
EL USO DE ISÓTOPOS ESTABLES EN BIOLOGÍA TROPICAL

LOUIS S. SANTIAGO, KATIA SILVERA,
JOSÉ LUIS ANDRADE y TODD E. DAWSON

Los análisis con isótopos estables se han convertido en una herramienta ecológica que revela cómo los recursos de animales y plantas se mueven dentro de los ecosistemas. Sin embargo, los estudios isotópicos para ambientes tropicales son escasos en comparación con la gran cantidad de estudios que han sido publicados en zonas templadas. Las proporciones de isótopos estables de hidrógeno ($^2\text{H}/^1\text{H}$), carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), y oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) ofrecen muchas posibilidades en biología tropical, ya que pueden proveer información acerca de procesos que son difíciles de cuantificar usando otras técnicas, como lo son el origen de recursos utilizados por los organismos, procesos metabólicos dentro de los organismos, migración de animales, estudios de niveles tróficos, y ciclos biogeoquímicos, entre otros (Dawson *et al.*, 2002). En esta revisión, se detallan ejemplos de los tipos de descubrimientos que se han hecho en ecosistemas tropicales usando los isótopos estables de hidrógeno (H), carbono (C), nitrógeno (N), y oxígeno (O). También se trata de incentivar más estudios en ambientes tropicales que utilicen isó-

topos estables, dirigiendo al lector a información más detallada sobre métodos y tópicos de interés.

Los isótopos son átomos de un elemento que tienen las mismas propiedades químicas pero diferentes masas. Muchos procesos naturales causan una distribución desigual de isótopos pesados y livianos entre compuestos, y esta distribución puede dar información acerca de la física, la química y los procesos metabólicos que ocurren en transformaciones isotópicas. Las transformaciones isotópicas que llevan a cambios en la abundancia relativa de isótopos pesados y livianos entre el sustrato de la fuente y sus productos son llamados fraccionamientos isotópicos. Este fraccionamiento existe debido a que los isótopos más livianos forman enlaces químicos que requieren menos energía para romperse. En reacciones químicas, los isótopos más livianos generalmente reaccionan más rápido y tienden a quedar más concentrados en los productos (Dawson y Brooks, 2001). La variación existente en el rango de valores isotópicos de materiales de interés biológico (Tabla I) puede ser utilizada para marcar y trazar elementos que se mueven en ciclos biogeoquímicos complejos, tanto en plantas como en dietas

de animales. En esta revisión se intenta estimular el uso de los isótopos estables en biología tropical, ya que el poder de esta herramienta para estimar el movimiento de recursos a lo largo de sistemas biológicos complejos parece especialmente apropiado en ambientes tropicales.

Mediciones de Isótopos Estables

Los análisis automatizados en espectrometría de masas de isótopos y el desarrollo de laboratorios que brindan este servicio, han llevado a un rápido aumento en el número de estudios ecológicos que aplican análisis con isótopos estables. Para medir los isótopos estables, generalmente se toman muestras de material conocido, como aire, suelo, agua y/o tejido de plantas o animales. Las muestras son convertidas a forma gaseosa por combustión. Las muestras gaseosas son luego introducidas al espectrómetro de masas, ionizadas, y sus moléculas separadas de acuerdo a su masa. Luego, la proporción de masa/carga es medida de acuerdo a la proporción (R) de isótopos pesados (p.e. ^{15}N) a liviano (p.e. ^{14}N) de la muestra (Dawson y Brooks, 2001). Estas proporciones son luego convertidas a valo-

PALABRAS CLAVE / Carbono / Hidrógeno / Isótopos Estables / Nitrógeno / Oxígeno /

Recibido: 20/11/2004. Modificado: 18/07/2005. Aceptado: 21/07/2005.

Louis S. Santiago. **Doctor en Botánica, Universidad de Florida, EEUU. Postdoctorante, Departamento de Biología Integral, Universidad de California, Berkeley, EEUU. Dirección: 3060 Valley Life Sciences Building, Berkeley, CA 94720-3140, EEUU. e-mail: santiago@berkeley.edu**

Katia Silvera. **Maestría en Ciencias Botánicas, Universidad de Florida, EEUU. Becaria Predoctoral, Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Panamá.**

José Luis Andrade. **Doctor en Biología, Universidad de California, Los Angeles, EEUU. Profesor Investigador, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.**

Todd E. Dawson. **Doctor en Ecología, Universidad de Washington, EEUU. Profesor, Universidad de California, Berkeley, EEUU.**

res de delta (δ), en partes por mil, mediante la fórmula

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right) \times 1000$$

donde $R_{\text{estándar}}$ se refiere a una proporción estándar de material aceptada internacionalmente, la cual es específica y diferente para cada isótopo analizado. De esta manera se asegura que los datos entre diferentes estudios y diferentes laboratorios sean comparables (Werner y Brand, 2001). Un mayor valor de proporción isotópica, o δ , generalmente indica que la muestra es más pesada y, consecuentemente, más positiva en su valor δ relativo al material estándar. Cabe destacar que en la literatura, los términos “enriquecido” o “empobrecido” son comúnmente utilizados para referirse al isótopo más pesado o al más raro (p.e. “La muestra estaba empobrecida en ^{13}C ...”).

Carbono

El carbono entra a la biósfera en forma de CO_2 atmosférico que luego es fijado por las plantas mediante el proceso de fotosíntesis. La materia orgánica que es producida durante la fotosíntesis tiene un valor $\delta^{13}\text{C}$ indicativo de la ruta metabólica de la planta. Las diferencias existentes en $\delta^{13}\text{C}$ de las plantas están íntimamente relacionadas con el grado de discriminación en contra del ^{13}C de las enzimas carboxilasas (mayormente por RUBISCO en plantas C_3 y por PEP-carboxilasa en plantas C_4 y CAM). Estas diferencias permiten discernir entre las diferentes rutas metabólicas mayormente utilizadas por las plantas, basándose en una simple medición isotópica de C. Así, las plantas que tienen una ruta metabólica C_3 presentan un valor $\delta^{13}\text{C}$ entre -20 y -35‰;

las plantas que tienen una ruta metabólica C_4 tienen un valor $\delta^{13}\text{C}$ entre -9 y -17‰; y las plantas que tienen metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) presentan valores $\delta^{13}\text{C}$ que abarcan el rango de las plantas C_3 y C_4 (-10 a -22‰) y parecen estar relacionados con la proporción relativa de fijación C_3 y C_4 (Bender, 1971; Osmond, 1978). Esta proporción suele estar determinada por el estrés ambiental que experimentan las plantas CAM (Winter *et al.*, 1978; Farquhar *et al.*, 1989).

