

ISÓTOPOS ESTABLES: UNA HERRAMIENTA COMÚN PARA LA ECOFISIOLOGÍA VEGETAL Y ANIMAL

Francisco A. Squeo¹ & James R. Ehleringer²

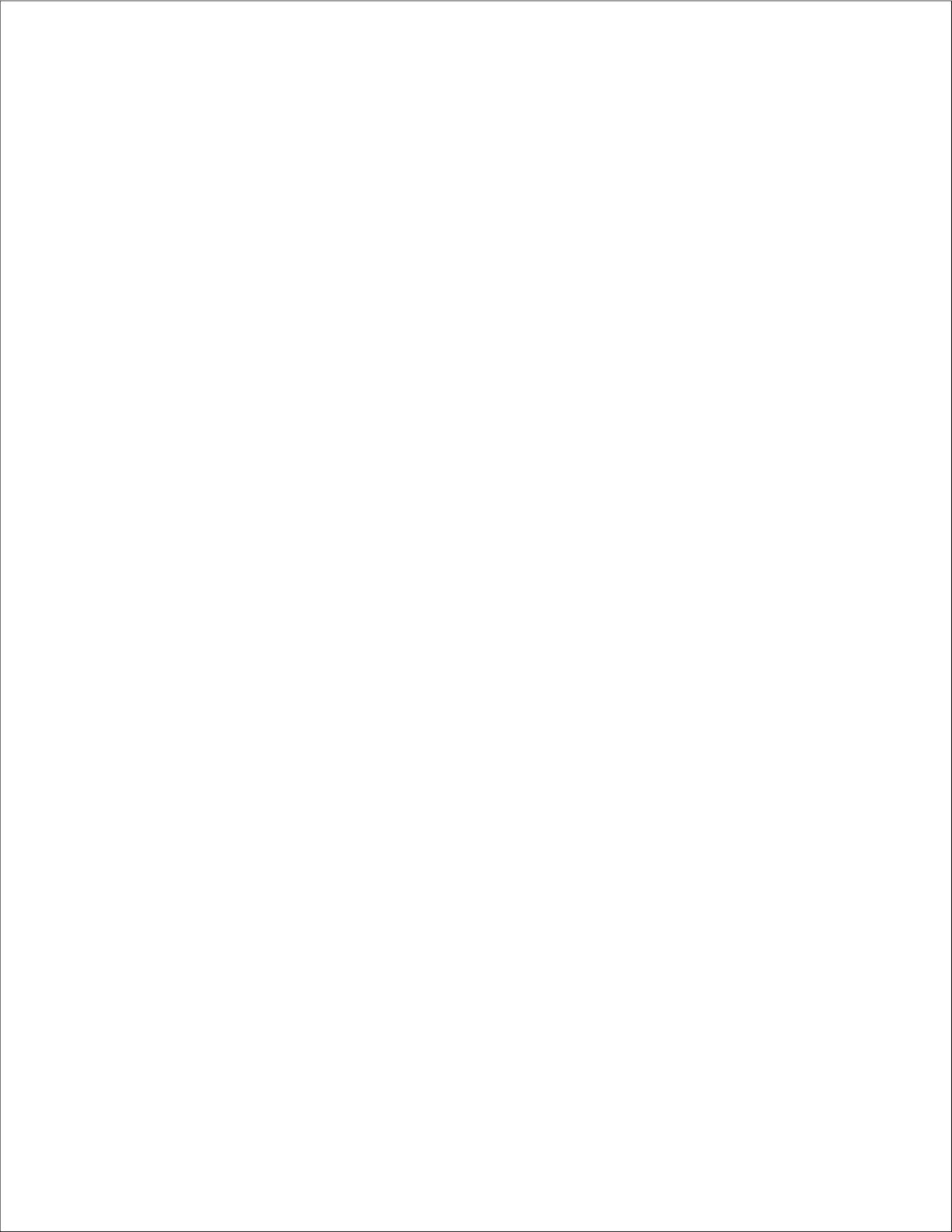
Resumen

El estudio de las variaciones naturales en los isótopos estables de hidrógeno ($\delta^2\text{H}$), carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) y oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$) provee una útil herramienta para estudios ecológicos y fisiológicos. El fraccionamiento isotópico puede ocurrir por causas cinéticas (i.e. reacciones químicas), durante el proceso de difusión y en situaciones de equilibrio dinámico. Los isótopos estables han sido utilizados para describir procesos de corto plazo hasta en reconstrucciones de clima y vegetación pasada. La reconstrucción de las condiciones ambientales pasadas es posible debido a que, una vez que los compuestos son producidos, preservan sus señales isotópicas en el tiempo. En la reconstrucción de dietas, la composición isotópica de un animal refleja su fuente alimentaria. Al nivel de ecosistema, la composición isotópica de la materia orgánica del suelo refleja el material vegetal que ocupó la superficie en el pasado. La composición isotópica de una planta, que depende de los sustratos que utilizó durante su crecimiento y de los procesos de fraccionamiento, entrega información sobre su funcionamiento en el ambiente que habita. Las $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{18}\text{O}$ del agua en la savia del xilema entregan una medida directa de las fuentes de agua utilizadas en el momento por la planta, señales que quedan además registradas cronológicamente en la celulosa de los anillos de crecimiento. En animales migratorios, la composición isotópica de los tejidos refleja la composición isotópica del agua de las localidades en que el tejido inicialmente se formó, por lo tanto permite identificar donde se ha originado un individuo. La $\delta^{13}\text{C}$ ha sido empleada para estimar la eficiencia en el uso del agua (i.e., fotosíntesis / transpiración), para diferenciar entre los metabolismos C_3 , C_4 (y CAM) en floras actuales o en reconstrucciones de paleo-floras, así como para seguir el flujo de energía en cadenas tróficas. La $\delta^{15}\text{N}$ provee información respecto a las entradas y posteriores transformaciones del nitrógeno dentro de un ecosistema, así como permite cuantificar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Se espera una expansión en el uso de estas técnicas hacia los ámbitos productivos y de monitoreos ambientales.

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena, Casilla 599 y Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), La Serena, Chile.

² Stable Isotope Ratio Facility for Environmental Research, Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112-0840, USA.

Palabras clave: isótopos estables de hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxígeno, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, fuentes de agua, metabolismo C_3 y C_4 , eficiencia en el uso del agua.



Introducción

Los isótopos estables corresponden a esos isótopos de un elemento que son estables y que no decaen en el tiempo a través de procesos de emisión de radioactividad. Muchos elementos químicos poseen más de un isótopo estable. Por ejemplo, el elemento químico carbono (C) existe como dos isótopos estables, ^{12}C y ^{13}C , mientras que elementos como oxígeno (O) existen como tres isótopos estables, ^{16}O , ^{17}O y ^{18}O . Tal como ocurre en los casos del carbono y oxígeno, la especie de isótopo estable más abundante típicamente contiene el número más bajo de neutrones para ese elemento químico. Los isótopos estables no deben ser confundidos con los isótopos radioactivos de un elemento. Los isótopos radioactivos tienen un tiempo de vida limitado y finalmente decaen a una forma diferente del elemento. El tiempo requerido para que un isótopo radiactivo decaiga puede variar entre nano-segundos a miles de años. Por ejemplo, el carbono tiene seis isótopos radioactivos (^9C , ^{10}C , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}C y ^{16}C) de los cuales el ^{14}C es quizás el mejor conocido por su utilidad para datar material biológico y como trazador de estudios metabólicos.

1. Abundancia de Isótopos Estables y su Medición

Son de especial interés para las investigaciones ecofisiológicas las variaciones en los isótopos estables de los elementos químicos: hidrógeno (^1H y ^2H), carbono (^{12}C , ^{13}C), nitrógeno (^{14}N , ^{15}N) y oxígeno (^{16}O , ^{18}O). La abundancia natural de estos isótopos se muestra en la Tabla 1. Estos elementos relativamente livianos son medidos típicamente usando un espectrómetro de masa de proporción de isótopos gaseosos. El espectrómetro de masa consiste en una fuente que ioniza el gas, un tubo acelerador con un campo magnético que desvía el camino del gas ionizado, y un sistema detector al final del tubo acelerador que permite medir las diferentes especies isotópicas. Para introducir el elemento de interés en el espectrómetro de masa, primero éste debe ser convertido a una forma gaseosa. Usualmente se introduce hidrógeno como H_2 , carbono y oxígeno como CO_2 , y nitrógeno como N_2 . En la medida que el gas es introducido en el espectrómetro de masa, éste es bombardeado por una fuente que lo ioniza por la remoción de un electrón. Luego, el gas ionizado viaja por el tubo acelerador que está en vacío. Al llegar al campo magnético, las especies isotópicas livianas y pesadas son desviadas en forma diferente. Los detectores que están ubicados al final del tubo acelerador registran la abundancia de isótopos pesados y livianos de la muestra.

1.1 La Proporción de los Isótopos Estables

La proporción de isótopos estables de un elemento se representa a través de la notación delta (δ), en relación a un estándar, según la siguiente ecuación:

$$\delta = ((R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1) * 1000\text{‰}$$

donde R_{muestra} y el $R_{\text{estándar}}$ son los cocientes molares de los isótopos pesados sobre los livianos presentes en la muestra y el estándar, respectivamente. Los estándares internacionalmente reconocidos para estos elementos son SMOW para hidrógeno y oxígeno, PDB para carbono y AIR para nitrógeno (ver Tabla 2).

Tabla 1. Listado de los isótopos estables y sus abundancias para los elementos químicos más comúnmente utilizados en investigaciones ecofisiológicas.

Elemento	Isótopo	Abundancia (%)
Hidrógeno	¹ H	99,985
	² H	0,015
Carbono	¹² C	98,89
	¹³ C	1,11
Nitrógeno	¹⁴ N	99,63
	¹⁵ N	0,37
Oxígeno	¹⁶ O	99,759
	¹⁷ O	0,037
	¹⁸ O	0,204

Tabla 2. Estándares internacionalmente reconocidos para los elementos más comúnmente utilizados en ecofisiología. SMOW= Standard Mean Ocean Water (estándar agua oceánica media), PDB= Pee Dee Belemnite, AIR= Atmospheric air (aire atmosférico).

Elemento	Estándar	R	valor
Hidrógeno	SMOW	² H/ ¹ H (o D/H)	0,0001558
Carbono	PDB	¹³ C/ ¹² C	0,0112372
Nitrógeno	AIR	¹⁵ N/ ¹⁴ N	0,0036765
Oxígeno	SMOW	¹⁸ O/ ¹⁶ O	0,0020052

1.2 Variación Natural en los Isótopos Estables

La variación en la proporción de isótopos estables entre diferentes compuestos o entre dos situaciones, también llamada fraccionamiento isotópico, ocurre debido al comportamiento diferencial que tienen las moléculas que contienen las formas isotópicas pesadas respecto a las livianas. Este comportamiento diferencial puede ocurrir por causas cinéticas (i.e., durante una reacción química), durante el proceso de difusión y en situaciones de equilibrio dinámico (i.e., debido a las propiedades físicas de las moléculas).

El fraccionamiento cinético se genera debido a que en cualquier reacción bioquímica, la ruptura de una molécula que contiene el isótopo pesado del elemento es más difícil en comparación a una molécula con el isótopo liviano, debido a que los enlaces químicos son más fuertes en el primero. Una reacción enzimática que utiliza sustratos con formas isotópicas livianas ocurrirá a mayor rapidez en comparación con reacciones que involucran a formas isotópicas pesadas; en consecuencia, la proporción de isótopos estables de los productos va a ser distinta a la de los sustratos. Estas diferencias van a ocurrir a menos que, por supuesto, todo el sustrato sea consumido, en cuyo caso no se debería encontrar diferencias en la composición isotópica entre los sustratos y los productos. En muchas reacciones bioquímicas, la ocurrencia de fraccionamiento cinético involucra a sustratos al inicio de vías metabólicas, como por ejemplo, la fijación inicial de dióxido de carbono en la fotosíntesis.

Un segundo tipo de fraccionamiento es de equilibrio. Estos eventos de fraccionamiento consideran la observación que durante las reacciones de equilibrio, tal como el equilibrio entre la fase líquida y acuosa del agua, las moléculas con la forma isotópica más pesada son típicamente más abundantes en el estado de fase de menor energía. Por último, los eventos de fraccionamiento difusivos se basan en la observación que las formas isotópicas pesadas difunden más lentamente que las livianas.

