hidden part of the climate cycle." *Luxembourg: Publications Office of the European Union*: 20.
- DAVIDSON, E., VERCHOT, L., CATTÂNIO, J. H., ACKERMAN, I. & CARVALHO, J. E. M. 2000. Effects of soil water content on soil respiration in forests and cattle pastures of eastern Amazonia. *Biogeochemistry*, 48, 53-69
- DAVIDSON, E. A. & JANSSENS, I. A. 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440, 165-173.
- DELLA COLETTA, L., NARDOTO, G. B., LATANSIO-AIDAR, S. R., DA ROCHA, H. R., AIDAR, M. P. M. & OMETTO, J. 2009. Isotopic view of vegetation and carbon and nitrogen cycles in a Cerrado ecosystem, Southeastern Brazil. *Scientia Agricola*, 66, 467-475.
- DJUKIC, I., ZEHETNER, F., WATZINGER, A., HORACEK, M. & GERZABEK, M. H. 2013. In situ carbon turnover dynamics and the role of soil microorganisms therein: a climate warming study in an Alpine ecosystem. *Fems Microbiology Ecology*, 83, 112-124.
- DUKES, J. S. & MOONEY, H. A. 1999. Does global change increase the success of biological invaders? *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 135-139.
- EHLERINGER, J. R., BOWLING, D. R., FLANAGAN, L. B., FESSENDEN, J., HELLIKER, B., MARTINELLI, L. A. & OMETTO, J. P. 2002. Stable isotopes and carbon cycle processes in forests and grasslands. *Plant Biology*, 4, 181-189.
- FARQUHAR, G., O'LEARY, M. & BERRY, J. 1982. On the Relationship Between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. *J Functional Plant Biology*, 9, 121-137.
- FERNANDES, C. D., GROF, B., CHAKRABORTY, S. & VERZIGNASSI, J. R. 2005. Estilosantes Campo Grande in Brazil: a tropical forage legume success story. *Tropical Grasslands*, 39, 223-223.
- FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. O Gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 107p. (*Stylosanthes guianensis* var. *canescens*, p.44).
- FERRIO, J. P., VOLTAS, J. & ARAUS, J. L. 2003. Use of carbon isotope composition in monitoring environmental changes. *Management of Environmental Quality: An International Journal*, 14, 82-98.
- FIELD, C. B., LOBELL, D. B., PETERS, H. A. & CHIARIELLO, N. R. 2007. Feedbacks of terrestrial ecosystems to climate change. *Annual Review of Environment and Resources*.
- FIGUEIREDO, M. V. B., H. A. BURITY, et al. 2010. "Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo" In: "Biotecnologia aplicada à agricultura, textos de apoio e protocolos experimentais." *Embrapa Informação Tecnológica (Brasília-DF) e Instituto Agrônomo de Pernambuco (Recife-PE)*.
- FREITAS, K. R., ROSA, B., RUGGIERO, J. A., NASCIMENTO, J. L., HEINEMAN, A. B., MACEDO, R. F., NAVES, M. A. T. & OLIVEIRA, I. P. 2007. Avaliação da composição químico - bromatológica do capim mombaça (*Panicum maximum* (Jacq) Jacq.) submetido a diferentes doses de nitrogênio. *Bioscience Journal, Uberlândia*, v. 23, n. 3., 1-10.
- FU, G., SHEN, Z., ZHANG, X. & ZHOU, Y. 2012. Response of soil microbial biomass to short-term experimental warming in alpine meadow on the Tibetan Plateau. *Applied Soil Ecology*, 61, 158-160.