Las variaciones de $\delta^{13}\text{C}$ en plantas han sido utilizadas para estudiar la distribución de rutas metabólicas en comunidades de plantas o en grupos de especies emparentadas, como una forma de entender la evolución de las rutas fotosintéticas en taxones relacionados. Especies con rutas metabólicas C_3 y C_4 pueden ser fácilmente diferenciadas utilizando isótopos de C porque sus rangos de abundancia natural de $\delta^{13}\text{C}$ no se superponen (Cerling *et al.*, 1999). Es importante señalar que se puede subestimar el número de especies con fotosíntesis CAM en estudios que utilizan solamente valores de $\delta^{13}\text{C}$ para determinar esta ruta fotosintética (Pierce *et al.*, 2002; Winter y Holtum, 2002; Silvera *et al.*, 2005). Los valores $\delta^{13}\text{C}$ han sido utilizados en combinación con la acumulación de acidez nocturna medida por titulación para estimar, por ejemplo, que el 51% de especies de orquídeas de Panamá tienen metabolismo CAM (Silvera *et al.*, 2005). En otro estudio, los valores isotópicos $\delta^{13}\text{C}$ fueron utilizados para distinguir entre herbáceas con rutas fotosintéticas C_3 versus C_4 (Miranda *et al.*, 1997). Los valores $\delta^{13}\text{C}$ también han sido utilizados junto con análisis filogenéticos para estimar el origen múltiple de fotosíntesis CAM en las familias Bromeliaceae (Crayn *et al.*, 2004) y Orchidaceae

(Silvera *et al.*, 2003). Los análisis con $\delta^{13}\text{C}$ han sido utilizados como una herramienta importante en estudios de ecología y distribución evolutiva de rutas metabólicas (Keeley y Rundel, 2003).

Los valores $\delta^{13}\text{C}$ en plantas también pueden tener importancia biológica cuando son comparados entre especies que tienen la misma ruta fotosintética (Farquhar *et al.*, 1982). Por ejemplo, la difusión de CO_2 puede afectar la discriminación de isótopos de C durante la fotosíntesis C_3 . Farquhar *et al.* (1982) han desarrollado un modelo que describe la relación entre la concentración intercelular de CO_2 (c_i), la concentración de CO_2 del ambiente (c_a) y la discriminación contra el ^{13}C durante la fotosíntesis. Ya que la diferencia entre c_i y c_a es proporcional al CO_2 asimilado fotosintéticamente/conductancia estomática (A/g; eficiencia de uso de agua; Farquhar y Sharkey, 1982), las mediciones foliares de $\delta^{13}\text{C}$ en plantas C_3 reflejan una medida integral de la eficiencia del uso de agua a través del tiempo en que fue asimilado el tejido foliar. Así, las medidas de $\delta^{13}\text{C}$ se convierten en una herramienta importante para investigar la forma en que las plantas ajustan su metabolismo de intercambio gaseoso, estrategias para el uso de recursos y los rasgos de historia de vida (Ehleringer y Cooper, 1988; Farquhar *et al.*, 1989; Ehleringer, 1993). En ecosistemas templados se ha observado que el $\delta^{13}\text{C}$ en las plantas varía con la humedad del suelo, la humedad del ambiente, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la salinidad y la concentración de CO_2 atmosférico (revisión de Dawson *et al.*, 2002). En bosques tropicales, se ha mostrado que el $\delta^{13}\text{C}$ foliar varía con la distancia al borde del bosque, la altura del bosque y el estado sucesional de las especies (Medina y Minchin, 1980; Medina *et al.*, 1991; Kapos *et al.*, 1993; Huc *et al.*, 1994; Ometto *et al.*, 2002). Los isótopos de C pueden ser utilizados para evaluar los rasgos relacionados con la fotosíntesis, la conductancia estomática, el potencial hídrico, la concentración de N foliar, el grosor de la hoja, la fenología y la tasa de crecimiento relativo debido a las respuestas integrales del $\delta^{13}\text{C}$ con las funciones fisiológicas de las plantas (Farquhar y Richards, 1984; Mooney *et al.*, 1989; Vitousek *et al.*, 1990; Meinzer *et al.*, 1992; Poorter y Farquhar, 1994; Schulze *et al.*, 1998; Bonal *et al.*, 2000). Sin embargo, en bosques tropicales, la interpretación del $\delta^{13}\text{C}$ se complica debido a que el $\delta^{13}\text{CO}_2$ es reciclado del CO_2 respirado dentro del dosel del bosque (Sternberg *et al.*, 1989; Broadmeadow *et al.*, 1992; Yakir y Sternberg, 2000).

Las medidas y análisis de $\delta^{13}\text{C}$ del CO_2 atmosférico y del CO_2

TABLA I
VALORES TÍPICOS Y RANGOS DE VALORES DELTA PARA DIFERENTES MATERIALES BIOLÓGICOS

| Material | Elemento | Valores típicos (‰) | Rango de valores δ (‰) |
|------------------|-----------|---------------------|-------------------------------|
| Tejido vegetal | Carbono | -27 | -35 a -10 |
| | Nitrógeno | +3 | -12 a +10 |
| Tejido animal | Carbono | -26 | -35 a -10 |
| | Nitrógeno | +10 | -8 a +35 ^a |
| Aguas meteóricas | Oxígeno | -5 | -45 a +10 |
| | Hidrógeno | -10 | -425 a +45 |
| Agua del mar | Oxígeno | 0 | -2 a +2 |
| | Hidrógeno | 0 | -10 a +10 |
| Aire | Carbono | -8 | -16 a -8 ^b |
| | Nitrógeno | 0 | -1 a +1 |

^a Algunos animales presentan valores isotópicos enriquecidos debido al reciclaje de las fuentes de alimentación.

^b -8‰ representa el promedio global del aire cuando está bien mezclado. El aire que no está en movimiento puede ser aún más negativo debido a la influencia de la respiración del suelo (Sternberg *et al.*, 1989; Buchmann *et al.*, 1997; Ometto *et al.*, 2002).

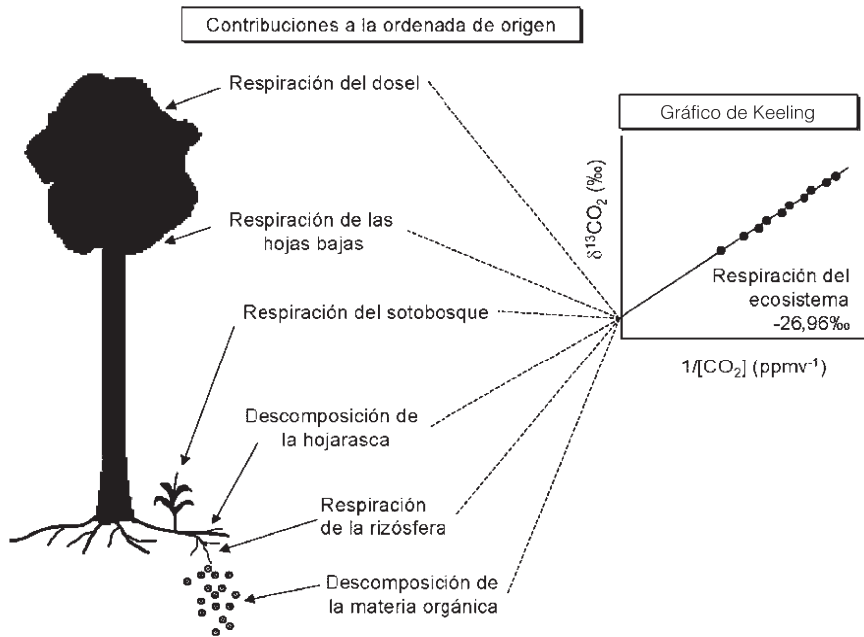


Figura 1. Gráfico de Keeling para un bosque tropical perennifolio cercano a Santarém, Brasil (Ometto *et al.*, 2002). La ordenada en el origen representa una señal isotópica compuesta de todas las fuentes de respiración del ecosistema, desde las hojas del dosel hasta los microorganismos del suelo (modificado a partir de Tu y Dawson, 2005).

