

Sezione Speciale: Atti 5° Congresso SISEF: Foreste e Società - Cambiamenti, Conflitti, Sinergie
(a cura di: E. Lingua, R. Marzano, G. Minotta, R. Motta, A. Nosenzo, G. Bovio)

Isotopi del carbonio e dell'ossigeno: un utile strumento per analizzare i flussi di CO₂ e H₂O tra le piante e l'atmosfera

Ripullone F* ⁽¹⁾, Borghetti M ⁽¹⁾, Cernusak L ⁽²⁾, Matsuo N ⁽³⁾, Farquhar G ⁽⁴⁾

(1) Dipartimento di Scienze dei Sistemi Colturali, Forestali e dell'Ambiente, Università della Basilicata, Potenza, Italy; (2) Smithsonian Tropical Research Institute, Panama city, Panama; (3) Division of Environmental Science and Technology, Kyoto University, Japan; (4) Research School of Biological Sciences, ANU, Canberra, Australia. - *Corresponding author: Francesco Ripullone - ripullone@unibas.it

Abstract: Carbon and oxygen isotopes: a useful tool for the analysis of carbon and water exchanges between plants and the atmosphere. Recent studies suggest that isotope fractionation occurring in plants during photosynthesis influence the $\delta^{18}\text{O}$ signal in atmospheric CO₂, providing useful information on the global carbon cycle. The estimate of $\delta^{18}\text{O}$ depends from the accuracy of existing models used. Complications arise due to uncertainties associated with: i) leaf water heterogeneity; ii) calculation of the CO₂ concentrations at the site of CO₂-H₂O equilibrium; iii) rate of catalytic activity of enzyme carbonic anhydrase (CA). This research aimed to investigate the applicability of two models (Péclet & Craig-Gordon) to predict the $\delta^{18}\text{O}$ in leaf water and the extent to which the evaporative enrichment of $\delta^{18}\text{O}$ in leaf water is reflected in the oxygen isotope ratio of CO₂ passing over the leaf. The experiment was carried out on cotton plants grown from seeds in a temperature and humidity controlled glasshouse. Environmental conditions (vapor pressure deficit, leaf temperature, light intensity and oxygen composition) were altered to induce large variation in photosynthetic activity and evaporative conditions and therefore different values of Δ_c ($\Delta^{18}\text{O}$ of chloroplast CO₂) and Δ_e ($\Delta^{18}\text{O}$ of H₂O at the evaporating site) respectively. The results indicate that Péclet model can predict total leaf water enrichment more accurately than the Craig-Gordon model. We obtained the reasonable L value, an important parameter in the Péclet model, compared to those of the previous reports when we removed the unenriched vein water. The L was not influenced by the change in the environmental conditions. The results showed that Δ_c was highly significantly correlated with Δ_e . The proportional oxygen isotope equilibrium between CO₂ and chloroplast water was calculated to be very near unity at leaf temperatures of 29°C, and approximately 0.8 at leaf temperatures of 20°C. This large discrepancy confirmed that leaf temperature has a large impact on CA activity and as a consequence on the equilibrium of CO₂ with water inside the leaf. Such differences should be taken into consideration in carbon balance model at the ecosystem level.

Keywords: Carbon and oxygen isotope discrimination, Gas exchange, Isotope equilibrium, Leaf water enrichment models.

Received: Feb 09, 2006 - Accepted: May 10, 2006

Citation: Ripullone F, Borghetti M, Cernusak L, Matsuo N, Farquhar G, 2006. Isotopi del carbonio e dell'ossigeno: un utile strumento per analizzare i flussi di CO₂ e H₂O tra le piante e l'atmosfera. Forest@ 3 (2): 205-212. [online] URL: <http://www.sisef.it/>