- GHANNOUM, O., VON CAEMMERER, S. & CONROY, J. P. 2001. Plant water use efficiency of 17 Australian NAD-ME and NADP-ME C-4 grasses at ambient and elevated CO₂ partial pressure. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 1207-1217.
- GAUMONT-GUAY, D., BLACK, T. A., GRIFFIS, T. J., BARR, A. G., JASSAL, R. S. & NESIC, Z. 2006. Interpreting the dependence of soil respiration on soil temperature and water content in a boreal aspen stand. *Agricultural and Forest Meteorology*, 140, 220-235.
- GOMEZ-CASANOVAS, N., MATAMALA, R., COOK, D. R. & GONZALEZ-MELER, M. A. 2012. Net ecosystem exchange modifies the relationship between the autotrophic and heterotrophic components of soil respiration with abiotic factors in prairie grasslands. *Global Change Biology*, 18, 2532-2545.
- GONZÁLEZ-MELER, M. A., TANEVA, L. & TRUEMAN, R. J. 2004. Plant respiration and elevated atmospheric CO₂ concentration: cellular responses and global significance. *Annals of Botany*, 94, 647-656.
- GONZÁLEZ-MELER, M. A., BLANC-BETES, E., FLOWER, C. E., WARD, J. K. & GOMEZ-CASANOVAS, N. 2009. Plastic and adaptive responses of plant respiration to changes in atmospheric CO₂ concentration. *Physiologia Plantarum*, 137, 473-484.
- GROSSIORD, C., MARESCHAL, L. & EPRON, D. 2012. Transpiration alters the contribution of autotrophic and heterotrophic components of soil CO₂ efflux. *New Phytologist*, 194, 647-653.
- HOULTON, B. Z., WANG, Y.-P., VITOUSEK, P. M. & FIELD, C. B. 2008. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, 454, 327-U34.
- IPCC (2001). "An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change." *Fifteenth Session, San José, Costa Rica*.
- IPCC (2007). Climate change 2007. Climate change impacts, adaptation and vulnerability. *Working Group II*. Geneva, Suíça, IPCC.
- IPCC (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC WGI 5th Assessment Report.
- IVERSEN, C. M. 2010. Digging deeper: fine-root responses to rising atmospheric CO₂ concentration in forested ecosystems. *New Phytologist*, 186, 346-357.
- KIM, J. & VERMA S. B.. 1992. "SOIL SURFACE CO₂ FLUX IN A MINNESOTA PEATLAND." *Biogeochemistry* 18(1): 37-51.
- KIMBALL, B. A., KOBAYASHI, K. & BINDI, M. 2002. Responses of agricultural crops to free-air CO₂ enrichment. *Advances in Agronomy*, Vol 77, 77, 293-368.
- KIMBALL, B. A. 2005. "Theory and performance of an infrared heater for ecosystem warming." *Global Change Biology* 11(11): 2041-2056.
- KIMBALL, B. A., CONLEY, M. M., WANG, S., LIN, X., LUO, C., MORGAN, J. & SMITH, D. 2008. Infrared heater arrays for warming ecosystem field plots. *Global Change Biology*, 14, 309-320.
- KIRK, J. L., BEAUDETTE, L. A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KHIRONOMOS, J. N., LEE, H. & TREVORS, J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169-188.

- KUSTER, T. M., SCHLEPPI, P., HU, B., SCHULIN, R. & GÜNTHARDT-GOERG, M. S. 2013. Nitrogen dynamics in oak model ecosystems subjected to air warming and drought on two different soils. *Plant Biology*, 15, 220-229.
- KUZYAKOV, Y. & CHENG W. 2001. "Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition." *Soil Biology and Biochemistry* 33(14): 1915-1925.
- KUZYAKOV, Y. 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 1363-1371.
- LA SCALA, N., BOLONHEZI, D. & PEREIRA, G. 2006. Short-term soil CO₂ emission after conventional and reduced tillage of a no-till sugar cane area in southern Brazil. *Soil & tillage research*, 91, 244-248
- LAM, S. K., CHEN, D. L., NORTON, R., ARMSTRONG, R. & MOSIER, A. R. 2012. Nitrogen dynamics in grain crop and legume pasture systems under elevated atmospheric carbon dioxide concentration: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 18, 2853-2859.
- LEAKEY, A. D. B. & LAU, J. A. 2012. Evolutionary context for understanding and manipulating plant responses to past, present and future atmospheric [CO₂]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 613-629.
- LI, F. Y., NEWTON, P. C. D. & LIEFFERING, M. 2014. Testing simulations of intra- and inter-annual variation in the plant production response to elevated CO₂ against measurements from an 11-year FACE experiment on grazed pasture. *Global Change Biology*, 20, 228-239.
- LIBBY, L. M. (1972). "Multiple Thermometry in Paleoclimate and Historic Climate". *Journal of Geophysical Research*, 77, 4310-&.
- LICHTER, J., BARRON, S. H., BEVACQUA, C. E., FINZI, A. C., IRVING, K. E., STEMMLER, E. A. & SCHLESINGER, W. H. 2005. Soil carbon sequestration and turnover in a pine forest after six years of atmospheric CO₂ enrichment. *Ecology*, 86, 1835-1847.
- LIN, G. H., EHRLINGER, J. R., RYGIEWICZ, P. T., JOHNSON, M. G. & TINGEY, D. T. 1999. Elevated CO₂ and temperature impacts on different components of soil CO₂ efflux in Douglas-fir terracosms. *Global Change Biology*, 5, 157-168.
- LIN, D. L., XIA, J. Y. & WAN, S. Q. 2010. Climate warming and biomass accumulation of terrestrial plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, 188, 187-198.
- LIU, W., ZHANG, Z. H. E. & WAN, S. 2009. Predominant role of water in regulating soil and microbial respiration and their responses to climate change in a semiarid grassland. *Global Change Biology*, 15, 184-195.
- LIU, X., WANG, G., LI, J. & WANG, Q. 2010. Nitrogen isotope composition characteristics of modern plants and their variations along an altitudinal gradient in Dongling Mountain in Beijing. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 53, 128-140.
- LONG, S. P., AINSWORTH, E. A., ROGERS, A. & ORT, D. R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: Plants FACE the Future*. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 591-628.
- LONG, S. P., AINSWORTH, E. A., LEAKEY, A. D. B., NÖSBERGER, J. & ORT, D. R. 2006. Food for Thought: Lower-Than-Expected Crop Yield Stimulation with Rising CO₂ Concentrations. *Science*, 312, 1918-1921.