dentro del dosel de un bosque pueden dar información integral, tanto espacial como temporal, de las fuentes de C respirado si se usan los llamados “Keeling plots” o gráficos de Keeling (Keeling, 1958; Quay *et al.*, 1989; Flanagan y Ehleringer, 1998). En la Figura 1 se muestra como la ordenada en el origen del gráfico de Keeling da el promedio del valor de $\delta^{13}\text{C}$ del CO_2 respirado por el ecosistema (δ_r). Varios ejemplos de las fuentes que contribuyen al valor total de δ_r demuestran el potencial para separar las contribuciones a la respiración del ecosistema (Tu y Dawson, 2005). Debido a la diferencia en el rango de $\delta^{13}\text{C}$ en plantas C_3 y C_4 (ver arriba), es posible discernir la contribución de dos fuentes distintas a la respiración del ecosistema. Por ejemplo, en un bosque del cerrado brasileño, los análisis de δ_r demuestran que el 40% del C respirado fue

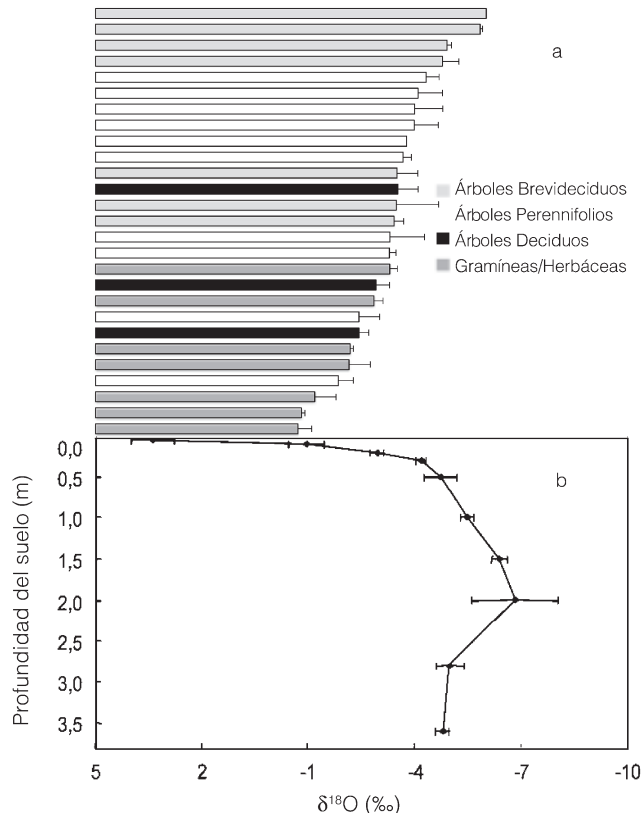


Figura 2. a: Promedio $\delta^{18}\text{O}$ de la savia del xilema colectada al final de la estación seca para 27 especies en un sitio cerrado *sensu stricto* del centro de Brasil; las barras representan los promedios y las líneas representan los errores estándares para 2-6 individuos por especie. b: $\delta^{18}\text{O}$ del agua del suelo en relación con la profundidad colectadas en el mismo sitio y al mismo tiempo; $n = 4$, por profundidad (modificado a partir de Oliveira, 2004).

producido por gramíneas C_4 , mientras que el 60% de la respiración del ecosistema fue producido por árboles y palmas C_3 (Miranda *et al.*, 1997). En un bosque amazónico de Manaus en Brasil, el fuego removió la mayoría de la vegetación C_3 y favoreció un incremento en la dominancia de gramíneas C_4 , lo que resultó en un valor δ_r mayor, correspondiente a una proporción más alta del C derivado de la materia orgánica C_4 (Ometto *et al.*, 2002). En un bosque de tierras bajas en Panamá, el δ_r fue utilizado para monitorear la contribución de la regeneración de la vegetación de un bosque C_3 en la respiración total del ecosistema luego del abandono de pastizales que fueron previamente dominados por gramíneas C_4 (Pendall *et al.*, 2003). En un bosque viejo del Amazonas en Brasil, el δ_r es similar a los valores $\delta^{13}\text{C}$ de hojas de sol de especies dominantes de árboles, a pesar de la gran estratificación vertical del $\delta^{13}\text{C}$ foliar (9‰). Esto indica que la mayoría del C que ha sido recientemente respirado en estos bosques fue fijado por las hojas de sol en la parte superior del dosel del bosque (Ometto *et al.*, 2002). En algunos bosques tropicales, el δ_r varía con los cambios de precipitación y temperatura (Ometto *et al.*, 2002), mientras que en otros bosques, el δ_r no parece ser diferente entre la estación lluviosa y la seca (Buchmann *et al.*, 1997). Es claro que se necesita más investigaciones que caractericen patrones tan complejos de respiración en ecosistemas tropicales. Sin embargo, es evidente que el uso de los isótopos estables ha producido avances importantes y descubrimientos en el área de los ciclos de C en ecosistemas, y es muy probable que en el futuro aumente nuestra comprensión de la contribución de la vegetación en bosques tropicales a los ciclos globales de carbono.