Introduzione

Gli equilibri tra la quantità di carbonio presente nell'atmosfera, e quella immagazzinata nella biosfera e nei combustibili fossili potrebbero essere profonda-

mente alterati a causa dell'aumento progressivo del rilascio di carbonio da questi ultimi nell'atmosfera (IPCC 1996). L'accumulo di CO₂ nell'atmosfera sarebbe anche più veloce se oceani ed ecosistemi terre-

stri non assorbissero una parte di quella emessa (Tans et al. 1990, Francey et al. 1995). Quantificare la CO₂ assorbita da questi "sinks" potrebbe fornire utili informazioni sul ciclo del carbonio. Recenti studi suggeriscono che le piante terrestri, potrebbero fornire questa opportunità grazie al potere che hanno di alterare profondamente il segnale isotopico della CO₂ atmosferica, in particolare del δ¹⁸O (Tans et al. 1993, Farquhar et al. 1993, Yakir & Wang 1996, Ciais et al. 1997, Cernusak et al. 2004). Durante la fotosintesi, la CO₂ che entra nella foglia, subisce principalmente due processi: i) discriminazione in modo sistematico contro la CO₂ contenente l'isotopo dell'ossigeno più pesante (C¹⁸O¹⁶O) rispetto a quello più leggero (C¹⁶O₂), in modo che la CO₂ atmosferica risulta più arricchita in δ¹⁸O (Flanagan & Ehleringer 1998); ii) scambio parziale o totale di atomi di ossigeno, guidata dall'enzima "Carbonic Anhydrase" (CA), con l'H₂O dei cloroplasti. Tale acqua risulta evaporativamente arricchita in δ¹⁸O in confronto a quella del suolo, in quanto le molecole isotopicamente più pesanti (H₂¹⁸O) si diffondono più lentamente rispetto a quelle più leggere (H₂¹⁶O). Pertanto, la CO₂ nei cloroplasti, arricchita in δ¹⁸O dopo lo scambio con l'acqua, in parte è assimilata durante la fotosintesi e in parte (circa i 2/3) ritorna nell'atmosfera arricchendola ulteriormente in δ¹⁸O (Gillon & Yakir 2000a). La stima del δ¹⁸O atmosferico fatta con i modelli esistenti comporta una serie di incertezze: i) eterogeneità isotopica dell'acqua fogliare; ii) il calcolo della concentrazione di CO₂ al sito di equilibrio tra CO₂ e H₂O; iii) il tasso dell'attività catalitica dell'enzima CA. Tradizionalmente, l'acqua fogliare è sempre stata considerata isotopicamente omogenea. In passato, i primi ad aver formulato un'equazione per la stima dell'arricchimento isotopico dell'acqua fogliare sono stati Craig & Gordon (1965). Recenti studi hanno invece dimostrato che l'acqua fogliare non è isotopicamente omogenea, dovuto all'effetto evaporativo che mescola il δ¹⁸O tra l'H₂¹⁸O più arricchita al sito di evaporazione e l'H₂¹⁸O più impoverita proveniente dal suolo (Yakir 1992a). Successivamente, Farquhar & Lloyd (1993) hanno proposto un nuovo modello che tiene conto di queste differenze. Secondo tali autori, nella foglia si formerebbe un gradiente, dovuto alla diffusione di acqua più arricchita dal sito di evaporazione, opposto alla convezione di acqua impoverita proveniente dalla nervatura fogliare. In condizioni dove c'è una rapida evaporazione, il mescolamento delle due acque con differente arricchimento può essere lento, e come risultato l'acqua estratta da foglie traspiranti è meno arricchita di quanto stimato

dall'equazione di Craig-Gordon.

L'accuratezza della stima del δ¹⁸O atmosferico dipende anche dal calcolo della concentrazione di CO₂ (c_c) al sito dove avviene lo scambio degli atomi di ossigeno con l'arricchita acqua dei cloroplasti. La CO₂ nella fase di diffusione all'interno della foglia dagli spazi intercellulari (c_i) ai cloroplasti (c_c) subisce un'ulteriore discriminazione riducendo ulteriormente la sua concentrazione (5-30%).