- LU, M., ZHOU, X. H., YANG, Q., LI, H., LUO, Y. Q., FANG, C. M., CHEN, J. K., YANG, X. & LI, B. 2013. Responses of ecosystem carbon cycle to experimental warming: a meta-analysis. *Ecology*, 94, 726-738.
- LUO, Y. Q., WAN, S. Q., HUI, D. F. & WALLACE, L. L. 2001. Acclimatization of soil respiration to warming in a tall grass prairie. *Nature*, 413, 622-625.
- LUO, Y., SU, B. O., CURRIE, W. S., DUKES, J. S., FINZI, A., HARTWIG, U., HUNGATE, B., MC MURTRIE, R. E., OREN, R. A. M., PARTON, W. J., PATAKI, D. E., SHAW, M. R., ZAK, D. R. & FIELD, C. B. 2004. Progressive Nitrogen Limitation of Ecosystem Responses to Rising Atmospheric Carbon Dioxide. *BioScience*, 54, 731-739.
- LUO, Y. Q., HUI, D. F. & ZHANG, D. Q. 2006. Elevated CO₂ stimulates net accumulations of carbon and nitrogen in land ecosystems: A meta-analysis. *Ecology*, 87, 53-63.
- MACHADO, P. L. O. 2005. Carbono do solo e a mitigação da mudança climática global. *Quim. Nova.*, 28, 329-334.
- MACHADO, L. A. Z. 2012. Misturas de forrageiras anuais e perenes para sucessão à soja em sistemas de integração lavoura-pecuária. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 4., 629-636.
- MARTINELLI, L. A. O., J. P. H. B.; FERRAZ, E. S.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B.; MOREIRA, M. Z. 2009. "Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis." *Oficina de textos*: 144.
- MARTINEZ, C. A., BIANCONI, M., SILVA, L., APPROBATO, A., LEMOS, M., SANTOS, L., CURTARELLI, L., RODRIGUES, A., MELLO, T. & MANCHON, F. 2014. Moderate warming increases PSII performance, antioxidant scavenging systems and biomass production in *Stylosanthes capitata* Vogel. *Environmental and Experimental Botany*.
- MELILLO, J. M., BUTLER, S., JOHNSON, J., MOHAN, J., STEUDLER, P., LUX, H., BURROWS, E., BOWLES, F., SMITH, R., SCOTT, L., VARIO, C., HILL, T., BURTON, A., ZHOU, Y. M. & TANG, J. 2011. Soil warming, carbon-nitrogen interactions, and forest carbon budgets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 9508-9512.
- MENDES, I. C., HUNGRIA, M., JUNIOR, F. B. R., FERNANDES, M. F., CHAER, G. M., MERCANTE, F. M. & ZILLI, J. E. 2009. Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais: utopia ou realidade? *Embrapa Cerrados, Documentos* 246, 31p.
- MENDES, I. D. C., FERNANDES, M. F., CHAER, G. M. & DOS REIS JUNIOR, F. B. 2012. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant and Soil*, 359, 183-195.
- MIGLIETTA, F., PERESSOTTI, A., VACCARI, F. P., ZALDEI, A., DEANGELIS, P. & SCARASCIA-MUGNOZZA, G. 2001. Free-air CO₂ enrichment (FACE) of a poplar plantation: the POPFACE fumigation system. *New Phytologist*, 150, 465-476.
- MIKKELSEN, T. N., BEIER, C., JONASSON, S., HOLMSTRUP, M., SCHMIDT, I. K., AMBUS, P., PILEGAARD, K., MICHELSEN, A., ALBERT, K., ANDRESEN, L. C., ARNDAL, M. F., BRUUN, N., CHRISTENSEN, S., DANBÆK, S., GUNDERSEN, P., JØRGENSEN, P., LINDEN, L. G., KONGSTAD, J., MARALDO, K., PRIEMÉ, A., RIIS-NIELSEN, T., RO-POULSEN, H., STEVNBÆK, K., SELSTED, M. B., SØRENSEN, P., LARSEN, K. S., CARTER, M. S., IBROM, A., MARTINUSSEN, T., MIGLIETTA, F. & SVERDRUP, H. 2008. Experimental design of multifactor climate change experiments with elevated CO₂, warming and drought: the CLIMATE project. *Functional Ecology*, 22, 185-195.