Nitrógeno

El N ocurre en la naturaleza en forma orgánica e inorgánica y circula en ecosistemas terrestres a través de procesos complejos (ver la figura 2 en Dawson *et al.* 2002). Las reacciones que no son completadas generan una variación en los valores de abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ entre las diferentes partes dentro de los ecosistemas. Debido a que muchos procesos discriminan contra el ^{14}N y ^{15}N , la variación natural de $\delta^{15}\text{N}$ resultante puede ser utilizada para obtener información sobre las fuentes de N utilizadas por los organismos. Sin embargo, el ciclo de N es complejo y las interpretaciones de $\delta^{15}\text{N}$ provenientes de diferentes fuentes pueden resultar erróneas (Handley y Scrimgeour, 1997). A pesar de las limitaciones para usar $\delta^{15}\text{N}$ en ecología, cuando cada fuente

dentro de un sistema tiene un $\delta^{15}\text{N}$ distintivo y detectable, es posible determinar las fuentes de N de las plantas (Shearer y Kohl, 1986; Evans, 2001; Robinson, 2001) o de animales (DeNiro y Epstein, 1981; Ehleringer *et al.*, 1986; Hobson, 1999; Herrera *et al.*, 2002) o bien cuantificar los cambios de nutrientes en relaciones simbióticas o relaciones mutualistas (Treseder *et al.*, 1995; Sagers *et al.*, 2000). Los estudios con enriquecimiento de ^{15}N se han popularizado debido a las limitaciones ya mencionadas para investigar ciclos y fuentes de N con técnicas que utilizan la abundancia natural. Nuevas técnicas como el análisis isotópico dual que analizan el $\delta^{15}\text{N}$ y el $\delta^{18}\text{O}$ en NO_3 (Durka *et al.*, 1994) podrían distinguir entre fuentes de N de plantas y animales, y determinar con mayor precisión la entrada y salida de N de los ecosistemas. Trabajos realizados recientemente sobre redes alimenticias y dietas tienen mucho que aportar en este sentido (Koch *et al.*, 1995; Schell *et al.*, 1998; Hobson, 1999).

Estudios realizados en plantas asumieron que el $\delta^{15}\text{N}$ del tejido de la hoja reflejaba el $\delta^{15}\text{N}$ de la fuente de N mayormente utilizada por la planta. Ahora sabemos que esto es incorrecto, ya que la abundancia natural del $\delta^{15}\text{N}$ de la planta refleja el efecto neto de una variedad de procesos que incluyen la presencia de múltiples fuentes de N con valores diferentes de $\delta^{15}\text{N}$, como las asociaciones con micorrizas, la variación temporal y espacial de la disponibilidad de N, y los cambios en la demanda de N por la planta (Handley y Scrimgeour, 1997; Högborg, 1997; Evans, 2001; Robinson, 2001; Dawson *et al.*, 2002). Además de la compleja variación en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las fuentes, los valores $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas usualmente difieren de los valores de las fuentes debido a las interacciones entre las fuentes y el fraccionamiento metabólico dentro de la planta (Robinson *et al.*, 1998; Kolb y Evans, 2002; Santiago *et al.*, 2004). Es claro que se requieren experimentos de laboratorio para elucidar cómo las rutas metabólicas fraccionan los isótopos de N.

Los estudios de isótopos han generado nueva información sobre el uso de N en epífitas y hemiepífitas debido a que estas formas de crecimiento utilizan fuentes de N que regularmente tienen valores $\delta^{15}\text{N}$ distintivos (Hietz *et al.*, 2002; Wania *et al.*, 2002; Reich *et al.*, 2003). En bosques de montaña de Costa Rica, las epífitas que crecen en ramas pequeñas y que no tienen acceso al suelo del dosel (materia en descomposición presente en las ramas de los árboles) tienen valores de $\delta^{15}\text{N}$ más bajos que epífitas enraizadas en el suelo del dosel, lo que indica que las

plantas que crecen en ramas pequeñas reciben una mayor proporción de N directamente de la precipitación (Hietz *et al.*, 2002). Reich *et al.* (2003) demostraron que las fuentes de N cambian durante el desarrollo ontogénico en bromeliáceas epífitas. Individuos pequeños utilizan 77-80% del N atmosférico, mientras que individuos más grandes utilizan predominantemente N que es derivado del suelo del dosel. La aplicación de ^{15}N a tres especies hemiepífitas del género *Clusia* en Costa Rica demostró que las formas enraizadas, tanto epífitas como terrestres, prefirieron amonio en vez de nitrato o glicina, y que el cambio entre el hábitat enraizado del suelo del dosel y el suelo terrestre no estuvo acompañado por un cambio en la tasa de toma de N, a pesar de que la disponibilidad y la composición de N variaron grandemente entre hábitos enraizados (Wanek *et al.*, 2002).

El N fijado biológicamente tiene un valor $\delta^{15}\text{N}$ similar al del N_2 de la atmósfera (0‰). Por esto, plantas como las leguminosas que fijan N_2 a través de relaciones simbióticas con bacterias deben tener valores $\delta^{15}\text{N}$ similares a 0‰ (Delwiche y Steyn, 1970; Shearer y Kohl, 1986), mientras que las plantas no fijadoras tienen un $\delta^{15}\text{N}$ similar al de su fuente de N, además de cualquiera de los efectos metabólicos discutidos anteriormente. Ya que el N del suelo está usualmente enriquecido en ^{15}N (Shearer *et al.*, 1978), es posible medir los valores $\delta^{15}\text{N}$ de plantas fijadoras y no fijadoras de N_2 y usar la diferencia entre $\delta^{15}\text{N}$ del suelo y el aire para calcular el porcentaje de N que es derivado a través de la fijación simbiótica de N_2 en plantas que fijan N_2 (Shearer y Kohl, 1986; Shearer y Kohl, 1993; Boddey *et al.*, 2000; Valles-Mora *et al.*, 2003). En algunas situaciones, los valores $\delta^{15}\text{N}$ no pueden distinguir entre potenciales plantas fijadoras de N_2 y plantas no fijadoras de N_2 (Högborg, 1986; Pate *et al.*, 1993; Handley *et al.*, 1994; Guehl *et al.*, 1998). En otras situaciones, se han obtenido estimaciones de fijación de N en ecosistemas tropicales en situaciones donde hay una diferencia significativa entre los valores $\delta^{15}\text{N}$ del suelo y del aire (Schulze *et al.*, 1991; Roggy *et al.*, 1999; Koponen *et al.*, 2003). En la Guyana Francesa, por ejemplo, el porcentaje de N foliar del dosel derivado de fijación simbiótica de N_2 basado en mediciones foliares de $\delta^{15}\text{N}$, excavación de nódulos, y la contribución de especies al área basal varía en un rango de 5,5% en bosques lluviosos creciendo en oxisoles (Roggy *et al.*, 1999) y 27,6% en pantanos de agua dulce (Koponen *et al.*, 2003).

Curiosamente, algunas de las técnicas utilizadas para diferenciar el

$\delta^{15}\text{N}$ entre leguminosas y no leguminosas fueron utilizadas para analizar huesos fósiles y determinar cuándo el frijol se convirtió en un alimento importante para los antepasados que vivieron en el Valle de Tehuacán, México (DeNiro y Epstein, 1981). Es posible estimar la contribución de diferentes fuentes de alimento a la dieta de los animales siempre y cuando estas fuentes tengan un valor isotópico distintivo. Por ejemplo, en un bosque lluvioso mexicano, se mostró que algunas especies de murciélagos frugívoros derivaron su N de frutas durante la mayoría del año, y otras especies de murciélagos cambiaron su dieta a insectos cuando la abundancia de frutos disminuyó (Herrera *et al.*, 2002). Los análisis con $\delta^{15}\text{N}$ también han sido utilizados para separar aves de bosques lluviosos, en diferentes niveles tróficos, incluyendo a las especies que obtienen su proteína dietética principalmente de plantas, insectos o ambos, ya que el N de los insectos está más enriquecido en ^{15}N que el N de las plantas (Herrera *et al.*, 2003). Cabe destacar que es posible rastrear el origen nutricional y estudiar la migración en animales ya que los organismos que se mueven a lo largo de redes alimenticias tienen valores isotópicos distintivos y acarrean con ellos información sobre la localización de su previa alimentación (Hobson, 1999). Dada la diversidad de aplicaciones sobre el uso de isótopos estables en estudios dietéticos, es aparente que los estudios con isótopos llevarán a mayores avances sobre flujos de recursos a través de comunidades de animales y niveles tróficos, a través de productores primarios, y de consumidores primarios y secundarios que se alimentan de ellos.