Altro motivo di incertezza nel calcolo del δ¹⁸O atmosferico è dato dalla stima della reazione di equilibrio (θ) nello scambio dell'isotopo dell'ossigeno tra CO₂ ed H₂O, catalizzata dall'enzima CA. In genere i modelli stimano che lo scambio sia quasi completo (circa 95% - Flanagan et al. 1994, Williams et al. 1996). Tale stima è stata sempre supportata dal fatto che l'enzima CA è presente in tutte le piante e che rapidamente catalizza la reazione di equilibrio, indipendentemente dal breve periodo (frazioni di secondo) di residenza della CO₂ nelle foglie. Secondo studi recenti invece è stato dimostrato che la velocità di tale reazione dipende da diversi fattori (temperatura, specie etc. - Gillon & Yakir 2001). È stato dimostrato, ad esempio, che le piante C₄ hanno una più ridotta attività dell'enzima CA rispetto alle piante C₃. Inoltre, riduzioni di temperatura di qualche grado possono incidere sull'attività della CA abbassando la percentuale di scambio tra CO₂/H₂O anche del 10-20%.

L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di investigare i fattori che controllano il frazionamento isotopico del carbonio e dell'ossigeno durante l'attività fotosintetica in modo da poter interpretare il segnale del δ¹⁸O della CO₂ atmosferica a scala ecosistemica. In particolare, lavorando su una larga variabilità di condizioni ambientali (luce, temperatura fogliare, deficit della pressione di vapore e percentuale di ossigeno), sono stati testati: i) l'applicabilità di due modelli per la stima dell'arricchimento isotopico dell'acqua fogliare (Péclet & Craig-Gordon) e ii) il grado con il quale l'arricchimento evaporativo dell'isotopo dell'ossigeno nell'acqua fogliare si riflette in quello della CO₂ atmosferica.

Materiali e metodi

Condizioni sperimentali

L'esperimento è stato condotto su piantine di cotone (*Gossypium hirsutum*) allevate in serra con controllo di temperatura e umidità (27 ± 2 °C e 40 ± 10% rispettivamente - Australian National University, Canberra, Australia). Le piantine cresciute da seme ed al-

levate in vaso per 6-8 settimane, sono state irrigate quotidianamente a capacità di campo e fertilizzate con Scotts Osmocote Plus (Sierra Horticultural Products, Heerlen, The Netherlands).

Misura degli scambi gassosi

Al fine di permettere alle piante di acclimatarsi, esse venivano trasferite la sera prima dell'esperimento dalla serra al laboratorio. Le misure di scambi gassosi di CO₂ ed H₂O sono state effettuate su foglie ben sviluppate, racchiuse per intero in una *cuvette*, mediante un *Infrared Gas Analyzers* (model LI-6251, Licor, Lincoln, NE). Il sistema di scambi gassosi utilizzato è stato precedentemente descritto da Boyer et al. (1997) e Cernusak et al. (2003). I parametri gassosi (conduttanza stomatica (g_s), tasso fotosintetico (A) e traspirazione fogliare (E) sono stati calcolati come descritto da Caemmerer & Farquhar (1981).

Durante l'esperimento, le condizioni ambientali sono state alterate per indurre un'ampia variazione dell'assimilazione fotosintetica (c_c/c_a = rapporto della concentrazione di CO₂ nei cloroplasti e nell'ambiente) e del tasso di traspirazione (e_a/e_i = rapporto della pressione parziale del vapor d'acqua in aria e all'interno della foglia) e, come conseguenza, di Δ_e ($\Delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ai siti di evaporazione) e Δ_c ($\Delta^{18}\text{O}$ della CO₂ nei cloroplasti), rispettivamente.