2. Rango Natural de la Variación Isotópica en la Naturaleza

La variación natural en la proporción de isótopos estables puede ser grande, y diferir entre los materiales de interés en estudios ecofisiológicos. Por ejemplo, entre distintos tejidos de origen vegetal o animal, gases atmosféricos y agua (ver Fig. 1). Como un punto de partida, obsérvese que algunos gases atmosféricos, tales como el CO_2 , N_2 y O_2 presentan una variación limitada, mientras que otros gases como N_2O y CH_4 presentan una gran variación isotópica. La gran variación de los últimos dos gases reflejan, por un lado, un fraccionamiento isotópico causado por microorganismos, como por otro lado, diferencias en los sustratos biológicos que fueron utilizados para producir esos gases.

Los océanos, el mayor volumen de agua del planeta, presenta sólo pequeña variación en la proporción de isótopos y mucha de ella se debe a cambios de salinidad. Ahora, una vez que el agua se evapora de los océanos y más tarde se condensa como precipitación, existe una gran variación isotópica que depende tanto de la temperatura de la nube como de la cantidad de humedad residual remanente en la masa nubosa (Fig. 2). El agua del suelo, los ríos y lagos reflejan inicialmente los valores isotópicos de la precipitación, sin embargo ellos paulatinamente se van enriqueciendo por el proceso evaporativo, que favorece el movimiento del agua constituida con los isótopos más livianos hacia la fase vapor.

Durante la fotosíntesis se produce un fraccionamiento biológico del dióxido de carbono, lo que resulta en un empobrecimiento isotópico (se reduce la cantidad de isótopos pesados) de las plantas respecto al dióxido de carbono atmosférico que utilizan como sustrato. Los animales reflejan en la composición isotópica de sus fuentes alimenticias, y es una herramienta útil para el estudio de las cadenas tróficas. Ahora, el carbono en los huesos y dientes de los animales consiste de carbonatos, los que están isotópicamente enriquecidos respecto al sustrato original (en este caso, la fuente de comida respirada o el tejido del animal). En general, los carbonatos son enriquecidos en ^{13}C y ^{18}O , respecto a sus sustratos, dióxido de carbono y agua. En el caso del nitrógeno molecular existe una variación

isotópica limitada. Los procesos microbianos de fijación de nitrógeno ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$) presentan un fraccionamiento isotópico menor, por lo que sus productos tienen una proporción de isótopos de nitrógeno similar a su fuente atmosférica. Sin embargo, las subsecuentes reacciones de transformación del nitrógeno presentan un fuerte fraccionamiento. En general, la composición isotópica de animales de un nivel trófico dado están enriquecidas en $\sim 3\%$ respecto a su sustrato alimenticio. La gran variación del dióxido de nitrógeno es el resultado de las grandes diferencias asociadas a los procesos aeróbicos versus anaeróbicos, y procesos industriales versus los que ocurren en la estratosfera.

2.1 Relación entre Isótopos de Hidrógeno y Oxígeno en Aguas Naturales

La relación entre $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{18}\text{O}$ de las aguas naturales fue cuantificada a nivel global por Craig (1961), quien encontró que $\delta^2\text{H} = 8 \delta^{18}\text{O} + 10\%$. Esta relación es llamada línea de agua meteórica (Meteoric Water Line, MWL), y se cumple para la mayoría de las aguas naturales actuales. Por ejemplo, para La Serena, una localidad costera al extremo sur del Desierto de Atacama y con régimen de lluvia invernal, la MWL es $\delta^2\text{H} = 8,2 \delta^{18}\text{O} + 8,4\%$ (Squeo, datos no publ.). Para regiones áridas con lluvias de verano, el fraccionamiento isotópico que ocurre durante la evaporación de las gotas de lluvia da como resultado una pendiente menor. Por ejemplo, Friedman et al. (1992) encontraron una pendiente de 6,5 para la lluvia en el sureste de California. Una situación semejante se ha mostrado para Colorado con una pendiente de 7,1 (Lin et al. 1996).

2.2 Variación Isotópica Estacional del CO_2 Atmosférico

La biosfera terrestre ejerce una fuerte influencia en la atmósfera. La absorción de CO_2 (fotosíntesis) y su liberación (respiración) no tienen una distribución uniforme en el espacio y el tiempo, lo que se refleja su concentración atmosférica (Fig. 3) (Conway et al. 1994, Flanagan & Ehleringer 1998). Las variaciones estacionales en la concentración de CO_2 se hacen más evidentes a mayores latitudes en el hemisferio Norte. En

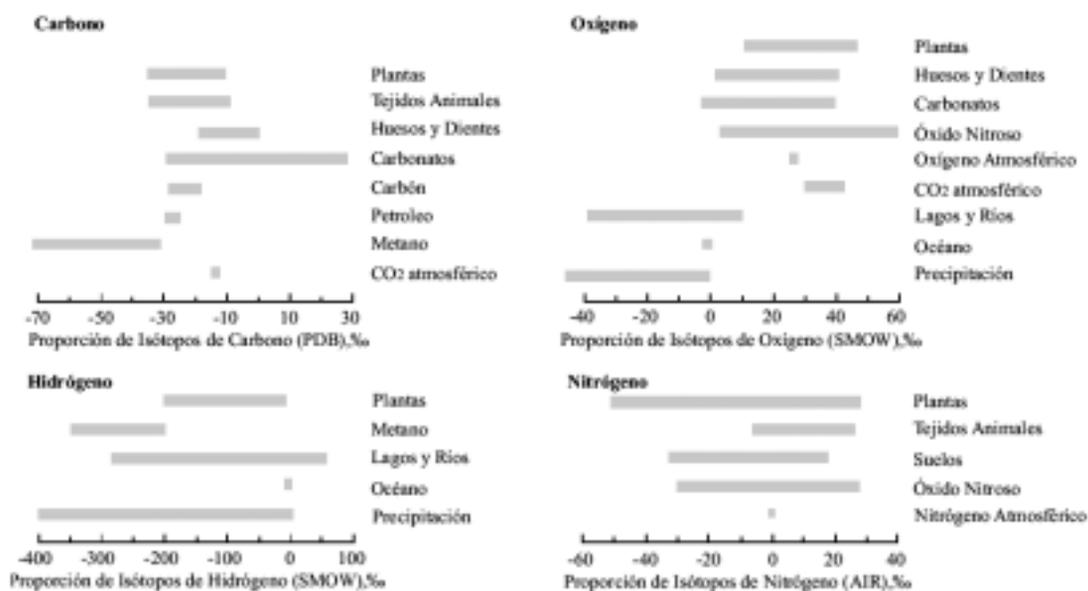


Figura 1. Variación en la proporción de isótopos de carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno en materiales de interés para estudios ecológicos y fisiológicos (modificado de Ehleringer & Cerling 2002).

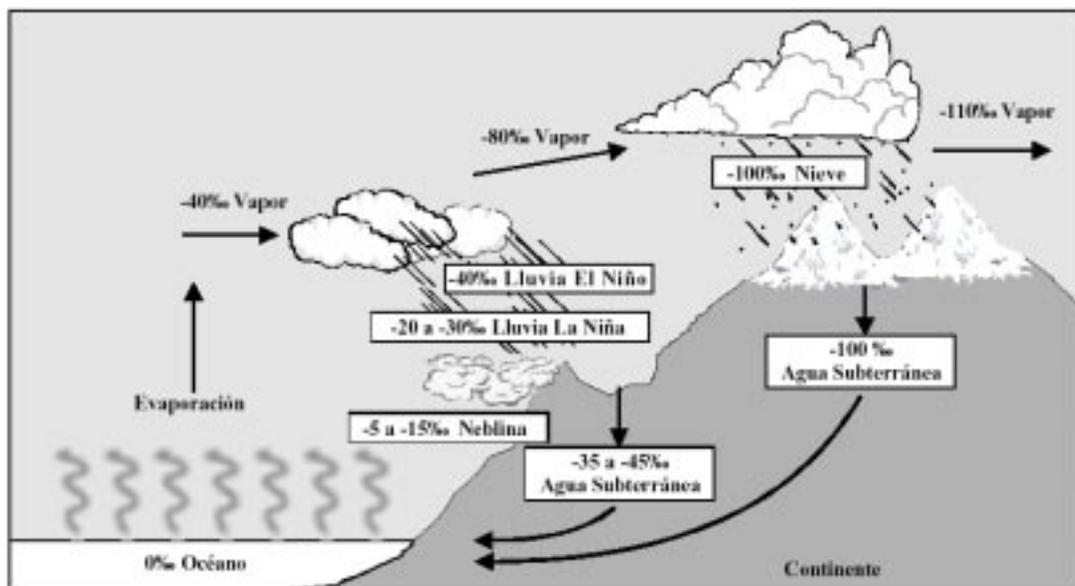


Figura 2. Variación de la proporción de isótopos estables en el ciclo del agua, en un transecto desde el Océano Pacífico a la Cordillera de los Andes, a los 30°S. Nótese que las lluvias suaves asociadas a los años La Niña difieren isotópicamente de las lluvias intensas de los años El Niño. El agua subterránea de las cuencas costeras con recarga pluvial poseen la marca isotópica de los años El Niño.

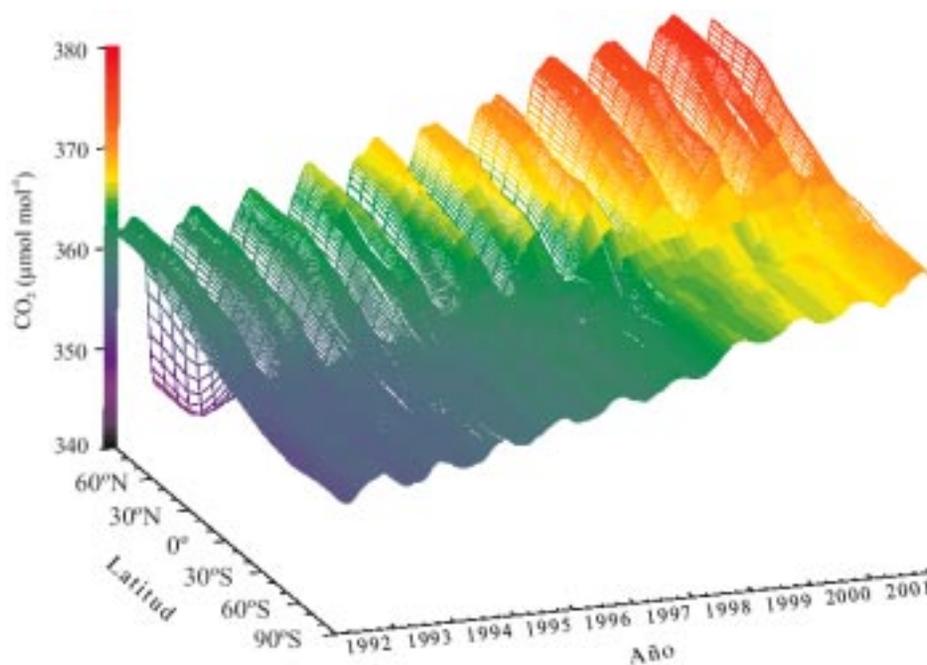


Figura 3. Representación tridimensional de la distribución latitudinal del dióxido de carbono atmosférico en el borde marino. Datos tomados de la red cooperativa de muestreo del aire NOAA CMDL (Tans & Conway 2002).

contraste, a latitudes tropicales hay menos cambios estacionales en el CO_2 atmosférico debido a las mínimas diferencias temporales entre fotosíntesis y respiración. En el hemisferio sur, las oscilaciones estacionales del CO_2 son de signo opuesto y de menor magnitud comparada con el hemisferio norte. La menor estacionalidad en la variación del CO_2 observada en el hemisferio sur se relaciona con la menor superficie terrestre y porque la vegetación terrestre se concentra en latitudes tropicales y subtropicales. La magnitud de esta oscilación temporal del CO_2 atmosférico ha aumentado en un 20% en los últimos 20 años (Keeling et al. 1996, Myneni et al. 1997). Estos cambios en magnitud y duración de las fluctuaciones estacionales en la concentración de CO_2 detectados en el hemisferio norte implican un desbalance entre la fotosíntesis y respiración ecosistémica que se asocia con aumentos de las temperaturas y un leve incremento en la duración en la estación de crecimiento (Myneni et al. 1997). Junto con la variación estacional de la concentración de CO_2 en la atmósfera, existe una variación en la proporción isotópica del oxígeno

y carbono que componen esta molécula (Fig. 4). La variación estacional y el comportamiento diferencial de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ permitirían realizar una separación más fina entre los procesos de fotosíntesis y de respiración de los ecosistemas (Flanagan & Ehleringer 1998).