Hidrógeno y oxígeno

La forma más abundante de intercambio entre H y O entre el ambiente y los organismos es el H_2O . En el ciclo hidrológico, el flujo que ocurre por evaporación de agua de los océanos y su retorno por precipitación ocupa el 90% del ciclo (Gat, 1996). Debido a los procesos de evaporación y precipitación, las composiciones isotópicas de los diferentes componentes del ciclo del agua muestran firmas isotópicas distintivas y detectables. En las fuentes de agua dulce del planeta se ha encontrado una correlación entre $\delta^2\text{H}$ (comúnmente llamado deuterio o δD) y $\delta^{18}\text{O}$ que se conoce como la línea de agua meteórica global (Gat, 1996). Ésta muestra una correlación lineal entre ambos isótopos y permite utilizarlos de manera intercambiable en estudios de dinámica de absorción del agua, de transferencia entre diferentes componentes del ecosistema, y para combinar estudios de abundancia na-

tural con enriquecimiento de alguno de los dos isótopos (Dawson *et al.*, 2002).

Las mediciones del contenido isotópico del agua del xilema ayudan a determinar cuál es la fuente de agua más utilizada por las plantas precisamente porque el contenido isotópico del agua de la planta es similar al de la fuente. Esto ocurre ya que no existe un fraccionamiento isotópico realizado por las raíces durante la absorción de agua, con la excepción de manglares (Sternberg y Swart, 1987), y porque no ocurre fraccionamiento durante el transporte de agua a través de los tejidos de la planta, excepto aquellos que transpiran, permitiendo que el contenido isotópico del agua del xilema de la planta sea similar al de la fuente (Ehleringer y Dawson, 1992). Por ejemplo, se encontró que en bosques de montaña en Costa Rica, las formas epífitas de *Didymopanax pittieri* utilizan predominantemente agua de nubes y agua del suelo del dosel, mientras que las formas hemiepífitas y formas ancladas en el suelo usaron predominantemente agua del suelo del bosque (Feild y Dawson, 1998).

En ecosistemas tropicales, el enriquecimiento evaporador ocurre debido a que la evaporación de agua del suelo durante la estación seca causa que el agua de las capas más superficiales del suelo se enriquezca en D y ^{18}O , con respecto a las capas más profundas del suelo (Goldstein *et al.*, 1996, 2002). De esta forma se puede obtener un perfil, por ejemplo, de $\delta^{18}\text{O}$ con relación a la profundidad de suelo, que permite comparar los valores de $\delta^{18}\text{O}$ del xilema de varias especies leñosas (Oliveira, 2004). La Figura 2 muestra que cuando el $\delta^{18}\text{O}$ del xilema de 27 especies de plantas de la Sabana Brasileña es comparado con el perfil vertical del suelo de $\delta^{18}\text{O}$, se puede estimar la profundidad de las raíces de varias especies. En este ejemplo, es aparente que especies brevedecíduas toman el agua de las capas más profundas, mientras que las gramíneas y herbáceas toman el agua de las capas superficiales. Sin embargo, existe una considerable variación entre diferentes formas de vida, demostrado cuando se excavan los diferentes sistemas de raíces para verificar los patrones observados con isótopos (Oliveira, 2004). En Panamá el enriquecimiento evaporador fue utilizado para mostrar que los árboles deciduos utilizan el agua de sitios superficiales del suelo mientras que los árboles perennifolios aparentemente toman el agua de profundidades mayores (Jackson *et al.*, 1995). Entre las especies perennifolias, los árboles con diámetros menores absorben el agua preferentemente de capas más profundas que los árboles con diámetros mayores (Meinzer *et al.*, 1999), y las lianas acceden al agua

de capas más profundas que los árboles, pero también son capaces de utilizar el agua de capas aún más profundas conforme la estación seca avanza (Andrade *et al.*, 2005). Sin embargo, el enriquecimiento evaporador en bosques húmedos de poca estacionalidad y en bosques con estaciones secas pronunciadas puede ser difícil de interpretar, en gran parte debido a la gran variabilidad isotópica existente en el perfil del suelo (Moreira *et al.*, 2000).

En casos donde es difícil interpretar los resultados utilizando abundancia natural de isótopos, se ha utilizado fuentes de agua isotópicamente enriquecida (usualmente en D) para rastrear el movimiento de agua. Por ejemplo, la redistribución hidráulica se demostró mediante el suministro de agua marcada con D en raíces de dos especies de árboles comunes y rastreando la marca isotópica en varias especies de árboles y arbustos vecinos (Moreira *et al.*, 2003). También, utilizando agua marcada con D en varios árboles pequeños en un bosque amazónico se pudieron encontrar raíces laterales de hasta 10m de extensión (Sternberg *et al.*, 2002). En dos ecosistemas del Amazonas oriental, los árboles absorbían el agua a profundidades mayores que las lianas, las cuales mostraban una mayor variación estacional en profundidad de absorción de agua, en contraste con pastizales en donde las plantas tomaban el agua solo de las capas superficiales (Moreira *et al.*, 2000).

Los estudios que utilizan isótopos de agua a nivel de ecosistemas han sido utilizados para entender el efecto de cambios ambientales regionales en el ciclo hidrológico. Por ejemplo, al usar los gráficos de Keeling para el $\delta^{18}\text{O}$ del vapor de agua se mostró que, en la región amazónica, el vapor de agua que viene de la transpiración es mucho mayor en una cubierta forestal que en un pastizal (Moreira *et al.*, 1997). También, se encontró que la precipitación muestra cambios en las abundancias de ^{18}O y D debido a la deforestación (Henderson-Sellers *et al.*, 2002) y que la composición isotópica de los ríos está afectada por las actividades humanas de la región (Martinelli *et al.*, 2004). Esta área de investigación tiene un alto potencial como puente para estudios entre el uso de agua por las plantas y los ciclos hidrológicos regionales y globales.