- NOVEM AUYEUNG, D. S., SUSEELA, V. & DUKES, J. S. 2013. Warming and drought reduce temperature sensitivity of nitrogen transformations. *Global Change Biology*, 19, 662-76.
- OMETTO, J., EHRLINGER, J. R., DOMINGUES, T. F., BERRY, J. A., ISHIDA, F. Y., MAZZI, E., HIGUCHI, N., FLANAGAN, L. B., NARDOTO, G. B. & MARTINELLI, L. A. 2006. The stable carbon and nitrogen isotopic composition of vegetation in tropical forests of the Amazon Basin, Brazil. *Biogeochemistry*, 79, 251-274.
- PAISANI, J. C., PONTELLI, M. E., DE BARROS CORRÊA, A. C. & RECH RODRIGUES, R. A. 2013. Pedogeochemistry and micromorphology of oxisols – A basis for understanding etchplanation in the Araucárias Plateau (Southern Brazil) in the Late Quaternary. *Journal of South American Earth Sciences*, 48, 1-12.
- PAOLO, N., ELLEN, K. & PACIFICO, R. 2002. Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes in Soil. *Enzymes in the Environment*. CRC Press.
- PATAKI, D. E., ELLSWORTH, D. S., EVANS, R. D., GONZALEZ-MELER, M., KING, J., LEAVITT, S. W., LIN, G. H., MATAMALA, R., PENDALL, E., SIEGWOLF, R., VAN KESSEL, C. & EHRLINGER, J. R. 2003. Tracing changes in ecosystem function under elevated carbon dioxide conditions. *Bioscience*, 53, 805-818.
- PEEL, M. C., FINLAYSON, B. L. & MCMAHON, T. A. 2007. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11, 1633-1644.
- PULROLNIK, K. 2009. "Transformações do C no solo." *Embrapa Cerrados* (Planaltina, DF): 36.
- R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- REICH, P. B., HOBBIE, E. A., E., S., LEE, TALI, ELLSWORTH, S., D., WEST, B., J., TILMAN, DAVID, KNOPS, H., J. M., NAEEM, SHAHID, TROST & JARED 2006. *Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂*, London, ROYAUME-UNI, Nature Publishing Group.
- RICKLEFS, R. E. 2003. "A economia da natureza - 5ª ed." Editora Guanabara Koogan - Rio de Janeiro.
- ROSANOVA, C. 2008. Estabelecimento de pastagens de cultivares de *Panicum maximum* (Jacq) Jacq. em consórcio com sorgo forrageiro, sob fontes de fósforo, no cerrado tocantinense. UFT. Gurupi, TO: 58.
- ROSCOE, R., MERCANTE, F. M., MENDES, I. C., JUNIOR, F. B. R., SANTOS, J. C. F. & HUNGRIA, M. 2006. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. *Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares*. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste., 163-198.
- RUIZ-VERA, U. M., SIEBERS, M., GRAY, S. B., DRAG, D. W., ROSENTHAL, D. M., KIMBALL, B. A., ORT, D. R. & BERNACCHI, C. J. 2013. Global Warming Can Negate the Expected CO₂ Stimulation in Photosynthesis and Productivity for Soybean Grown in the Midwestern United States(1 W OA). *Plant Physiology*, 162, 410-423.
- RUSTAD, L. E., CAMPBELL, J. L., MARION, G. M., NORBY, R. J., MITCHELL, M. J., HARTLEY, A. E., CORNELISSEN, J. H. C., GUREVITCH, J. & GCTE, N. 2001. A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia*, 126, 543-562.