3. Uso de los Isótopos Ambientales en Investigaciones Ecofisiológicas

Los isótopos ambientales son útiles herramientas de análisis de varios importantes procesos fisiológicos y ecológicos, tanto en plantas como en animales. Un área importante es el uso de la proporción de isótopos ambientales para la reconstrucción de las condiciones ambientales pasadas, lo que es posible debido a que una vez que los compuestos son producidos, preservan sus señales isotópicas en el tiempo. Entre los ejemplos más comunes se pueden incluir perfiles de hielo, la concha de los moluscos y los anillos de crecimiento de los árboles. Otra aplicación importante de los isótopos estables es la reconstrucción de dietas de los animales y la estructura del ecosistema. La composición

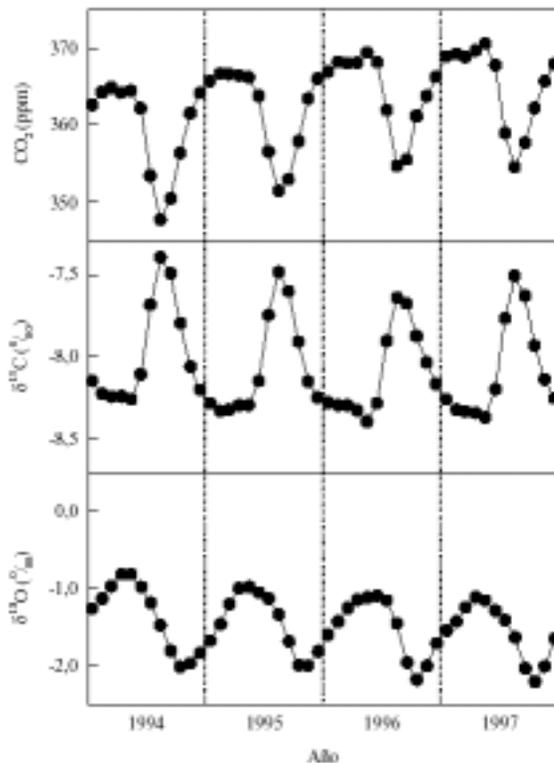


Figura 4. Cambios estacionales en la concentración, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ del CO_2 atmosférico entre los años 1994 y 1997 en Point Barrow, Alaska. Datos tomados de la red cooperativa de muestreo del aire NOAA CMDL (Tans & Conway 2002).

isotópica de un animal refleja su fuente alimentaria; mientras los tejidos blandos se pierden después de la muerte del animal, los huesos y los dientes pueden ser usados para reconstruir sus dietas pasadas. Del mismo modo al nivel de ecosistema, la composición isotópica de la materia orgánica del suelo refleja el material vegetal que ocupó la superficie en el pasado. Finalmente, la composición isotópica de una planta, que depende de los sustratos que utilizó durante su crecimiento y de los procesos de fraccionamientos, entrega información sobre su funcionamiento en el ambiente que habita. A continuación se entregan varios ejemplos que ilustran como los isótopos estables han sido utilizados en investigaciones de interés ecofisiológico, los que van desde procesos de corto plazo hasta las clásicas reconstrucciones de clima y vegetación pasada.

3.1 Aplicación de Isótopos Estables de Hidrógeno y Oxígeno

Fuente de Agua Utilizada por las Plantas

Los isótopos estables de oxígeno e hidrógeno no son fraccionados durante la absorción de agua en las raíces (White et al. 1985, Ehleringer & Dawson 1992), excepto para hidrógeno en las plantas de pantanos costeros que presentan una estrategia de ultrafiltración de sales (Lin & Sternberg 1993). Por lo tanto, la proporción de isótopos de hidrógeno y oxígeno en la savia del xilema entregan una medida directa de la o las fuentes de agua utilizadas en el momento por la planta (Ehleringer et al. 1991, Ehleringer & Dawson 1992, Flanagan et al. 1992, Phillips & Ehleringer 1995, Thorburn & Ehleringer 1995, Lin et al. 1996, Farrington et al. 1996). Ahora, la transpiración desde las hojas y tallos verdes, o la evaporación cuticular desde ramas no suberizadas puede incrementar los valores de $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{18}\text{O}$ (Dawson & Ehleringer 1991, Thorburn et al. 1993). En un trabajo pionero en Chile, Aravena y Acevedo (1985) mostraron que *Prosopis tamarugo* de la Pampa del Tamarugal (Desierto de Atacama) estaba utilizando sólo agua subterránea, desechando la neblina como potencial fuente de agua. Las ramas de *P. tamarugo* tenían un valor de $\delta^2\text{H} = -60\text{‰}$, muy cercano al del agua subterránea (-62‰), y lejos del agua atmosférica (-106‰) y suelo (-52‰).

Los isótopos del agua han sido utilizados también para entender la dinámica de cómo el agua es utilizada por diferentes especies dentro de una comunidad, particularmente para evaluar qué especie puede y cuál no puede estar compitiendo por el agua. En un trabajo clásico, Ehleringer et al. (1991) mostraron para una comunidad desértica en el oeste de Norte América, que todas las especies perennes (herbáceas, leñosas y suculentas) utilizaban el agua caída du-

rante el invierno. Sin embargo, al caer las intensas lluvias de verano, solamente las especies anuales y suculentas de la comunidad respondieron y utilizaron exclusivamente éstas precipitaciones (Fig. 5). Las especies perennes herbáceas y leñosas usaron diferentes mezclas de aguas caídas en verano e invierno (las perennes herbáceas usaron un 91% de las lluvias de verano y las leñosas un 57%). Estos autores postularon que el aumento en la precipitación de verano, predicho por los modelos de cambio climático global para ésta área, resultarían en un incremento paulatino en la frecuencia de las especies perennes herbáceas y suculentas, mientras que la frecuencia de las especies leñosas podría disminuir. Fuertes variaciones interanuales en las precipitaciones están asociadas con los eventos El Niño y estos pueden influenciar el crecimiento y la dinámica competitiva de las plantas en las regiones del globo impactadas por El Niño – Oscilación del Sur (ENOS).

Basado en la composición isotópica del agua extraída de los tallos de 14 especies arbustivas del extremo sur del Desierto de Atacama, Squeo et al. (1999) diferenciaron el uso de dos fuentes de agua: una superficial y otra más profunda. La mayoría de las especies con sistema

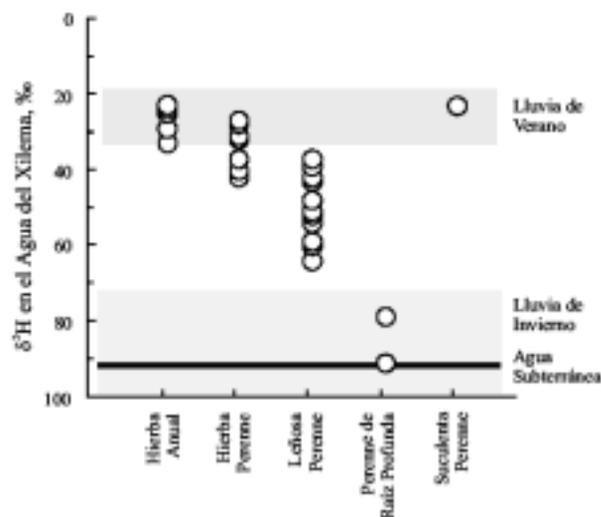


Figura 5. Proporción de isótopos de hidrógeno ($\delta^2\text{H}$) del agua del xilema de plantas que crecen en la misma localidad árida al sur de Utah después de un intenso evento de lluvia de verano. También se muestran las variaciones observadas de la composición isotópica de las lluvias de verano (fuente de humedad en la parte superior del perfil de suelo), las lluvias de invierno (humedad en la parte profunda del perfil), y agua subterránea (adaptado de Ehleringer et al. 1991).

radicular dimórfico o profundo utilizaban principalmente aguas localizadas de un estrato más profundo, en comparación con las especies con sistema radicular superficial. Comparando entre un año seco y otro lluvioso, sólo 4 especies de las 14 estudiadas cambiaron su fuente principal de agua. Debido a la asociación entre las especies palatables por los caprinos, su uso de aguas superficiales y la disminución paulatina de las precipitaciones en los pasados 100 años en la costa occidental de América del Sur, Squeo et al. (2000) postularon una presión selectiva diferencial para este grupo de plantas que llevaría a la disminución de su frecuencia, aspectos que deberían ser considerados en los programas de restauración ecológica. Tanto el sobrepastoreo como la disminución de las precipitaciones son las principales causas que explican que el 14% de la flora nativa de Coquimbo se encuentra en las categorías de conservación en Peligro o Vulnerable (Squeo et al. 2001).

En Paposo, una localidad ubicada en la cordillera de la costa en el centro del Desierto de Atacama, donde la neblina es la única fuente de agua atmosférica disponible durante los numerosos años con ausencia absoluta de lluvias, Olivares (2003) mostró que la composición isotópica del agua del xilema de todas las especies de arbustos y cactáceas que habitan a los 700 msnm era absolutamente comparable a la del agua proveniente de neblina, y difería completamente de una potencial fuente de agua subterránea. Otro ejemplo del uso de los isótopos de agua es a través de la aplicación de precipitación artificial, con una señal isotópica distinta a la del agua subterránea. Con esta técnica, Torres et al. (2002) mostraron que tres especies de arbustos con sistemas radicales profundos del extremo sur de Desierto de Atacama, difieren en su capacidad estacional de utilizar un evento de precipitación de 25 mm en un año La Niña (año seco, pp anual = 22,7 mm). Las tres especies utili-

zan una mezcla de dos fuentes de agua (agua superficial proveniente de las precipitaciones, y en mayor proporción, agua subterránea).

Registro Isotópico en los Anillos de Crecimiento

En las plantas, la composición isotópica de los anillos de crecimiento refleja en parte la composición isotópica de las fuentes de agua utilizada por la planta, esto provee de una herramienta para evaluar cómo han cambiado los patrones de precipitación que quedan registrados en los anillos de crecimiento durante la vida de la planta (Roden & Ehleringer. 1999). Roden et al. (2000) presentaron un modelo mecanístico que cuantifica el fraccionamiento físico y bioquímico del $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en la celulosa de los anillos de crecimientos de árboles. El modelo predice que la proporción de isótopos de los anillos incorpora información ambiental de la fuente de agua como de la humedad ambiental. Para organismos de ciclo de vida largo, esta técnica proporciona una herramienta para reconstruir las variaciones climáticas sobre periodos de cientos y miles de años (Fig. 6).