Las investigaciones con D y ^{18}O tienen un gran potencial para entender procesos bioquímicos y fisicoquímicos que ocurren durante la transpiración, la fijación de CO_2 y las reacciones bioquímicas durante la síntesis de celulosa en tejidos no fotosintéticos (DeNiro y Epstein, 1979; Cernusak *et al.*, 2003; Sternberg *et al.*, 2003). En particular, el $\delta^{18}\text{O}$ de la precipitación tiene una alta correlación con la

temperatura media anual y es claro que también debe haber una correlación entre los valores de $\delta^{18}\text{O}$ en la celulosa de los anillos de crecimiento de los árboles y la temperatura media anual de ciertas regiones (Burk y Stuiver, 1981). Estudios más finos han incorporado las diferentes señales isotópicas de ^{18}O del agua foliar y del agua del suelo en la celulosa del tallo de las plantas (Roden *et al.*, 2000; Sternberg *et al.*, 2003), lo que incrementa la precisión en las predicciones de climas pasados. Esta metodología incorporada en estudios de ecosistemas tropicales ayudaría a conocer la periodicidad de eventos climáticos, tales como las sequías o los huracanes, sobre todo en bosques estacionales.

En relación a los estudios de D y ^{18}O con animales en el trópico, es evidente el uso de isótopos de agua para rastrear el origen de animales en migración, por ejemplo en aves, usando la variación geográfica y de altitud en la composición isotópica de la lluvia (Chamberlain *et al.*, 1997; Hobson y Wassenaar, 1997; Hobson, 1999). Recientemente, un estudio en Ecuador con colibríes (Hobson *et al.*, 2003) indica que los valores δD de las plumas de estas aves están correlacionadas con la fuente de agua a diferentes altitudes, o los valores isotópicos proveniente de la lluvia a diferentes elevaciones en los Andes. Es evidente que los estudios con isótopos llevarán a mayores avances sobre el entendimiento de movimientos de animales migratorios.

Retos del Futuro

En esta revisión se discuten hallazgos recientes en la biología tropical obtenidos con el uso de isótopos estables. Los isótopos estables permiten responder preguntas en biología tropical que antes no era posible hacer debido a la carencia de métodos apropiados. Estudios interdisciplinarios, con colaboración entre ecofisiólogos y taxónomos, o entre ecólogos de comunidades y especialistas en ecosistemas, ampliarán el alcance a nuevas áreas de investigación mediante el uso de isótopos. Igualmente, las técnicas innovadoras de isótopos, como el análisis dual de isótopos que analizan $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$ en material vegetal, o $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en material animal, aumentarán el poder para rastrear recursos e integrar procesos a lo largo de escalas múltiples. Adicionalmente, el análisis y cuantificación de la variación isotópica en compuestos específicos (de plantas y animales) podría ayudar a unir el rumbo de moléculas específicas con su destino dentro de ciclos en ecosistemas tropicales. Finalmente, la aplicación de modelos basados en fraccionamientos iso-

tópicos ayudará a reducir la cantidad de posibles interpretaciones erróneas y revelar mecanismos básicos que aún estén sin conocer en muchos procesos ecológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a R. Oliveira, K. Tu, J.C. Cervera, J. Grana-dos, L. Cuevas y C. Medina por sugerencias y comentarios para mejorar esta revisión. Este trabajo es financiado por la Fundación Nacional para la Ciencia, EEUU (Beca N° 0310103) y el Fondo Sectorial CONACYT-CONAFOR, México (N° 9765).

REFERENCIAS

Andrade JL, Meinzer FC, Goldstein G, Schnitzer SA (2005) Water uptake and transport in lianas and co-occurring trees of a seasonally dry tropical forest. *Trees* 19: 282-289.

Bender MM (1971) Variations in the ^{13}C / ^{12}C ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry* 10: 1239-1244.

Boddey RM, Peoples MB, Palmer B, Dart PJ (2000) Use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 57: 235-270.

Bonal D, Sabatier D, Montpied P, Tremeaux D, Guehl JM (2000) Interspecific variability of $\delta^{13}\text{C}$ among trees in rainforests of French Guiana: functional groups and canopy integration. *Oecologia* 124: 454-468.

Broadmeadow MSJ, Griffiths H, Maxwell C, Borland AM (1992) The carbon isotope ratio of plant organic material reflects temporal and spatial variations in CO_2 within tropical forest formations in Trinidad. *Oecologia* 89: 435-441.

Buchmann N, Guehl JM, Barigah TS, Ehleringer JR (1997) Interseasonal comparison of CO_2 concentrations, isotopic composition, and carbon dynamics in an Amazonian rainforest (French Guiana). *Oecologia* 110: 120-131.

Burk RL, Stuiver M (1981) Oxygen isotope ratios in trees reflect mean annual temperature and humidity. *Science* 211: 1417-1419.

Cerling TE, Harris JM, Leakey MG (1999) Browsing and grazing in elephants: the isotope record of modern and fossil proboscideans. *Oecologia* 120: 364-374.

Cernusak LA, Arthur DJ, Pate JS, Farquhar GD (2003) Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiol.* 131: 1544-1554.

Chamberlain CP, Blum JD, Holmes RT, Feng XH, Sherry TW, Graves GR (1997) The use of isotope tracers for identifying populations of migratory birds. *Oecologia* 109: 132-141.

Crayn DM, Winter K, Smith JAC (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 3703-3708.

Dawson TE, Brooks PD (2001) Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. En Unkovich M, Pate J, McNeill A, Gibbs DJ (Eds.) *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of*

Ecosystems. Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 1-18.

Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annu. Rev. Ecol. Systemat.* 33: 507-559.

Delwiche CC, Steyn PL (1970) Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Env. Sci. Technol.* 4: 929-935.

DeNiro MJ, Epstein S (1979) Relationship between oxygen isotope ratios of terrestrial plant cellulose, carbon dioxide, and water. *Science* 204: 51-53.

DeNiro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45: 341-351.

Durka WE, Schultze DS, Gebauer G, Voerkelius S (1994) Effects of forest decline on uptake and leaching of deposited nitrate determined from ^{15}N and ^{18}O measurements. *Nature* 372: 765-767.

Ehleringer JR (1993) Carbon and water relations in desert plants: an isotopic perspective. En Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD (Eds.) *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations*. Academic Press. San Diego, CA, EEUU. pp. 155-172.

Ehleringer JR, Cooper TA (1988) Correlations between carbon isotope ratio and microhabitat in desert plants. *Oecologia* 76: 562-566.

Ehleringer JR, Dawson TE (1992) Water uptake by plants: perspectives from stable isotope composition. *Plant, Cell Env.* 15: 1073-1082.

Ehleringer JR, Rundel PW, Nagy KA (1986) Stable isotopes in physiological ecology and food web research. *Trends Ecol. Evol.* 1: 42-45.

Evans RD (2001) Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends Plant Sci.* 6: 121-126.

Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 317-345.

Farquhar GD, Richards RA (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 11: 539-552.

Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 121-137.

Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 503-537.

Feild TS, Dawson TE (1998) Water sources used by *Didymopanax pittieri* at different life stages in a tropical cloud forest. *Ecology* 79: 1448-1452.