- SANAULLAH, M., CHABBI, A., GIRARDIN, C., DURAND, J. L., POIRIER, M. & RUMPEL, C. 2014. Effects of drought and elevated temperature on biochemical composition of forage plants and their impact on carbon storage in grassland soil. *Plant and Soil*, 374, 767-778.
- SARDANS, J., PEÑUELAS, J. & ESTIARTE, M. 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology*, 39, 223-235.
- SAURER, M., SIEGENTHALER, U. & SCHWEINGRUBER, F. 1995. The climate-carbon isotope relationship in tree-rings and the significance of site conditions. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology*, 47, 320-330.
- SAXE, H., CANNELL, M. G. R., JOHNSEN, B., RYAN, M. G. & VOURLITIS, G. 2001. Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist*, 149, 369-399.
- SCHINDLBACHER, A., RODLER, A., KUFFNER, M., KITZLER, B., SESSITSCH, A. & ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. 2011. Experimental warming effects on the microbial community of a temperate mountain forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1417-1425.
- SEIBT, U., RAJABI, A., GRIFFITHS, H. & BERRY, J. A. 2008. Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia*, 155, 441-454.
- SHAVER, G. R., CANADELL, J., CHAPIN, F. S., GUREVITCH, J., HARTE, J., HENRY, G., INESON, P., JONASSON, S., MELILLO, J., PITELKA, L. & RUSTAD, L. 2000. Global Warming and Terrestrial Ecosystems: A Conceptual Framework for Analysis. *BioScience*, 50, 871-882.
- SHI, W. Y., ZHANG, J. G., YAN, M. J., YAMANAKA, N. & DU, S. 2012. Seasonal and diurnal dynamics of soil respiration fluxes in two typical forests on the semiarid Loess Plateau of China: Temperature sensitivities of autotrophs and heterotrophs and analyses of integrated driving factors. *Soil Biology & Biochemistry*, 52, 99-107.
- SIERRA, J. 2002. Nitrogen mineralization and nitrification in a tropical soil: effects of fluctuating temperature conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1219-1226.
- SMITH, S. D., STRAIN, B. R. & SHARKEY, T. D. 1987. Effects of CO₂ enrichment on four Great Basin grasses. *Functional Ecology*, 1, 139-143.
- SMITH, K. A., BALL, T., CONEN, F., DOBBIE, K. E., MASSHEDER, J. & REY, A. 2003. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, 54, 779-791.
- STAFF, S. S. 1999. Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. *Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook* 436 - 2nd edition.
- SWAP, R. J., ARANIBAR, J. N., DOWTY, P. R., GILHOLLY, W. P. & MACKO, S. A. 2004. Natural abundance of ¹³C and ¹⁵N in C₃ and C₄ vegetation of southern Africa: patterns and implications. *Global Change Biology*, 10, 350-358.
- TABATABAI, M. A. & WARREN, A. D. 2002. Enzymes in Soil. *Enzymes in the Environment*. CRC Press.
- TANEVA, L., PIPPEN, J. S., SCHLESINGER, W. H. & GONZALEZ-MELER, M. A. 2006. The turnover of carbon pools contributing to soil CO₂ and soil respiration in a temperate forest exposed to elevated CO₂ concentration. *Global Change Biology*, 12, 983-994.