Reconstrucción de Rutas Migratorias de Animales

En estudios de ecología animal, es muy interesante conocer si los animales migratorios han cambiado sus rutas, lo que podría reflejar cambio en la calidad de un ambiente. O para animales que se congregan en una localidad invernal común, como por ejemplo la mariposa monarca que pasa sus inviernos en México central. ¿De dónde provienen estos individuos? Se ha mostrado que la composición isotópica de las alas de las mariposas y de las plumas de las aves refleja la composición isotópica del agua de las localidades en que el tejido inicialmente se formó, por lo tanto permite identificar dónde se ha originado un individuo. En el caso de la mariposa monarca, Hobson et al. (1999) mostró una fuerte correlación entre la proporción de isótopos de hidrógeno de la precipitación y de la materia orgánica del ala de las mariposas (Fig. 7). Esta fuerte correlación es esperada debido a que virtualmente todo el hidrógeno de los organismos, tanto plantas como animales, proviene de la precipitación. La desviación de la relación 1:1 refleja el fraccionamiento biológico producido durante la síntesis de las alas. Por otro lado, la variación geográ-

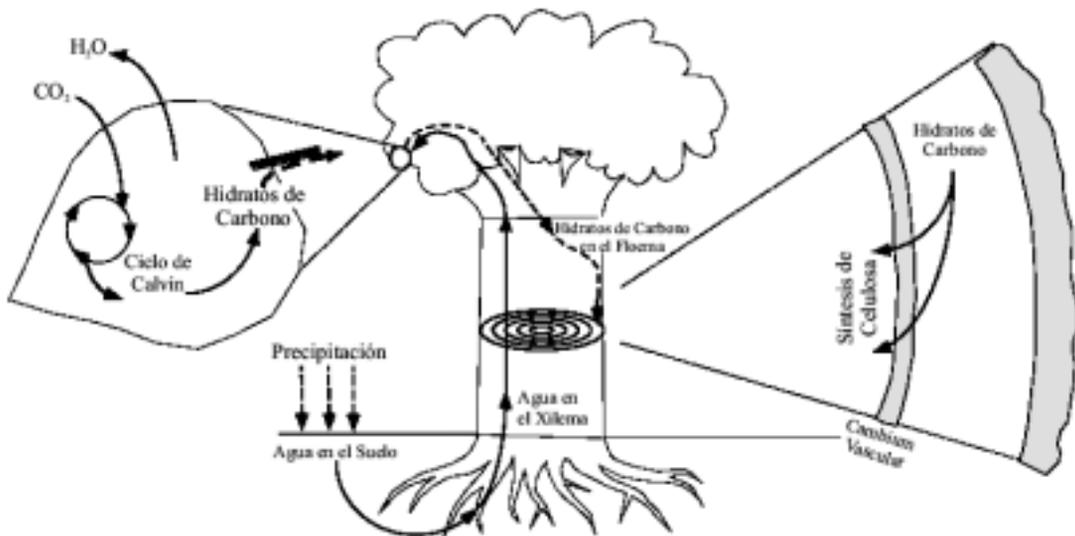


Figura 6. Procesos involucrados en la incorporación de los isótopos de carbono y oxígeno a la celulosa de los anillos de crecimientos en las plantas leñosas.

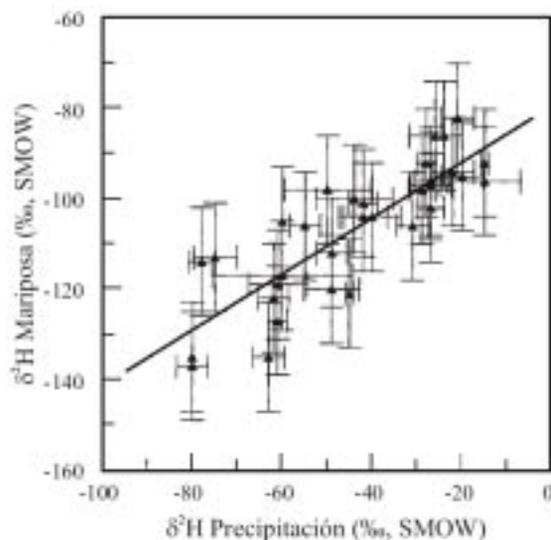


Figura 7. Relación entre la proporción de isótopos de hidrógeno de la materia orgánica de alas de las mariposas monarcas (δ^2H_m) y el de la precipitación promedio en el sitio de nacimiento (δ^2H_p) (adaptado de Hobson et al. 1999). ($\delta^2H_m = 0,62 \delta^2H_p - 79$; $r^2 = 0,69$).

fica en la composición de las precipitaciones refleja las diferencias de temperatura en las nubes al momento de ocurrir la precipitación. En este caso, por ejemplo, existe una variación de ~45% a través de la porción este de Norte América, lo que permitió identificar las regiones de las cuales provenían las mariposas monarca.

Reconstrucción de la Temperatura del Aire Utilizando Testigos de Hielo

Las proporciones de isótopos estables de hidrógeno y oxígeno en el agua han sido utilizadas para reconstruir paleo-temperaturas. Como ya se ha mencionado, el fraccionamiento isotópico entre el vapor de la nube y la precipitación es temperatura dependiente. Los científicos han capitalizado esta observación al analizar perfiles de hielo profundo, como es el hielo en la Antártica (Petit et al. 1999, Morgan et al. 2002). En la figura 8 se muestra la proporción de isótopos de oxígeno en el hielo de los últimos 420.000 años AP en el testigo de hielo de Vostok (Antártica).

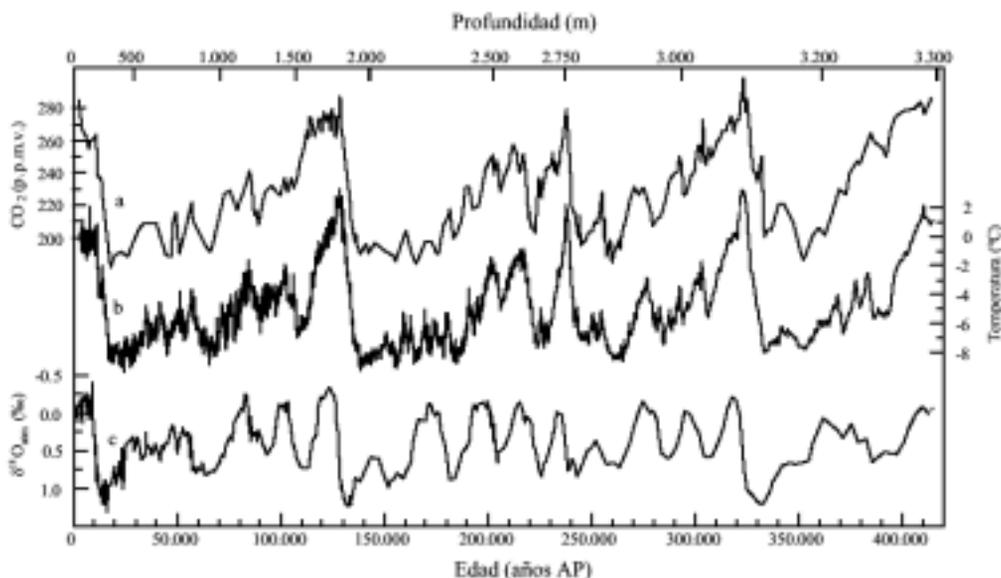


Figura 8. Serie de tiempo derivada del testigo de hielo de la estación Vostok en la Antártica Este. Se muestra: (a) la concentración de CO_2 atmosférico, (c) proporción de isótopos de oxígeno atmosférico ($\delta^{18}O$), y (b) la temperatura del aire inferida a partir de $\delta^{18}O$ para los últimos cuatro ciclos glaciales / interglaciales durante los pasados 420.000 años (adaptado de Petit et al. 1999).

Estos datos revelan las oscilaciones isotópicas observadas en los últimos cuatro ciclos glacial – interglaciales. Cuando esos valores isotópicos son convertidos a sus diferencias de temperatura equivalentes, se observa que la temperatura en esa localidad varió cerca de 10°C entre los máximos glaciales e interglaciales. De particular importancia también son los pequeños ciclos de temperatura, que reflejan oscilaciones climáticas, y el rápido cambio desde un régimen de temperatura a otro. Las reconstrucciones climáticas utilizando $\delta^{18}\text{O}$ de testigos de hielo en la Cordillera de los Andes Centrales han entregado recientemente una nueva fuente de evidencia para la interpretación de los cambios paleo-ecológicos en Sudamérica. La reconstrucción climática de los últimos 25.000 años en el Nevado Sajama (Bolivia) realizada por Thompson et al. (1999), le permitió a Betancourt et al. (2000) contrastar sus evidencia de cambios vegetacionales en los últimos 22.000 años en el Salar de Atacama. Aumentos en el $\delta^{18}\text{O}$ en Sajama (i.e., interpretado como aumento de temperatura y menor humedad) van acompañadas con disminución en la diversidad de especies y en la abundancia de gramíneas registradas en los nidos fósiles de roedores. Un notable cambio fue detectado entre los 11.000 y 10.000 años AP, al fin de la última glaciación. Kuch et al. (2002), en un análisis de las secuencias de genes en el ADN de cloroplastos de plantas y mitocondrial de animales de material extraídos de nidos datados en 11.700 años AP, identificó a *Phyllotis limatus* como el agente constructor de los nidos. Las poblaciones actuales de *P. limatus* se ubican 100 km al norte. Junto con la pérdida de especies, la vegetación se habría desplazado sobre 750 m en elevación. Otra reconstrucción climática basada en $\delta^{18}\text{O}$ de testigos de hielo del Nevado Huascarán (Perú), con una resolución mensual en los últimos 68 años, permite monitorear los cambios climáticos provocados por ENOS (Henderson et al. 1999), así como su magnitud y duración. Debido a los vientos dominantes que vienen del Este, el Nevado Huascarán registra el clima regional de la Amazonía. En los años El Niño se produce un enriquecimiento de ^{18}O , indicando condiciones cálidas y secas sobre el noreste de Brasil. Al entrar en la fase La Niña, la señal isotópica se torna más negativa, indicando un clima más frío y húmedo.

3.2 Aplicación de Isótopos Estables de Carbono

Eficiencia en el Uso del Agua (EUA)

La productividad y la evapotranspiración están linealmente correlacionadas en la vegetación natural (Ehleringer & Mooney 1983, Jarvis & McNaughton 1986, Stanhill 1986, Baldocchi et al. 1987, Stephenson 1990). Esta relación refleja el inevitable compromiso entre la transpiración y la fotosíntesis, ya que los estomas regulan las tasas de difusión de vapor de agua hacia la atmósfera y del dióxido de carbono hacia la hoja. La eficiencia en el uso del agua (EUA) es un parámetro utilizado frecuentemente para describir el compromiso entre fotosíntesis y transpiración, la que se define como la proporción molar del carbono asimilado en la fotosíntesis (A) y el agua perdida por transpiración (E). La eficiencia en el uso del agua instantánea (A/E) medida en estudios de intercambio de gases, puede ser expresada según Farquhar et al. (1989) como:

$$A/E = (c_a / (1,6 * v)) * (1 - (c_i/c_a))$$

Bajo condiciones de campo, la concentración atmosférica de CO_2 es relativamente constante (c_a), por lo que A/E depende primariamente de la concentración intercelular de CO_2 (c_i) y del gradiente de vapor de agua entre la hoja y la atmósfera (v). EUA aumenta al disminuir c_i ó v . La eficiencia en el uso del agua también puede ser estimada en el largo plazo. La discriminación isotópica de carbono (Δ) que ocurre en las hojas de las plantas C_3 está relacionada con el intercambio de gases fotosintéticos, porque la $\delta\Delta$ es una medida de c_i/c_a en el largo plazo (Farquhar et al. 1989, Ehleringer et al. 1990, 1992, 1998a, Ehleringer & Cook 1991, Ehleringer & Monson 1993, Ehleringer 1994, Williams & Ehleringer 1996, Brooks et al. 1997, Flanagan & Ehleringer 1998). El valor de c_i/c_a puede diferir entre las plantas cuando ocurre un cambio en la apertura estomática y/o en la demanda de CO_2 a nivel de los cloroplastos. La discriminación que ocurre en las plantas C_3 (Δ) es definida por la siguiente ecuación:

$$\Delta = a + ((b - a) * (c_i/c_a))$$

donde a es el fraccionamiento que ocurre debido a la difusión en el aire (4,4%), b es el fraccionamiento neto que ocurre durante la

carboxilación (principalmente por la Rubisco, aproximadamente un 27%) (Farquhar et al. 1982, 1989). La Δ se relaciona con $\Delta^{13}\text{C}$ a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta = (\delta^{13}\text{C}_a - \delta^{13}\text{C}_p) / (1 + \delta^{13}\text{C}_p)$$

donde los subíndices *a* y *p* se refieren a la fuente atmosférica de CO_2 y al CO_2 fijado por la planta (producto), respectivamente. Dado que el carbono es fijado continuamente por la hoja, el valor de la Δ entrega una estimación integrada de c_i/c_a . El análisis isotópico de diferentes componentes de la planta puede integrar respuestas a diferentes escalas de tiempo. Dentro de la hoja, el análisis isotópico del azúcar y del almidón entrega una estimación de la Δ para un período de 3-5 (10) días. Los análisis foliares entregan una estimación de la Δ producida durante el período de vida de la hoja, y el análisis de los anillos de crecimiento pueden ser usados para integrar la respuesta anual.