Le misure sono state effettuate a tre differenti concentrazioni di ossigeno dell'aria (2%, 21% e 40%). Per ciascun livello di ossigeno sono stati fatti variare: il deficit della pressione di vapore (VPD), in modo da ottenerne 8 differenti valori (da 8 a 28 mbar), l'intensità della luce (1200, 500 e 100 mol m⁻² s⁻¹) e la temperatura (29° C e 20°C). Al contrario, la concentrazione di CO₂ dell'aria (370-380 ppm) è stata mantenuta costante per tutto l'esperimento. Prima delle misure, la foglia veniva lasciata acclimatare nella *cuvette* per almeno 1.5-2 ore. Dopo aver raggiunto le condizioni di stabilità, la CO₂ in uscita dalla *cuvette*, isotopicamente modificata, per via del processo fotosintetico, rispetto alla CO₂ dell'aria in ingresso, è stata fatta passare in successione su trappole di alcool/ghiaccio secco e su trappole di N liquido come descritto precedentemente da Caemmerer & Evans (1991), per le successive analisi isotopiche. I campioni di CO₂ dell'aria in ingresso sono stati anch'essi intrappolati per le analisi. Stesso destino ha anche subito l'H₂O in uscita dalla camera. Alla fine di ciascuna misura di scambi gassosi, si procedeva all'estrazione dell'acqua fogliare con una procedura di distillazione sottovuoto a 60 °C, come descritto da Gan et al. (2002).

Analisi isotopiche

La composizione di isotopi stabili di carbonio e ossigeno della CO₂ in ingresso e uscita dalla camera sono state determinate con uno spettrometro di massa *Isoprime* (Micromass, Manchester, UK) operante in *dual inlet mode*. Misure ripetute sullo stesso campione hanno mostrato una precisione dello 0.1‰ (n = 10). La composizione isotopica dell'ossigeno è stata espressa in riferimento alla VSMOW (*Vienna Standard Mean Ocean Water* - rapporto ¹⁸O/¹⁶O di 2.0052 × 10⁻³). La composizione isotopica dell'ossigeno nei campioni di acqua (estratta dalle foglie, di irrigazione e quella intrappolata in uscita dalla camera durante gli scambi gassosi) sono stati determinati con uno spettrometro di massa *Isoprime* (Micromass, Manchester, UK) operante in *continuous flow mode* (Farquhar et al. 1997). I campioni di acqua sono stati pirrolizzati a 1300 °C prima di entrare nello spettrometro. La precisione delle analisi, sulla base di misure ripetute sullo stesso campione, è risultata dello 0.3‰ (n=10).

Equazioni isotopiche

Di seguito vengono riportate le equazioni utilizzate nella presente ricerca per la stima del frazionamento isotopico avvenuto durante l'attività di fotosintesi. La stima dell'arricchimento isotopico dell'acqua fogliare al sito di evaporazione (Δ_e) è stato ottenuto utilizzando l'equazione di Craig & Gordon (1965), successivamente modificata da Farquhar & Lloyd (1993):

$$\Delta_e \simeq \epsilon_k + \epsilon^+ + (\Delta_v - \epsilon_k) \cdot \frac{e_a}{e_i} \quad (eq. 1)$$

dove Δ_v è la composizione isotopica dell'acqua fogliare comparata con l'acqua di origine radicale, ϵ_k è il frazionamento isotopico che avviene durante la diffusione dagli spazi aerei intercellulari della foglia all'atmosfera, ϵ^+ è l'equilibrio di frazionamento dal liquido al vapore all'interfaccia aria-acqua, ed e_a/e_i è il rapporto tra la pressione di vapore ambiente ed intercellulare (Cernusak et al. 2003). L'equazione proposta da Farquhar & Lloyd (1993) è stata usata per predire l'arricchimento isotopico sull'intera acqua fogliare (Δ_L):

$$\Delta_L = \frac{\Delta_E \cdot (1 - e^{-Pe})}{Pe} \quad (eq. 2)$$

dove Pe è il numero di Péclet (EL/CD).

Il calcolo della concentrazione di CO₂ (c_c) al sito dove avviene lo scambio degli atomi di ossigeno con

l'arricchita acqua dei cloroplasti è stata ottenuta dalle misurazioni di discriminazione del ^{13}C , usando il metodo di Evans et al. (1986). I valori ottenuti dalle misurazioni della composizione isotopica della CO_2 in uscita dalla cuvette (Δ_{obs}) sono stati comparati con quelli di Δ_i , calcolati con l'equazione semplificata proposta da Farquhar & Richards (1984):