- TANEVA, L. & GONZALEZ-MELER, M. A. 2011. Distinct patterns in the diurnal and seasonal variability in four components of soil respiration in a temperate forest under free-air CO₂ enrichment. *Biogeosciences Discussions*, 8, 2875-2911.
- TATE, R. L. (2000). "Soil microbiology." 2 ed. (New York: John Wiley): 508.
- TIAN, D., WANG, G., PENG, Y., YAN, W., FANG, X., ZHU, F. & CHEN, X. 2011. Contribution of autotrophic and heterotrophic respiration to soil CO₂ efflux in Chinese fir plantations. *Australian Journal of Botany*, 59, 26-31.
- TOWSEND, C. R., BEGON, M. & HARPER, J. L. 2006. Fundamentos em Ecologia - 2 ed. *ArtMed - Porto Alegre*, 592.
- TRUEMAN, R. J. & GONZALEZ-MELER M. A. 2005. "Accelerated belowground C cycling in a managed agriforest ecosystem exposed to elevated carbon dioxide concentrations." *Global Change Biology* 11(8): 1258-1271.
- TURCO, R. F., KENNEDY, A. C. & JAWSON, M. D. 1994. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W., COLEMAN, D. C., BEZDICEK, D. F. & STEWART, B. A. (eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*.
- TURNER, M. M. & HENRY, H. A. L. 2010. Net nitrogen mineralization and leaching in response to warming and nitrogen deposition in a temperate old field: the importance of winter temperature. *Oecologia*, 162, 227-236.
- VALENTIM, J. F., ANDRADE, C. M. S. D., RESENDE, R. M. S., ASSIS, G. M. L. D., GODOY, R., SANTOS, P. M. & EUCLIDES, V. P. B. 2008. Leguminosas cultivadas. *Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica., 111-1132.
- VAN GROENIGEN, K. J., SIX, J., HARRIS, D., BLUM, H. & VAN KESSEL, C. 2003. Soil C-13-N-15 dynamics in an N-2-fixing clover system under long-term exposure to elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, 9, 1751-1762.
- VANHALA, P., KARHU, K., TUOMI, M., BJÖRKLÖF, K., FRITZE, H., HYVÄRINEN, H. & LISKI, J. 2011. Transplantation of organic surface horizons of boreal soils into warmer regions alters microbiology but not the temperature sensitivity of decomposition. *Global Change Biology*, 17, 538-550.
- WAY, D. A. & OREN, R. 2010. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree Physiology*, 30, 669-688.
- WILDUNG, R. E., GARLAND, T. R. & BUSCHBOM, R. L. 1975. Interdependent effects of soil temperature and water-content on soil respiration rate and plant root decomposition in arid grassland soils *Soil Biology & Biochemistry*, 7, 373-378.
- WOOD, T. E., CAVALERI, M. A. & REED, S. C. 2012. Tropical forest carbon balance in a warmer world: a critical review spanning microbial- to ecosystem-scale processes. *Biological Reviews*, 87, 912-927.
- WOODWARD, F. I., LOMAS, M. R. & BETTS, R. A. 1998. Vegetation-climate feedbacks in a greenhouse world. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353, 29-39.

WU, Z., DIJKSTRA, P., KOCH, G. W., PENUELAS, J. & HUNGATE, B. A. 2011. Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: a meta-analysis of experimental manipulation. *Global Change Biology*, 17, 927-942.

XU, Z., SHIMIZU, H., YAGASAKI, Y., ITO, S., ZHENG, Y. & ZHOU, G. 2013. Interactive Effects of Elevated CO₂, Drought, and Warming on Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 692-707.

YANG, Y., WANG, G. X., YANG, L. D. & GUO, J. Y. 2013. Effects of Drought and Warming on Biomass, Nutrient Allocation, and Oxidative Stress in *Abies fabri* in Eastern Tibetan Plateau. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 298-306.

YIN, H. J., LI, Y. F., XIAO, J., XU, Z. F., CHENG, X. Y. & LIU, Q. 2013. Enhanced root exudation stimulates soil nitrogen transformations in a subalpine coniferous forest under experimental warming. *Global Change Biology*, 19, 2158-2167.

ZHAO, Z. M., ZHAO, C. Y., YAN, Y. Y., LI, J. Y., LI, J. & SHI, F. Z. 2013. Interpreting the dependence of soil respiration on soil temperature and moisture in an oasis cotton field, central Asia. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 168, 46-52.

ZHOU, X. Q., CHEN, C. R., WANG, Y. F., XU, Z. H., DUAN, J. C., HAO, Y. B. & SMAILL, S. 2013. Soil extractable carbon and nitrogen, microbial biomass and microbial metabolic activity in response to warming and increased precipitation in a semiarid Inner Mongolian grassland. *Geoderma*, 206, 24-31.

ZISKA, L. H., SICHER, R. C. & BUNCE, J. A. 1999. The impact of elevated carbon dioxide on the growth and gas exchange of three C₄ species differing in CO₂ leak rates. *Physiologia Plantarum*, 105, 74-80.

ZISKA, L. H. & BUNCE, J. A. 2007. Predicting the impact of changing CO₂ on crop yields: some thoughts on food. *New Phytologist*, 175, 607-617.

<http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/crp/dados/agri/i01clima.htm> - consultado dia 28 de janeiro de 2014.

www.cnps.embrapa.br – consultado no dia 30 de janeiro de 2014.

CO2now.org - consultado no dia 24 de fevereiro de 2014.