Flanagan LB, Ehleringer JR (1998) Ecosystem-atmosphere CO_2 exchange: interpreting signals of change using stable isotope ratios. *Trends Ecol. Evol.* 13: 10-14.

Gat JR (1996) Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 24: 225-262.

Goldstein G, Meinzer FC, Sternberg LDSL, Jackson P, Cavelier J, Holbrook NM (1996) Evaluating aspects of water economy and photosynthetic performance with stable isotopes from water and organic matter. En Mulkey SS, Chazdon RL, Smith AP (Eds.) *Tropical Forest Plant Ecophysiology*. Chapman & Hall. New Cork, EEUU. pp. 244-267.

Goldstein G, Meinzer FC, Andrade JL (2002) El flujo de agua en los árboles del dosel:

mecanismos y patrones. En Guariguata MR, Kattan GH (Eds.) *Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales*. Libro Universitario Regional. Cartago. Costa Rica. pp. 251-270.

Guehl JM, Domenach AM, Bereau M, Barigah TS, Casabianca H, Ferhi A, Garbaye J (1998) Functional diversity in an Amazonian rain forest of French Guyana a dual isotope approach ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$). *Oecologia* 116: 316-330.

Handley LL, Scrimgeour CM (1997) Terrestrial plant ecology and ^{15}N natural abundance: The present limits to interpretation for uncultivated systems with original data from a Scottish old field. *Adv. Ecol. Res.* 27: 133-212.

Handley LL, Odee D, Scrimgeour CM (1994) $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ patterns in savanna vegetation: dependence on water availability and disturbance. *Funct. Ecol.* 8: 306-314.

Henderson-Sellers A, McGuffie K, Zhang H (2002) Stable isotopes as validation tools for global climate model predictions of the impact of Amazonian deforestation. *J. Climate* 15: 2664-2677.

Herrera LG, Gutierrez E, Hobson KA, Altube B, Díaz WG, Sánchez-Cordero V (2002) Sources of assimilated protein in five species of New World frugivorous bats. *Oecologia* 133: 280-287.

Herrera LG, Hobson KA, Rodríguez M, Hernández P (2003) Trophic partitioning in tropical rain forest birds: insights from stable isotope analysis. *Oecologia* 136: 439-444.

Hietz P, Wanek W, Wania R, Nadkarni NM (2002) Nitrogen-15 natural abundance in a montane cloud forest canopy as an indicator of nitrogen cycling and epiphyte nutrition. *Oecologia* 131: 350-355.

Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314-326.

Hobson KA, Wassenaar LI (1997) Linking brooding and wintering grounds of neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. *Oecologia* 109: 142-148.

Hobson KA, Wassenaar LI, Milá B, Lovette I, Dingle C, Smith TB (2003) Stable isotopes as indicators of altitudinal distributions and movements in an Ecuadorian hummingbird community. *Oecologia* 136: 302-308.

Högberg P (1986) Nitrogen-fixation and nutrient relations in savanna woodland trees (Tanzania). *J. Appl. Ecol.* 23: 675-688.

Högberg P (1997) ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytol.* 137: 179-203.

Huc R, Ferhi A, Guehl JM (1994) Pioneer and late stage tropical rainforest tree species (French Guiana) growing under common conditions differ in leaf gas exchange regulation, carbon isotope discrimination and leaf water potential. *Oecologia* 99: 297-305.

Jackson PC, Cavelier J, Goldstein G, Meinzer FC, Holbrook NM (1995) Partitioning of water resources among plants of a lowland tropical forest. *Oecologia* 101: 197-203.

Kapos V, Ganade G, Matsui E, Victoria RL (1993) $\delta^{13}\text{C}$ as an indicator of edge effects in tropical rainforest reserves. *J. Ecol.* 81: 425-432.

Keeley JE, Rundel PW (2003) Evolution of CAM and C_4 carbon-concentrating mechanisms. *Int. J. Plant Sci.* 164: S55-S77.

Keeling CD (1958) The concentration and isotopic abundance of atmospheric carbon dioxide in rural areas. *Geochim. Cosmochim. Acta* 13: 322-334.