Utilizando la discriminación isotópica de carbono (Δ) para estimar la EUA en plantas C_3 , se ha demostrado que la EUA y el potencial hídrico estaban negativamente correlacionados; es decir, aumentos en la EUA están asociados con aumentos de estrés hídrico (potencial hídrico más negativo) (DeLucia & Schlesinger 1991, Ehleringer et al. 1992, Flanagan et al. 1992). Dentro de un hábitat determinado, el valor de Δ está inversamente relacionado con la expectativa de vida de los arbustos de desierto (Schuster et al. 1992, Ehleringer 1993, Ehleringer et al. 1998b). Las especies de larga vida son más conservativas en su EUA que las especies de corta vida. Semejante patrón también ha sido encontrado en diversas situaciones ecológicas y agrícolas (Ehleringer & Copper 1988, Ehleringer et al. 1990, 1998a, Ehleringer & Cook 1991, Smedley et al. 1991, Ehleringer & Dawson 1992, Buchmann et al. 1996, 1997). Marshall & Zhang (1994) mostraron que las especies leñosas siempre-verdes poseen una ma-

yor EUA a largo plazo en comparación a las deciduas a lo largo de un gradiente altitudinal en las Montañas Rocallosas. El mismo patrón fue observado por Sobrado & Ehleringer (1997) en un bosque tropical estacionalmente seco de Venezuela. Estos antecedentes indicarían una estrategia más conservadora en el uso del agua de las especies siempre-verdes en comparación con las deciduas. Una excepción a esta tendencia de una mayor EUA en especies siempre-verdes se observa en el desierto costero del norte-centro de Chile. En la figura 9 se muestran cambios notables en la discriminación isotópica de carbono entre los periodos secos y lluviosos, sin embargo no se encontraron diferencias entre las especies siempre-verdes y las deciduas, indicando un uso oportunista de las lluvias durante los años El Niño por ambos grupos funcionales.

Recientemente, Ehleringer et al. (1998a) mostraron que las especies C_3 de Pajoso poseen una de las más bajas concentraciones intercelular de CO_2 reportadas (159 a 190 ppm), con alta EUA en respuesta a las severas condiciones de estrés hídrico imperantes en el Desierto de Atacama. En el otro extremo, las menores EUA se encuentran en especies que habitan en condiciones de baja radiación y alta disponibilidad de agua (Flanagan et al. 1998). Durante un año lluvioso en el norte chico de Chile, Squeo et al. (1994) mostraron que *Encelia canescens* mantuvo una EUA relativamente constante a través de un gradiente de aridez, lo que es explicado por una regulación del ángulo foliar y por lo tanto de la diferencia de presión de vapor entre hoja y aire. Sin embargo, el crecimiento estuvo positivamente correlacionado con la

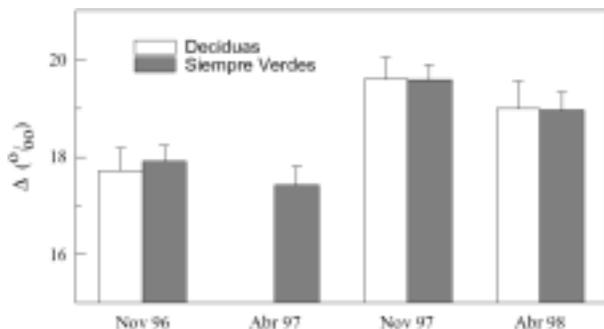


Figura 9. Discriminación isotópica de carbono (Δ) promedio de especies arbustivas deciduas ($n = 7$) y siempre verdes ($n = 5$) en dos años con precipitaciones contrastantes, en Quebrada El Romeral, norte-centro de Chile (30°S). El invierno de 1996 fue seco ($pp = 41,8 \text{ mm}$) mientras que el de 1997 fue lluvioso ($pp = 233,9 \text{ mm}$) (Squeo, no publ.).

cantidad de precipitación, indicando una estrategia de máximo uso del agua cuando está disponible. Sin embargo, en comparación a un año lluvioso, *E. canescens* aumenta su EUA en un año seco, al igual que otras especies de este género (Sandquist & Ehleringer 1996, 1997). Datos isotópicos de un bosque tropical de la región amazónica suroeste del Brasil muestran que $\delta^{13}\text{C}$ está correlacionado con la altura de los árboles (Martinelli et al. 1998). En este caso, los árboles más altos muestran menor discriminación sugiriendo mayor EUA, y con el respectivo fraccionamiento, esta señal se repetía en la materia orgánica del suelo.

Diferencias entre Plantas C_3 y C_4

La vía fotosintética C_4 se ha encontrado en 18 familias de angiospermas (15 familias de dicotiledóneas y 3 de monocotiledóneas). En términos de biomasa y número de especies es mucho más importante dentro de las monocotiledóneas (la mitad de las especies de gramíneas son C_4). A diferencia de las plantas C_3 , la fotosíntesis de las plantas C_4 funcionan como un sistema cerrado. La Rubisco, localizada en las células de la vaina del haz, consume todo el CO_2 asimilado por la PEP carboxilasa en el mesófilo, por lo que no existe fraccionamiento cinético. En consecuencia, el fraccionamiento por difusión se torna el más importante. El valor de $\delta^{13}\text{C}$ de las plantas C_4 es en promedio cercano a los $-12,5\text{‰}$ mientras que en las plantas C_3 es -27‰ (Fig. 10). La variación en la proporción de isótopos estables de carbono en la

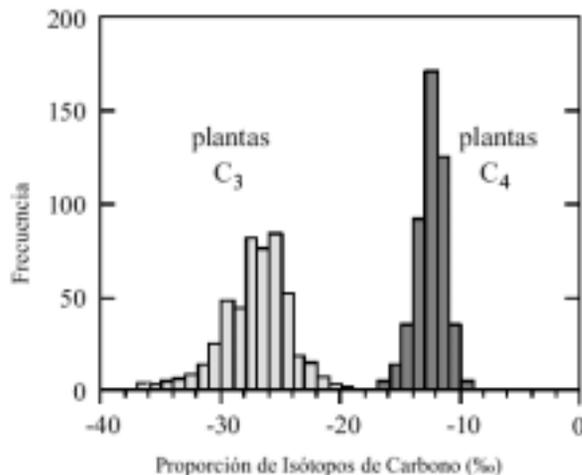


Figura 10. Histograma de la proporción de isótopos de carbono de plantas C_3 y C_4 . Datos corresponden a 965 especies (modificado de Cerling et al. 1997).

plantas C_4 es explicado en parte por la existencia de tres sub-vías metabólicas que tienen pequeñas diferencias en las reacciones de fijación del CO_2 atmosférico (NADP-me, NAD-me y PEP-ck) (Kanai & Edwards 1999). Adicionalmente, Dengler y Nelson (1999) reconocen ocho diferentes tipos estructurales, los que presentan diferencias en la cosecha lumínica, composición de isótopos estables y patrones de distribución.

La diferencia isotópica entre plantas C_3 y C_4 ha sido utilizada para investigar cambios en la proporción de estas dos vías metabólicas en gradientes ambientales. Utilizando material de herbario, Arroyo et al. (1990) aplican esta metodología para definir la vía fotosintética (C_3 , C_4 , CAM) de especies de Portulacáceas en el norte de Chile. Cavagnar (1988) describe el reemplazo altitudinal de gramíneas C_4 por gramíneas C_3 entre el Monte (560 msnm) y la Pre-Puna (2.600 msnm) en los Andes de Mendoza (Argentina). La diferencia isotópica entre plantas C_3 y C_4 también ha permitido evaluar la contribución relativa a la biomasa de raíces de cada grupo de plantas (Svejar & Boutton 1985). O como en el caso de Polley et al. (1992), que a través de combinar el análisis de $\delta^{13}\text{C}$ con $\delta^{15}\text{N}$, les permitió determinar la biomasa radicular en un estudio de competencia entre tres especies. En este caso, las dos especies C_4 utilizadas dominaron los primeros 20 cm del suelo mientras que la única especie C_3 segregó hacia mayores profundidades.

La diferencia isotópica entre la vegetación C_3 y C_4 también ha sido explotada para determinar los cambios ecológicos en el pasado. La proporción de plantas C_3 y C_4 en un ecosistema o en la dieta de un herbívoro queda registrada en el carbono orgánico o en los carbonatos del suelo, y en los tejidos de los animales (por ejemplo, huesos, esmalte de los dientes). La materia orgánica preservada en el suelo tiene cerca del mismo valor de $\delta^{13}\text{C}$ que las plantas que fijaron el carbono, mientras que los carbonatos del suelo y el esmalte de los dientes de los mamíferos están enri-

quecidos en cerca de 14‰ comparado con al vegetación.

El estudio de suelos fósiles y del esmalte de dientes de mamíferos de los sedimentos de Siwalik en Paquistán realizado por Cerling et al. (1998) muestra cómo los isótopos pueden ser utilizados para la reconstrucción de paleo-ecosistemas (Fig. 11). Los suelos fósiles muestran que antes de los 8 millones de años, el ecosistema local era dominado por plantas C_3 , a partir de esa fecha fue gradualmente reemplazado por plantas C_4 , hasta que a los 5 millones de años las plantas C_4 se tornaron dominantes. El esmalte de dientes fósiles de la misma región muestra que los mamíferos tenían una dieta dominada por plantas C_3 hasta los ocho millones de años, pero que cambiaron paulatinamente su dieta a plantas C_4 , siguiendo el cambio de la vegetación. Este cambio en vegetación estuvo acompañado de una variación significativa en el $\delta^{18}O$ del agua local de origen atmosférico, indicando un cambio significativo del sistema de monzones. Aunque las plantas C_4 han existido por al menos 12 millones de años, es sólo hace unos 7 millones de años que ellas han contribuido a una fracción significativa de la producción primaria neta. Con el mismo procedimiento, MacFadden et al. (1996) muestran que hasta 8 millones de años AP, la

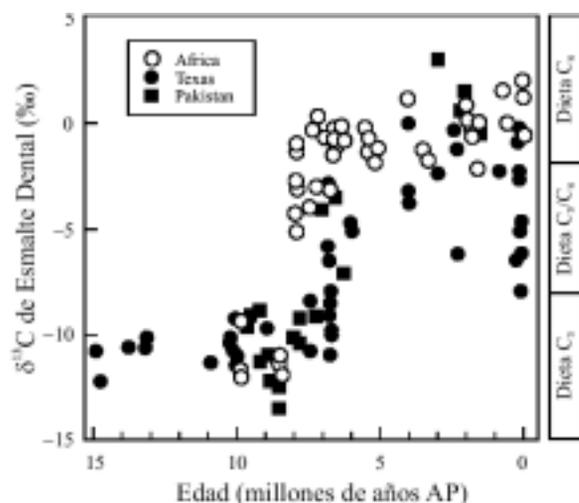


Figura 11. Proporción de isótopos de carbono ($\delta^{13}C$) en el esmalte dental de equinos de Norte América (Texas), Paquistán (Siwalik) y el Este de África. Todos los sitios muestran un incremento en la $\delta^{13}C$ entre los 8 y 6 millones de años AP, identificando un incremento global en la biomasa de las plantas C_4 (modificado de Cerling & Ehleringer 2000).

vegetación dominante en Argentina era C_3 , y que paulatinamente se incorporaron las gramíneas C_4 (i.e., cambio en $-3,5\%$ del $\delta^{13}C$ en el esmalte de diente fósiles). Datos más recientes a los 8 millones de años AP muestran un gradiente de $\delta^{13}C$, que corresponde al gradiente latitudinal de reemplazo de plantas C_3 por C_4 .