$$\Delta_i - \Delta_{\text{obs}} = \frac{(b - a_w)}{g_i} \cdot \left(\frac{A}{C_a} \right) \quad (\text{eq. 3})$$

dove Δ_i è la discriminazione modellata, Δ_{obs} è la discriminazione osservata, b è il frazionamento durante la carbossilazione, a_w è il frazionamento combinato durante la dissoluzione e diffusione attraverso la fase liquida, g_i è la conduttanza della CO_2 dagli spazi intercellulari ai cloroplasti, A è il tasso di assimilazione di CO_2 e c_a è la concentrazione di CO_2 atmosferica. Plottando la deviazione di Δ_{obs} e Δ_i , dal rapporto A/c_a si ottiene che la curva di questa relazione è proporzionale alla resistenza al trasferimento e l'intercetta è una misura del frazionamento associato alla respirazione e fotospirazione.

La concentrazione di CO_2 nei cloroplasti (c_c) è stata calcolata come $c_c = c_i - A/g_i$, mentre la composizione isotopica dell'ossigeno nella CO_2 dei cloroplasti (Δ_{ca}) è stata calcolata riarrangiando l'equazione della discriminazione del C^{18}O presentata da Farquhar & Lloyd (1993):

$$\Delta_{\text{ca}} = \frac{\Delta_A - \bar{a}}{(1 + \Delta_A) \cdot \left(\frac{c_c}{c_a - c_c} \right)} \quad (\text{eq. 4})$$

dove Δ_A è la discriminazione contro C^{18}O durante la fotosintesi, \bar{a} è la discriminazione media ponderata contro C^{18}O per la diffusione dai cloroplasti all'atmosfera. L'equazione 4 è risolta per Δ_{ca} e δ_c ($\delta^{18}\text{O}$ della CO_2 nei cloroplasti) è stata stimata nel modo seguente: $\delta_c = \Delta_{\text{ca}} (1 + \delta_a) + \delta_a$, dove δ_a è il $\delta^{18}\text{O}$ della CO_2 nell'atmosfera.

La stima della reazione di equilibrio (θ) nello scambio dell'isotopo dell'ossigeno tra CO_2 ed H_2O , catalizzata dall'enzima CA, è stata calcolata per ciascun punto dalle misurazioni di fotosintesi (Gillon & Yakir 2000b):

$$\theta = \frac{\Delta_{\text{ca}} - a \cdot (1 - c_c/c_a)}{\Delta_{\text{ca}} + \bar{a} \cdot (1 - c_c/c_a)} \quad (\text{eq. 5})$$

dove Δ_{ca} è il valore atteso Δ_{ca} se la CO_2 dei cloroplasti avesse scambiato completamente l'ossigeno con

l'acqua al sito di evaporazione (δ_e). Il Δ_{ea} è stato calcolato come:

$$\Delta_{\text{ea}} = \frac{\delta_e \cdot (1 + \delta_w) + \delta_w - \delta_w}{1 + \delta_a} \quad (\text{eq. 6})$$

Risultati e discussione

La stima del bilancio in $\delta^{18}\text{O}$ della CO_2 atmosferica dipende essenzialmente dai modelli teorici o empirici utilizzati per il calcolo di: i) composizione isotopica dell'acqua fogliare ii) concentrazione della CO_2 al sito di scambio $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ e iii) grado dell'equilibrio tra $\text{CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ (Gillon & Yakir 2000b). La presente ricerca ha permesso di stimare tali fattori per una larga variabilità di condizioni ambientali (luce, temperatura fogliare, deficit della pressione di vapore e percentuale di ossigeno).

Plottando i valori misurati del $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua fogliare totale (Δ_{L}) e quelli stimati dai modelli Péclet (Δ_{L}) e Craig & Gordon (Δ_{c}), i risultati mostrano che nonostante sia stata ottenuta una forte correlazione, entrambe i modelli tendono a sovrastimare leggermente il Δ_{L} misurato (Fig. 1, pannelli a-b). Questa discrepanza è principalmente dovuta alla eterogeneità isotopica dell'acqua nelle foglie traspiranti: miscuglio tra l'acqua, meno arricchita in $\delta^{18}\text{O}$, nelle nervature fogliari e quella più arricchita al sito di evaporazione. Ad ogni modo, il modello Péclet mostra di essere in grado di predire più accuratamente del modello Craig e Gordon l'eterogeneità spaziale dell'acqua fogliare.