- Koch PL, Heisinger J, Moss C, Carlson RW, Fogel ML, Behrensmeyer AK (1995) Isotopic tracking of change in diet and habitat use in African elephants. *Science* 267: 1340-1343.
- Kolb KJ, Evans RD (2002) Implications of leaf nitrogen recycling on the nitrogen isotope composition of deciduous plant tissues. *New Phytol.* 156: 157-164.
- Koponen P, Nygren P, Domenach AM, Le Roux C, Saur E, Roggy JC (2003) Nodulation and dinitrogen fixation of legume trees in a tropical freshwater swamp forest in French Guiana. *J. Trop. Ecol.* 19: 655-666.
- Martinelli LA, Gat JR, DeCamargo PB, Lara LL, Ometto JPHB (2004) The Piracicaba River basin: Isotope hydrology of a tropical river basin under anthropogenic stress. *Isot. Env. Health Stud.* 40: 45-56.
- Medina E, Minchin P (1980) Stratification of $\delta^{13}\text{C}$ values of leaves in Amazonian rain forests. *Oecologia* 45: 377-378.
- Medina E, Sternberg LdSL, Cuevas E (1991) Vertical stratification of $\delta^{13}\text{C}$ values in closed natural and plantation forests in the Luquillo mountains, Puerto Rico. *Oecologia* 87: 369-372.
- Meinzer FC, Rundel PW, Goldstein G, Sharifi MR (1992) Carbon isotope composition in relation to leaf gas exchange and environmental conditions in Hawaiian *Metrosideros polymorpha* populations. *Oecologia* 91: 305-311.
- Meinzer FC, Andrade JL, Goldstein G, Holbrook NM, Cavelier J, Wright SJ (1999) Partitioning of soil water among canopy trees in a seasonally dry tropical forest. *Oecologia* 121: 293-301.
- Miranda AC, Miranda HS, Lloyd J, Grace J, Francey RJ, McIntyre JA, Meir P, Riggan P, Lockwood R, Brass J (1997) Fluxes of carbon, water and energy over Brazilian cerrado: an analysis using eddy covariance and stable isotopes. *Plant Cell Env.* 20: 315-328.
- Mooney HA, Bullock SH, Ehleringer JR (1989) Carbon isotope ratios of plants of a tropical dry forest in Mexico. *Funct. Ecol.* 3: 137-142.
- Moreira MZ, Sternberg LdSL, Nepstad D (2000) Vertical patterns of soil water uptake by plants in a primary forest and an abandoned pasture in the eastern Amazon: an isotopic approach. *Plant Soil* 222: 95-107.
- Moreira MZ, Sternberg LdSL, Martinelli LA, Victoria RL, Barbosa EM, Bonates LCM, Nepstad DC (1997) Contribution of transpiration to forest ambient vapor based on isotopic measurements. *Global Change Biol.* 3: 439-450.
- Moreira MZ, Scholz FG, Bucci SJ, Sternberg LdSL, Goldstein G, Meinzer FC, Franco AC (2003) Hydraulic lift in a neotropical savanna. *Funct. Ecol.* 17: 573-581.
- Oliveira RS (2004) Comparative water use and water acquisition strategies of trees from the Brazilian Cerrado and Amazonia. Ph.D. Dissertation, University of California, Berkeley, CA, EEUU.
- Ometto JPHB, Flanagan LB, Martinelli LA, Moreira MZ, Higuichi N, Ehleringer JR (2002) Carbon isotope discrimination in forest and pasture ecosystems of the Amazon Basin, Brazil. *Global Biogeochem. Cycles* 16: 1109.
- Osmond CB (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 379-414.
- Pate JS, Stewart GR, Unkovich M (1993) ^{15}N natural abundance of plant and soil components of a *Banksia* woodland ecosystem in relation to nitrate utilization, life form, mycorrhizal status and N_2 -fixing abilities of component species. *Plant Cell Env.* 16: 365-373.
- Pendall E, Schwendenmann L, Potvin C (2003) Land-use change effects on fluxes and isotopic composition of CO_2 and CH_4 in Panama, and possible insights into the atmospheric H_2 cycle. *Eos Trans. AGU, Fall Meet. Suppl.*, Abstract 84: B41A-07.
- Pierce S, Winter K, Griffiths H (2002) Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. *New Phytol.* 156: 75-83.
- Poorter H, Farquhar GD (1994) Transpiration, intercellular carbon dioxide concentration and carbon-isotope discrimination of 24 wild species differing in relative growth rate. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 507-516.
- Quay P, King S, Wilbur D, Wofsy S, Richey J (1989) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of atmospheric CO_2 in the Amazon basin: forest and river sources. *J. Geophys. Res.* 94: 18327-18336.
- Reich A, Ewel JJ, Nadkarni NM, Dawson TE, Evans RD (2003) Nitrogen isotope ratios shift with plant size in tropical bromeliads. *Oecologia* 137: 587-590.
- Robinson D (2001) $\delta^{15}\text{N}$ as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends Ecol. Evol.* 16: 153-162.
- Robinson D, Handley LL, Scrimgeour CM (1998) A theory for $^{13}\text{N}/^{14}\text{N}$ fractionation in nitrate-grown vascular plants. *Planta* 205: 397-406.
- Roden JS, Lin G, Ehleringer JR (2000) A mechanistic model for interpretation of hydrogen and oxygen isotope ratios in tree-ring cellulose. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64: 21-35.
- Roggy JC, Prévost MF, Garbaye J, Domenach AM (1999) Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using $\delta^{15}\text{N}$. *J. Trop. Ecol.* 15: 1-22.
- Sagers CL, Ginger SM, Evans RD (2000) Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia* 123: 582-586.
- Santiago LS, Kitajima K, Wright SJ, Mulkey SS (2004) Coordinated changes in photosynthesis, water relations and leaf nutritional traits of canopy trees along a precipitation gradient in lowland tropical forest. *Oecologia* 139: 495-502.
- Schell DM, Barnett BA, Vinette KA (1998) Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162: 11-23.
- Schulze ED, Gebauer G, Ziegler H, Lange OL (1991) Estimation of nitrogen fixation by trees on an aridity gradient in Namibia. *Oecologia* 88: 451-455.
- Schulze ED, Williams RJ, Farquhar GD, Schulze W, Langridge J, Miller JM, Walker BH (1998) Carbon and nitrogen isotope discrimination and nitrogen nutrition of trees along a rainfall gradient in northern Australia. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 413-425.
- Shearer G, Kohl DH (1986) N_2 -fixation in field settings: estimations based on natural ^{15}N abundance. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 699-756.
- Shearer G, Kohl DH (1993) Natural abundance of ^{15}N : fractional contribution of two sources to a common sink and use of isotope discrimination. En Knowles R, Blackburn TH (Eds.) *Nitrogen isotope techniques*. Academic Press. San Diego, CA, EEUU. pp. 89-125.
- Shearer G, Kohl DH, Chien SH (1978) The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 899-902.
- Silvera K, Santiago LS, Schuur EAG, Williams NH, Whitten WM, Winter K (2003) Abstract, 88th Annual Meeting of Ecological Society of America, Savannah, Georgia, USA.
- Silvera K, Santiago LS, Winter K (2005) Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. *Funct. Plant Biol.* 32: 397-407.
- Sternberg LdSL, Swart PK (1987) Utilization of freshwater and ocean water by coastal plants of southern Florida. *Ecology* 68: 1898-1905.
- Sternberg LdSL, Mulkey SS, Wright SJ (1989) Ecological interpretation of leaf carbon isotope ratios: influence of respired carbon dioxide. *Ecology* 70: 1317-1324.
- Sternberg LdSL, Moreira MZ, Nepstad D (2002) Uptake of water by lateral roots of small trees in an Amazonian tropical forest. *Plant Soil* 238: 151-158.
- Sternberg LdSL, Anderson WT, Morrison K (2003) Separating soil and leaf water ^{18}O isotopic signals in plant stem cellulose. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67: 2561-2566.
- Treseder KK, Davidson DW, Ehleringer JR (1995) Absorption of ant-provided carbon dioxide and nitrogen by a tropical epiphyte. *Nature* 375: 137-139.
- Tu KP, Dawson TE (2005) Partitioning ecosystem respiration using stable carbon isotope analyses of CO_2 . En Flanagan LB, Ehleringer JR, Pataki DE (Eds.) *Stable Isotopes and Biosphere-Atmosphere Interactions: Processes and Biological Controls*. Elsevier. San Diego, CA, EEUU. pp. 125-153.
- Valles-Mora B, Cadisch G, Aluja-Schunemann A (2003) Comparación de metodologías de isótopos para evaluar fijación de N atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia* 37: 117-128.
- Vitousek PM, Field CB, Matson PA (1990) Variation in foliar $\delta^{13}\text{C}$ in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: A case of internal resistance? *Oecologia* 84: 362-370.
- Wanek W, Arndt SK, Huber W, Popp M (2002) Nitrogen nutrition during ontogeny of hemiepiphytic *Clusia* species. *Funct. Plant Biol.* 29: 733-740.
- Wania R, Hietz P, Wanek W (2002) Natural ^{15}N abundance of epiphytes depends on the position within the forest canopy: source signals and isotope fractionation. *Plant Cell Env.* 25: 581-589.
- Werner RA, Brand WA (2001) Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 15: 501-519.
- Winter K, Holtum JAM (2002) How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO_2 fixed during day and night. *Plant Physiol.* 129: 1843-1851.
- Winter K, Lüttge U, Winter E, Troughton JH (1978) Seasonal shift from C3 photosynthesis to crassulacean acid metabolism in Mesembryanthemum crystallinum growing in its natural environment. *Oecologia* 34: 225-237.
- Yakir D, Sternberg LdSL (2000) The use of stable isotopes to study ecosystem gas exchange. *Oecologia* 123: 297-311.