Cambios paralelos de vegetación C_3 a C_4 , ocurrieron entre hace 8 y 5 millones de años en Norte América, Sudamérica, Asia y África, indicando la expansión global de las plantas C_4 (Cerling & Ehleringer 2000). ¿Qué explica la aparición del metabolismo C_4 ? La ganancia de carbono difiere entre las plantas C_3 y C_4 bajo diferentes combinaciones de temperatura y CO_2 atmosférico (Cerling et al. 1997, Ehleringer et al. 1997). Cuando decrecen los niveles de CO_2 atmosférico, la fotosíntesis C_4 se ve favorecida en términos relativos porque tiene mayor eficiencia lumínica (Fig. 12). Este modelo predice que las plantas C_3 dominaron durante periodos de la historia de la tierra cuando los niveles de CO_2 atmosféricos estaban sobre los ~ 500 ppm. Las plantas C_4 tendrían ventajas selectivas sólo en ecosistemas cálidos cuando los niveles de CO_2 atmosférico bajaron hasta cerca de 500 ppm. Ahora, en la medida que los niveles de CO_2 continuaron bajando, creció la ventaja relativa de la fotosíntesis C_4 y el modelo predice que la dominancia de las plantas C_4 avanza hacia los climas más fríos (Ehleringer & Cerling 2001).

La expansión de las plantas C_4 entre los 5 a 8 millones de años AP coincidió con importantes extinciones de mamíferos y un fuerte recambio faunístico (Cerling & Ehleringer 2000). Según estos autores, la razón de este recambio faunístico asociado a incremento mundial de las plantas C_4 parece estar en la fisiología de los mamíferos. La estructura foliar de las plantas C_3 y C_4 presenta diferencias anatómicas que pueden ser de importancia mayor en sus digestibilidades relativas. Los nutrientes disponibles para los herbívoros se concentran cercanos a los sitios de carboxilación, en las células del mesófilo de las plantas C_3 y en las células de la vaina del haz vascular en las C_4

(Ehleringer & Monson 1993). La distribución de estas células explica por qué las plantas C_3 tienen un mayor contenido de nitrógeno foliar que una planta C_4 análoga. Los mamíferos herbívoros modernos presentan fuertes preferencias por dietas C_3 versus C_4 y rara vez una mezcla de ella. Esta situación se repite en insectos herbívoros (Boutton et al. 1978, Ehleringer & Monson 1993). Es conocido de que existen diferencias significativas en la morfología de la mandíbula y/o dientes que se correlacionan con la preferencia dietaria C_3 o C_4 (Ehleringer & Cerling 2001).

Estudios de Cadenas Tróficas

Magnusson et al. (1999) estudiaron el flujo de energía desde plantas C_3 y C_4 hacia los niveles tróficos superiores en una sabana de la Amazonía tropical. Los insectos consumidores primarios variaron entre saltamontes especialistas en C_3 ($\delta^{13}C = -29,5\%$) y termitas especialistas C_4 ($\delta^{13}C = -14,7\%$). Los vertebrados omnívoros e insectívoros más comunes tenían una señal isotópica intermedia, indicando que el carbono provenía de dife-

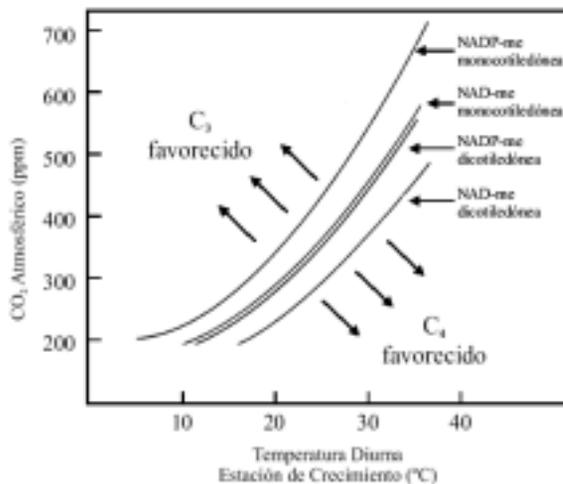


Figura 12. Productividad cuántica de asimilación de CO_2 para monocotiledóneas y dicotiledóneas como una función de la concentración del CO_2 atmosférico. Las condiciones límite, tanto para las plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, son los grupos C_4 NADP-me (borde superior) y C_4 NAD-me (borde inferior). Las curvas representan la temperatura de reemplazo de las especies C_3 por cada tipo de planta C_4 . La temperatura de reemplazo es definida como la temperatura (para una particular concentración de CO_2) donde la productividad cuántica de asimilación de CO_2 es equivalente para las plantas C_3 y C_4 (modificado de Ehleringer et al. 1997).

rentes fuentes autotróficas. En otro estudio, Magnusson et al. (2001) muestran a través del análisis de $\delta^{13}C$ en cuatro especies de lagartijas que la fuente de carbono (C_3 o C_4) dependía del tamaño del individuo y la especie de lagartija.

Cambios en el Carbono Orgánico: Límites Ectonales y Fuentes de Sedimentos

A través de la determinación del $\delta^{13}C$ de la materia orgánica del suelo, Victoria et al. (1995) mostraron para el Pantanal brasileiro, que habría ocurrido un reemplazo de sabanas arbóreas (dominadas por vegetación C_3) por sabanas con pastizales (dominadas por C_4) entre los 11.400 y 4.600 años AP. Entre los 5.000 y 4.000 años AP se habría producido una de las más fuertes sequías en los trópicos y sub-trópicos de Sudamérica (Abraham et al. 2000). A partir de los 1.400 años AP habría ocurrido una reversión de pastizales a sabanas arbóreas, provocado por un cambio local en el régimen de inundación. El carbono orgánico particulado (COP) que es arrastrado por las aguas de los ríos de una cuenca llevan la señal isotópica de la vegetación de las áreas de colecta del agua. En el Amazonas, Bird et al. (1992) indican que el COP proveniente de las cuencas dominadas sabanas tiene un $\delta^{13}C$ superior a -26% , que lo permite diferenciarla fácilmente de una fuente de COP de una cuenca forestada. Entre el COP de las cuencas forestadas y las dominadas por sabanas hay una diferencia isotópica cercana a 3% , por lo que además del dato actual, el $\delta^{13}C$ del sedimento de una cuenca puede entregar información sobre los cambios pasados de la vegetación.

Señal Isotópica en el CO_2 Respirado

En un estudio pionero en Sudamérica, Onetto et al. (en prensa) midieron el $\delta^{13}C$ foliar y del CO_2 liberado durante la respiración (δ_r) en bosques y sabanas de la cuenca del Amazonas. Esta información fue utilizada para estimar las respuestas a los cambios estacionales e interanuales en las condiciones ambientales, y al cambio en el uso

del suelo (i.e., transformación de bosques a pastizales). Las muestras de aire fueron tomadas de entre 0,2 y 31 m en los bosques, y entre 0,2 y 0,7 m en las sabanas. Estos autores encontraron una buena correlación entre la variación estacional de las precipitaciones y el δ_r de los bosques. El δ_r varió entre -26‰ en los periodos secos y -29‰ en los húmedos. Al comparar el carbono proveniente de distintas partes del bosque, estos autores concluyen que la mayor parte del carbono respirado proviene de los carbohidratos fijados en las hojas asoleadas de la parte alta del dosel. Por otro lado, el reemplazo de un bosque por una pradera C_4 resulta en un rápido enriquecimiento del CO_2 respirado en $\delta^{13}C$ de aproximadamente 10‰. Por otro lado, el incendio de pastizales de lugares previamente forestados, acelera la pérdida del carbono fijado por las plantas C_3 , y como resultado del aumento en dominancia de las plantas C_4 , se produce un aumento de los valores de δ_r .

3.3 Aplicación de Isótopos Estables de Nitrógeno

Determinando las Fuentes de Nitrógeno

La composición isotópica de nitrógeno en las plantas y suelo puede proveer información valiosa respecto a las entradas y posteriores transformaciones del nitrógeno dentro de un ecosistema (Evan & Ehleringer 1993, 1994). La entrada de nitrógeno a un ecosistema ocurre principalmente a través de fijación biológica y depositación atmosférica. La contribución de la fijación simbiótica de nitrógeno al nitrógeno total en una planta puede ser estimada mediante $\delta^{15}N$. La discriminación contra el ^{15}N durante la fijación biológica es pequeña, por lo que el $\delta^{15}N$ de la planta que sólo recibe nitrógeno proveniente de fijación simbiótica es cercano a 0‰. En contraste, la composición isotópica de las plantas que utilizan nitrógeno mineral, fuente de nitrógeno que normalmente está enriquecida en ^{15}N , posee $\delta^{15}N$ mayores que 0‰. Por lo tanto, se puede estimar el aporte relativo de nitrógeno de la fijación simbiótica versus la absorción de nitrógeno mineral (Shearer & Kohl 1986). Por otro lado, el nitrógeno depositado por la lluvia, especialmente de fuentes marinas, es usualmente empobrecido en ^{15}N relativo a la atmósfera.

La lluvia es la fuente predominante de nitrógeno para sitios sucesionales tempranos en Hawái (Vitousek et al. 1987). Vitousek et al. (1989) observaron que las plantas que no fijan nitrógeno de estos sitios tenían valores de $\delta^{15}N$ tan negativos como -10,1‰, y el valor de $\delta^{15}N$ de la precipitación fue de -5,1‰. Valores negativos similares para la precipitación han sido informados para Sudáfrica $\delta^{15}N = -3‰$, Heaton et al. 1986) y la Antártica $\delta^{15}N = -11$ a $-24‰$, Wada et al. 1981). En un gradiente altitudinal (y de neblina) en dos localidades costeras del Desierto de Atacama (Pan de Azúcar y Paposos), Evans y Ehleringer (1994) mostraron que las plantas no fijadoras de nitrógeno poseían $\delta^{15}N$ entre 6 y 12‰, lejos del nitrógeno depositado por la neblina (-1‰), por lo que concluyeron que la asimilación inmediata de nitrógeno proveniente de la neblina no era una fuente importante de nitrógeno para estas especies. Por otro lado, *Tillandsia landbecki*, una planta sin raíces que obtiene sus nutrientes por depositación atmosférica tenía un valor de $\delta^{15}N = -0,3‰$.

El Papel de las Costras Microfíticas en el Balance de Nitrógeno en Sistemas Desérticos

En sistemas desérticos, la alteración física de las costras microfíticas que se desarrollan sobre el suelo, es uno de los factores primarios que explican la disminución del nitrógeno en el suelo y que estaría contribuyendo a la desertificación (Evans & Ehleringer 1994, Evans & Belnap 1999, Ehleringer 2001). Esta evidencia surge de comparar el contenido y la proporción de isótopos estables de nitrógeno de suelo y plantas en sitios con y sin alteración. La fijación de nitrógeno por parte de los líquenes presentes en las costras microfíticas determina un aumento en el nitrógeno del suelo y la señal isotópica se acerca a cero. La pérdida de nitrógeno del sistema a causa de los procesos de denitrificación y amonificación, provoca un enriquecimiento isotópico debido a que se pierde preferentemente ^{14}N . Dos ejemplos provienen del desierto continental del sur de Utah. En una localidad con pastoreo moderado con vacunos (Coral Pink Sand Dunes State Park), Evans y Ehleringer (1994) mostraron que la destrucción de la costra microfítica era responsable de una reducción del 66% del nitrógeno del suelo y del 21% del nitró-

geno foliar, mientras que el $\delta^{15}\text{N}$ era 1,8‰ y 1,6‰ más alto en suelo y planta, respectivamente. Aun luego de 30 años de recuperación, en "Canyonland National Park", el suelo perturbado tenía un 33% menos de nitrógeno y el $\delta^{15}\text{N}$ estaba 1,5‰ más alto respecto a las situaciones control, tanto en el suelo como en las plantas (Evans & Belnap 1999).