I nostri risultati hanno evidenziato che una migliore correlazione può essere ottenuta quando si esclude il contributo dell'acqua delle nervature fogliari (Fig. 1, pannelli c-d). Il Δ_{L} misurato è stato così ricalcolato attraverso il metodo del bilancio di massa (Roden & Ehleringer 1999, Cernusak et al. 2003), utilizzando un fattore di correzione ($12.9\% \pm 0.46$, media \pm errore standard, $n = 16$), ottenuto separando il contributo dell'acqua nelle nervature rispetto a quello totale fogliare. Alcuni autori hanno stimato che la frazione di volume incluso nelle nervature fogliari può variare dal 10 al 30% del totale (Leaney et al. 1985, Flanagan et al. 1991b). I valori massimi sono ottenuti in specie con presenza di una fitta rete di nervature primarie e secondarie. In tal caso, i valori predetti dai modelli possono discostarsi notevolmente dal valore di Δ_{L} misurato, generando errori anche del 20-30% sui calcoli di $\delta^{18}\text{O}$ a livello ecosistemico. L'errore potrebbe essere maggiore, se si considera che i due modelli assumono anche che le foglie i) siano in condizioni di equilibrio e omogeneità isotopica; ii) abbia-

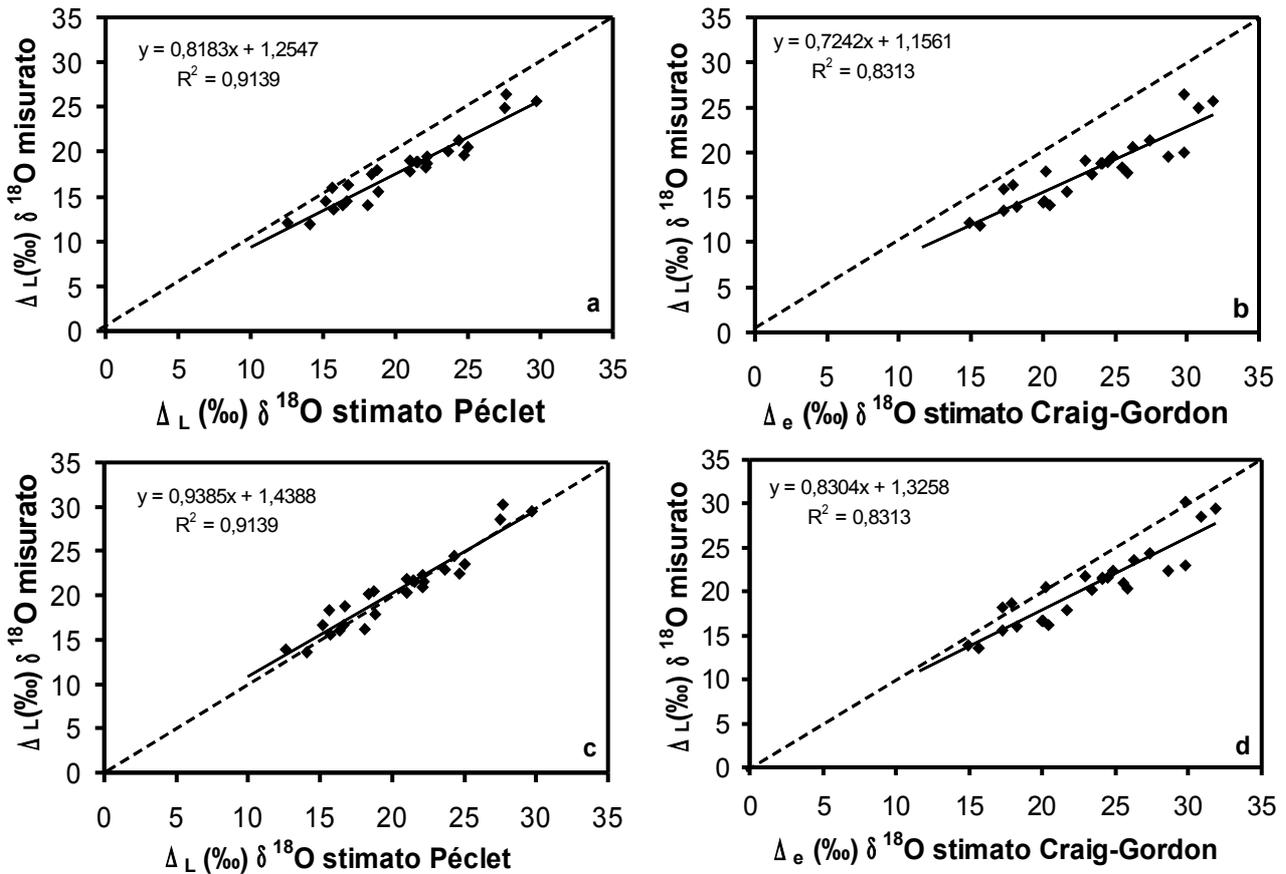


Fig. 1 - Confronto tra i valori di $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua fogliare totale osservati e i valori calcolati con i modelli di Péclet (Δ_L , $\delta^{18}\text{O}$ in acqua fogliare totale) and Craig-Gordon (Δ_e , $\delta^{18}\text{O}$ al sito di evaporazione) in piantine di cotone durante la fotosintesi in condizioni ambientali differenti (temperatura fogliare, deficit della pressione di vapore, intensità della luce e composizione dell'ossigeno). La linea tratteggiata nel grafico rappresenta la relazione 1:1. I valori di $\delta^{18}\text{O}$ sono espressi rispetto a VSMOW (vedi testo).