Fijación Simbionte de Nitrógeno

Prosopis tamarugo y *P. alba* en la Pampa del Tamarugal en el centro del Desierto de Atacama, una región donde las lluvias están ausentes, produce hojas que caen y se acumulan sobre una dura superficie de carbonato de calcio (llamada localmente caliche o tertel). La capa de hojarasca bajo los árboles puede llegar a alcanzar los 50 cm de profundidad, sin virtualmente ninguna descomposición. En un trabajo clásico sobre el ciclo del nitrógeno en este sistema, Ehleringer et al. (1992) muestra hojarasca acumulada hace más de 50 años en concentraciones de nitrógeno y relación C/N comparable a las hojas vivas. ¿Cómo nos ayudan los isótopos estables a entender la dinámica del nitrógeno en este sistema? El $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas muestra valores promedio de 0,3‰ y 0,4‰ para *P. tamarugo* y *P. alba*, respectivamente. Estos valores son típicos de las plantas que obtienen su nitrógeno exclusivamente a través de fijación biológica. El escaso nitrógeno del suelo tiene $\delta^{15}\text{N}$ promedios de 10,2‰, consistente con un fraccionamiento isotópico durante la mineralización. Debido a que el contenido de nitrógeno total de las aguas subterráneas es bajo y que los datos isotópicos indican que esencialmente todo el nitrógeno en *Prosopis* proviene de fijación biológica, efectivamente este ecosistema se comporta como un sistema abierto, donde virtualmente no hay reciclaje de nitrógeno. Dado el alto costo energético asociado con la fijación de N_2 , es sorprendente que casi nada del nitrógeno de la hoja es re-absorbido antes de la abscisión foliar. Otro ejemplo de fijación simbionte de nitrógeno es presentada por Evans y Ehleringer (1994) para *Astragalus* sp, una leguminosa que crece bajo la zona de neblina en Pan de Azúcar (Desierto de Atacama). Basados en los $\delta^{15}\text{N}$ de esta planta, ellos estiman que entre el 41% y 52% de su nitrógeno proviene de fijación biológica.

Evaluación de la Capacidad de Utilizar Pulsos de Agua y Nitrógeno

Gebauer y Ehleringer (2000), aplicando pulsos individuales de precipitación de 25 mm, con composición isotópica de nitrógeno e hidrógeno conocida y distinta a las fuentes naturales, demostraron que la absorción de agua y nitrógeno son independientes, y que las respuestas difieren entre distintas especies leñosas del sur de Utah. A principios del verano, menos del 10% del agua transpirada proviene de la precipitación, mientras que más tarde en el verano las plantas pueden absorber a través de sus raíces superficiales hasta el 65% del agua que transpiran. Interesantemente, a pesar que la presencia de agua en el suelo esta directamente correlacionada con la disponibilidad de nitrógeno para la planta, su absorción no lo está. Por ejemplo, en medio del verano sólo *Artemisia* absorbió cantidades apreciables de agua y nitrógeno. Agua, pero no nitrógeno fue absorbida por *Quercus*, mientras que *Vancleavea* absorbió nitrógeno pero no agua. Esta diversidad de utilización de pulsos sugiere que la diferenciación de nichos puede ser un componente importante de las funciones del ecosistema y que la competencia, pasada o presente, es un factor clave en la estructuración de las comunidades desérticas (Ehleringer et al. 1999).

4. Isótopos como Trazadores Geográficos

Como ya hemos discutido, los isótopos permiten recoger información valiosa sobre la eco-fisiología de plantas y animales, y el ambiente que habitan. Una aplicación en expansión es la determinación de origen geográfico de una muestra biológica. En el caso de las mariposas monarca, el $\delta^2\text{H}$ de sus alas entregó la información respecto a su origen (Hobson et al. 1999). Marra et al. (1998) utiliza $\delta^{13}\text{C}$ para investigar y conocer el destino invernal de un ave migratoria (*Setophaga rutinilla*), discriminando entre hábitat de bosque húmedo bajo y de matorral secundario de Jamaica y Honduras. Ehleringer et al. (2000) muestra el uso de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para definir el origen de cocaína producida principalmente en Sudamérica. La combinación de estos dos isótopos diferencia claramente si las plantas de coca crecieron en Bolivia, Perú o Colombia.

Futuras Líneas de Investigación

En este capítulo se han resumido una gran diversidad de aplicaciones de los isótopos estables para la resolución de problemas ecológicos y fisiológicos en una amplia gama de organismos, tanto animales como plantas. Debido a que muchos son procesos ecológicos y fisiológicos íntimamente relacionados con procesos de fraccionamiento isotópico, la principal limitante de su uso en estudios ecofisiológicos es el entendimiento básico que tenemos de estas relaciones. Tanto por su bajo costo relativo, como por su utilidad en el seguimiento de procesos ecológicos y fisiológicos, hace prever una expansión en el uso de estas técnicas hacia los ámbitos productivos y de monitoreos ambientales, así como una profundización de su uso en investigación básica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Craig Cook, Evelyn Aguirre y Ramón Aravena por sus valiosos comentarios al manuscrito. Agradecemos el apoyo logístico dado por la Compañía Minera del Pacífico, faenas El Romeral, en especial a los Srs. Mario Rojo y Vasco Larraechea; el Observatorio Inter-Americano Cerro Tololo y la Comisión Chilena de Energía Nuclear. Este trabajo fue financiado por los Proyectos FONDECYT 1960037, 1000035 y 1030428.

Bibliografía

- ABRAHAM EM, K GARLEFF, H LIEBRICHT, AC REGAIRAZ, F SCHÄBITZ, FA SQUEO, H STINGL, H VEIT & C VILLAGRÁN (2000) Geomorphology and paleoecology of the arid diagonal in Southern South America. *Zeitschrift für Angewandte Geologie: Sonderheft SH 1*: 55-61.
- ARAVENA R. & E ACEVEDO (1985) The use of environmental isotopes oxygen -18 and Deuterium in the study of water relations of *Prosopis tamarugo* Phil. En: *The Current of State of Knowledge on Prosopis tamarugo* Habit/MAIFAO: 251.
- ARROYO MTK, E MEDINA & H ZIEGLER (1990) Distribution and $\delta^{13}\text{C}$ values of Portulacaceae species of the high Andes in Northern Chile. *Bot. Acta* 103: 291-295.
- BALDOCCHI DD, SB VERMA, & DE ANDERSON (1987) Canopy photosynthesis and water-use efficiency in a deciduous forest. *J. Appl. Ecol.* 24, 251-260.
- BETANCOURT JF, C LATORRE, JARECH, J QUADE & KA RYLANDER (2000) A 22,000-year record of monsoonal precipitation from northern Chile's Atacama Desert. *Science* 289: 1542-1546.
- BIRD MI, WS FYFE, DD PINHEIRO & AR CHIVAS (1992) Carbon isotope indicators of catchment vegetation in the Brazilian Amazon. *Global Biogeochemical Cycles* 6: 293-306.
- BOUTTON TW, GN CAMERON & BN SMITH (1978) Insect herbivory on C_3 and C_4 grasses. *Oecologia* 36: 21-32.
- BROOKS JR, LB FLANAGAN, N BUCHMANN & JR EHLERINGER (1997) Carbon isotope composition of boreal plants: functional grouping of life forms. *Oecologia* 110: 301-311.
- BUCHMANN N, WY KAO & JR EHLERINGER (1996) Carbon dioxide concentrations within forest canopies – variation with time, stand structure, and vegetation type. *Global Change Biology* 2: 421-432.
- BUCHMANN N, WY KAO & JR EHLERINGER (1997) Influence of stand structure on carbon-13 of vegetation, soils, and canopy air within deciduous and evergreen forests in Utah, USA. *Oecologia* 110: 109-119.
- CAVAGNARO JB (1988) Distribution of C_3 and C_4 grasses at different altitudes in a temperate arid region of Argentina. *Oecologia* 76: 273 277.
- CERLING TE & JR EHLERINGER (2000) Welcome to the C_4 world, p. 273-286. En: Gastaldo RA & WA DiMichele (eds) *Phanerozoic Terrestrial Ecosystems. The Paleontological Society Papers*. Yale University Press, New Haven.
- CERLING TE, JM HARRIS, BJ MACFADDEN, MG LEAKEY, J QUADE, V LSENMANN & JR EHLERINGER (1997) Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature* 389: 153-158.
- CERLING TE, JR EHLERINGER & JM HARRIS (1998) Carbon dioxide starvation, the development of C_4 ecosystems, and mammalian evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353: 159-171.
- CONWAY TJ, PP TANS, LS WATERMAN, KW THONING, DR KITZIS, KA MASARIE & N ZHANG (1994) Evidence for interannual variability of the carbon cycle from the National Oceanic and Atmospheric Administration/Climate Monitoring and Diagnostics Laboratory global air sampling network. *Journal of Geophysical Research* 99: 22831-22855.
- CRAIG H (1961) Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133: 1702-1703.
- DAWSON TE & JR EHLERINGER (1991) Streamside trees that do not use stream water. *Nature* 350: 335-337.

- DELUCIA EH & WH SCHLESINGER (1991) Resource-use efficiency and drought tolerance in adjacent Great Basin and Sierran plants. *Ecology* 72: 51-58.
- DENGLER NG & T NELSON (1999) Leaf structure and development in C_4 plants. En: R Sage & R Monson (eds) *C₄ Plant Biology*. Academic Press, Toronto
- EHLERINGER JR (1993) Gas-exchange implications of isotopic variation in arid-land plants. En: JAC Smith & H Griffiths (eds) *Water Deficits. Plant responses from cell to community*, Vol. 17: 265-284. Bios Scientific Publ., London.
- EHLERINGER JR (1994) Variation in gas exchange characteristics among desert plants. En: ED Schulze & MM Caldwell (eds) *Ecophysiology of photosynthesis*. Ecological Studies Series, Vol. 8, pp. 361-392. Springer Verlag, New York
- EHLERINGER JR (2001) Productivity of deserts. En: Mooney HA & J Roy (eds) *Primary Productivity in Terrestrial Ecosystems*: 345-362. Academic Press, San Diego.
- EHLERINGER JR & CS COOK (1991) Carbon isotope discrimination and xylem D/H ratios in desert plants. *Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility, and Environmental Studies*. Vienna, IAEA: 489-497.
- EHLERINGER JR & TA COOPER (1988) Correlations between carbon isotope ratio and microhabitat in desert plants. *Oecologia* 76: 562-566.
- EHLERINGER JR & TE CERLING (1995). Atmospheric CO_2 and the ratio of intercellular to ambient CO_2 concentrations in plants. *Tree Physiology* 15: 105-111.
- EHLERINGER JR & TE DAWSON (1992) Water-Uptake by Plants-Perspectives from Stable Isotope Composition. *Plant Cell and Environment* 15: 1073-1082.
- EHLERINGER JR & RK MONSON (1993). Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 24: 411-439.
- EHLERINGER JR & HA MOONEY (1983) Photosynthesis and productivity of desert and Mediterranean climate plants. *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)* Vol. 12D: 205-231. Springer-Verlag, New York.
- EHLERINGER JR, S SCHWINNING & RL GEBAUER (1999) Water use in arid land ecosystems. En: MC Press (ed) *Advances in Plant Physiological Ecology*: 347-365. Blackwell Science, Oxford.
- EHLERINGER JR, JF CASALE, MJ LOTT & VL FORD (2000) Tracing origins of cocaine with stable isotopes. *Nature* 408: 311-312.
- EHLERINGER JR, JW WHITE, DA JOHNSON & M BRICK (1990) Carbon isotope discrimination, photosynthetic gas exchange, and water-use efficiency in common bean and range grasses. *Acta Oecologia* 11: 611-625.
- EHLERINGER JR, SL PHILLIPS, WFS SCHUSTE & DR SANDQUIST (1991) Differential utilization of summer rains by desert plants: implications for competition and climate change. *Oecologia* 88: 430-434.
- EHLERINGER JR, SL PHILLIPS & JP COMSTOCK (1992) Seasonal variation in carbon isotope composition of desert plants. *Functional Ecology* 6: 396-404.
- EHLERINGER JR, RD EVANS & DW WILLIAMS (1998a) Assessing sensitivity to change in desert ecosystems - a stable isotope approach. En: H Griffiths (ed) *Stable Isotopes Integration of Biological, Ecological, and Geochemical Processes*: 223-237. BIOS Scientific Publ., Oxford.
- EHLERINGER JR, PW RUNDEL, B PALMA & HA MOONEY (1998b). Carbon isotope ratios of Atacama Desert plants reflect hyperaridity of region in northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 79-86.
- EVANS RD & JR EHLERINGER (1993) Broken nitrogen cycles in aridlands: evidence from $\delta^{15}N$ of soils. *Oecologia* 94: 314-317.
- EVANS RD & JR EHLERINGER (1994) Plant $\delta^{15}N$ values along a fog gradient in the Atacama Desert, Chile. *Journal of Arid Environments* 28: 189-193.
- EVANS RD & J BELNAP (1999) Long-term consequences of disturbance on nitrogen dynamics in an arid ecosystem. *Ecology* 80: 150-160.
- FARQUHAR GD, MC BALL, S VON CAEMMERER & Z ROKSANDIC (1982) Effects of salinity and humidity on $\delta^{13}C$ values of halophytes - evidence for diffusional isotope fractionation determined by the ratio of intercellular/atmospheric partial pressure of CO_2 under different environmental conditions. *Oecologia* 52: 121-124.
- FARQUHAR GD, JR EHLERINGER & KT HUBICK (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 40: 503-537.
- FARRINGTON P, JV TURNER & V GAILITIS (1996) Tracing water uptake by jarrah (*Eucalyptus marginata*) trees using natural abundances of deuterium. *Trees* 11: 9-15.
- FLANAGAN LB, JR EHLERINGER & JD MARSHALL (1992) Differential uptake of summer precipitation among co-occurring trees and shrubs in a pinyon-juniper woodland. *Plant, Cell and Environment* 15: 831-836.
- FLANAGAN LB, JR BROOKS & JR EHLERINGER (1998) Photosynthesis and carbon isotope discrimination in boreal forest ecosystems: a comparison of functional characteristics in plants from three mature forest type. *Journal of Geophysical Research* 102: 28861-28869.
- FLANAGAN LB & JR EHLERINGER (1998) Ecosystem-atmosphere CO_2 exchange: interpreting signals of

- change using stable isotope ratios. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 10-14.
- FRIEDMAN I, GL SMITH, JD GLEASON, A WARDEN & JM HARRIS (1992). Stable isotope composition of water in southeastern California 1. Modern precipitation. *Journal of Geophysical Research* 97: 5795-5812.
- GEBAUER RLE & JR EHLERINGER (2000) Water and nitrogen uptake patterns following moisture pulses in a cold desert community. *Ecology* 81:1415-1424.
- HEATON THE, AS TALMA & JC VOGEL (1986) Dissolved gas paleotemperatures and ^{18}O variations derived from groundwater near Uitengage, South Africa. *Quaternary Research* 25: 79-88.
- HENDERSON KA, LG THOMPSON & PN LIN (1999) Recording of El Niño in ice core $\delta^{18}\text{O}$ records from Nevado Huascarán, Peru. *Journal of Geophysical Research* 104: 31053-31065.
- HOBSON KA, LI WASSENAAR & OR TAYLOR (1999) Stable isotopes (δD and $\delta^{13}\text{C}$) are geographic indicators of natal origins of monarch butterflies in eastern North America. *Oecologia* 120: 397-404.
- JARVIS PG & KG MCNAUGHTON (1986) Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. *Advances in Ecological Research* 15: 1-48.
- KANAI R & GE EDWARDS (1999) The biochemistry of C_4 photosynthesis. En: RF Sage & RK Monson (eds) C_4 Plant Biology: 49-87. Academic Press, New York.
- KEELING RF, SC PIPER & M HEIMANN (1996) Global and hemispheric CO_2 sinks deduced from changes in atmospheric O_2 concentration. *Nature* 381: 218-221.
- KUCH M, N ROHLAND, JL BETANCOURT, C LATORRE, S STEPPAN & HN POINAR (2002) Molecular analysis of a 11,700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile. *Molecular Ecology* 11: 913-924.
- LIN G & L DA SL STERNBERG (1993) Hydrogen isotope fractionation by plant roots during water uptake in coastal wetland plants. En: JR Ehleringer (ed) *Stable Isotope and Plant Carbon-Water Relations*: 497-510. Academic Press, New York.
- LIN G, SL PHILLIPS & JR EHLERINGER (1996) Monsoonal precipitation responses of shrubs in a cold desert community on the Colorado Plateau. *Oecologia* 106: 8-17.
- MACFADDEN BJ, TE CERLING & J PRADO (1996) Cenozoic terrestrial ecosystem evolution in Argentina: evidence from carbon isotopes of fossil mammal teeth. *Palaeos* 11: 319-327.
- MAGNUSSON WE, MC DE ARAÚJO, R CINTRA, AP LIMA, LA MARTINELLI, TM SANAIOTTI, HL VASCONCELOS & RL VICTORIA (1999) Contributions of C_3 and C_4 plants to higher trophic levels in an Amazonian savanna. *Oecologia* 119: 91-96.
- MAGNUSSON WE, AP LIMA, AS FARIA, RLVICTORIA & LA MARTINELLI (2001) Size and carbon acquisition in lizards from Amazonian Savanna: Evidence from isotope analysis. *Ecology* 82: 1772-1780.
- MARSHALL JD & J ZHANG (1994) Carbon isotope discrimination and water-use efficiency in native plants of the north-central Rockies. *Ecology* 75: 1887-1895.
- MARTINELLI LA, S ALMEIDA, IF BROWN, MZ MOREIRA, RLVICTORIA, LSL STERNBERG, CAC FERREIRA & WW THOMAS (1998) Stable carbon isotope ratio of tree leaves, boles and fine litter in a tropical forest in Rondônia, Brazil. *Oecologia* 114: 170-179.
- MORGAN V, M DELMOTTE, T VAN OMMEN, J JOUZEL, J CHAPPELLAZ, S WOON, V MASSON-DELMOTTE & D RAYNAUD (2002) Relative Timing of Deglacial Climate Events in Antarctica and Greenland. *Science* 297: 1862-1864.
- MYNENI RB, CD KEELING, CJ TUCKER, G ASRARS & RR NEMANI (1997) Increased plant growth in the northern high latitudes from 1981 to 1991. *Nature* 386: 698-702.
- OLIVARES N (2003) Sistemas radiculares en especies arbustivas del desierto de Atacama: Paposo (25°S) y Romeral (30°S). Tesis Magister en Ciencias Biológicas mención Ecosistemas Áridos, Universidad de La Serena.
- OMETTO JPHB, LB FLANAGAN, LA MARTINELLI, MZ MOREIRA, N HIGUCHI & JR EHLERINGER. Carbon isotope discrimination in forest and pasture ecosystems of the Amazon Basin, Brazil. *Global Biogeochemical Cycles*: en prensa.
- PETIT JR, J JOUZEL, D RAYNAUD, NI BARKOV, JM BARNOLA, I BASILE, M BENDERS, J CHAPPELLAZ, M DAVIS, G DELAYGUE, M DELMOTTE, VM KOTLYAKOV, M LEGRAND, VY LIPENKOV, C LORIUS, L PÉPIN, C RITZ, E SALTZMAN & M STIEVENARD (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436.
- PHILLIPS SL & JR EHLERINGER (1995) Limited uptake of summer precipitation by bigtooth ample (*Acer grandidentatum* Nutt) and Gambel's oak (*Quercus gambelli* Nutt). *Trees* 9: 214-219.
- POLLEY HW, HB JOHNSON & HS MAYEUX (1992) Determination of root biomasses of three species grown in a mixture using stable isotopes of carbon and nitrogen. *Plant Soil* 142: 97-106.
- RODEN JS, G LIN & JR EHLERINGER (2000) A mechanistic model for interpretation of hydrogen and oxygen isotope ratios in tree-ring cellulose. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64: 21-35.
- RODEN JS & JR EHLERINGER (1999) Hydrogen and Oxygen isotope ratios of tree-ring cellulose for riparian

- trees growth long-term under hydroponically controlled environments. *Oecologia* 121: 467-477.
- SANDQUIST D & JR EHLERINGER (1996) Potential adaptability and constraints of response to changing climates for *Encelia farinosa* var. *phenicodonta* from Southern Baja California, Mexico. *Madrono* 43: 465-478.
- SANDQUIST DR & JR EHLERINGER (1997) Intraspecific variation of leaf pubescence and drought response in *Encelia farinosa* associated with contrasting desert environments. *New Phytology* 135: 635-644.
- SCHUSTER WSF, DR SANDQUIST, SL PHILLIPS & JR EHLERINGER (1992) Comparisons of carbon isotope discrimination in populations of aridland plant species differing in lifespan. *Oecologia* 91: 332-337.
- SHEARER G & DH KOHL (1986) N₂-fixation in field settings: Estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 699-756.
- SMEDLEY MP, TE DAWSON, JP COMSTOCK, LA DONOVAN, DE SHERRILL, CS COOK & JR EHLERINGER (1991) Seasonal carbon isotopic discrimination in a grassland community. *Oecologia* 85: 314-320.
- SOBRADO MA & JR EHLERINGER (1997) Leaf carbon isotope ratios from a tropical dry forest in Venezuela. *Flora* 192: 121-124.
- SQUEO FA, JR EHLERINGER, N OLIVARES & G ARANCIO (1994) Variation in leaf level energy balance components of *Encelia canescens* along a precipitation gradient in north-central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 143-155.
- SQUEO FA, N OLIVARES, S OLIVARES, A POLLASTRI, E AGUIRRE, R ARAVENA, C JORQUERA & JR EHLERINGER (1999) Grupos funcionales en arbustos desérticos definidos en base a las fuentes de agua utilizadas. *Gayana Botanica* 56: 1-15
- SQUEO FA, N OLIVARES, A VALENZUELA, A POLLASTRI, E AGUIRRE, R ARAVENA, C JORQUERA & JR EHLERINGER (2000) Fuentes de Agua Utilizadas por las Plantas Desérticas y su Importancia en Planes de Manejo y Restauración Ecológica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 65: 95-106.
- SQUEO FA, G ARANCIO & JR GUTIÉRREZ (2001) Libro Rojo de la Flora Nativa de la Región de Coquimbo y de los Sitios Prioritarios para su Conservación. Ediciones de la Universidad de La Serena, La Serena. 388 pp.
- STANHILL G (1986) Water use efficiency. *Advances in Agronomy* 39: 53-85.
- STEPHENSON NL (1990). Climatic control of vegetation distribution - the role of the water balance. *Amer Nat* 135: 649-670.
- SVEJCAR T J & TW BOUTTON (1985) The use of stable carbon isotope analysis in rooting studies. *Oecologia* 67: 205-208.
- TANS P & T CONWAY (2002) NOAA CMDL Carbon Cycle Greenhouse Gases. <http://www.cmdl.noaa.gov/ccgg>
- THOMPSON MV & JT RANDERSON (1999) Impulse response functions of terrestrial carbon cycle models: method and application. *Global Change Biology* 5: 371-394.
- THORBURN PJ, GR WALTER & JP BRUNEL (1993) Extraction of water from *Eucalyptus* trees for analysis of deuterium and oxygen-18: laboratory and field techniques. *Plant, Cell and Environment* 16: 269-277.
- THORBURN PJ & JR EHLERINGER (1995) Root water uptake of field-growing plants indicated by measurements of natural-abundance deuterium. *Plant and Soil* 177: 225-233.
- TORRES R, FA SQUEO, C JORQUERA, E AGUIRRE & JR EHLERINGER (2002) Evaluación de la capacidad estacional de utilizar eventos de precipitación en tres especies de arbustos nativos con distintos sistemas radiculares. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 737-749.
- VICTORIA RL, F FERNANDES, LA MARTINELLI, MC PICCOLO, PB DE CAMARGO & S TRUMBORE (1995) Past vegetation changes in the Brazilian Pantanal arboreal - grassy savanna ecotone by using carbon isotopes in the soil organic matter. *Global Change Biology* 1: 165-171.
- VITOUSEK PM, LR WALKER, LD WHITEAKER, D MUELLER-DOMBOIS & PA MATSON (1987) Biological invasion by *Myrica faya* alters ecosystem development in Hawaii. *Science* 238: 802-804.
- VITOUSEK PM, G SHEARER & DH. KOHL (1989) Foliar ¹⁵N natural abundance in Hawaiian rainforest: patterns and possible mechanisms. *Oecologia* 78: 383-388.
- WADA E, R SHIBATA & T TORII (1981) ¹⁵N abundance in Antarctica: origin of soil nitrogen and ecological implications. *Nature* 292: 327-329.
- WHITE JW, ER COOK, JR LAWRENCE & WS BROECKER (1985) The D/H ratios of sap in trees: implications for water sources and tree ring D/H ratios. *Geochimistry and Cosmochimistry Acta* 49: 237-246.
- WILLIAMS DG & JR EHLERINGER (1996) Carbon isotope discrimination in three semi-arid woodland species along a monsoon gradient. *Oecologia* 106: 455-460.