no un volume di acqua costante (Yakir 1998). L'assunzione dell'equilibrio è spesso violata, poiché nei sistemi naturali si assiste spesso a variazioni dei parametri ambientali (Hardwood et al. 1998). Pertanto, fondamentale ai fini dell'utilizzazione di questi modelli è la stima del tempo necessario per raggiungere l'equilibrio, che studi passati stimano in 1-5 ore (Flanagan et al. 1991b, Yakir et al. 1993); in genere, le condizioni di equilibrio vengono raggiunte più rapidamente nel caso di foglie a lamina sottile e in situazioni dove non si hanno forti variazioni dei parametri ambientali. Ad ogni modo, nel nostro caso la correzione ha permesso al modello Péclet di ottenere una stima molto buona del Δ_L misurato e una riduzione della discrepanza con il modello Craig e Gordon. La discrepanza tra Δ_L e Δ_e è funzione diretta del tasso di traspirazione; valori minimi di discrepanza sono registrati a basso tasso di evaporazione (Fig. 1d), in quanto associati a un più largo contributo del-

la (meno arricchita) acqua delle nervature. L'affidabilità del modello Péclet dipende non solo dalle misure di traspirazione (E), ma anche dalla misura/stima di L (distanza effettiva tra l'acqua più arricchita del sito di evaporazione e quella meno arricchita proveniente dalla nervatura). Questo termine, difficile da calcolare su basi anatomiche è stato stimato ponendo in relazione la discrepanza tra Δ_L e Δ_e ed E . I risultati hanno mostrato che L è quasi costante e non risponde alle variazioni dei parametri ambientali (Fig. 2). Il valore di 7 mm, stimato in questo caso, si discosta lievemente da quello stimato in precedenti lavori (8 mm. - Barbour & Farquhar 2000).

L'affidabilità dei modelli dipende anche dal calcolo della c_c (concentrazione di CO_2 nei cloroplasti) necessaria alla stima del δ_c ($\delta^{18}\text{O}$ della CO_2 nei cloroplasti). La stima di c_c è stata ottenuta da misure di discriminazioni del ^{13}C , usando il metodo di Evans et al. (1986). I risultati indicano che il valore medio del-

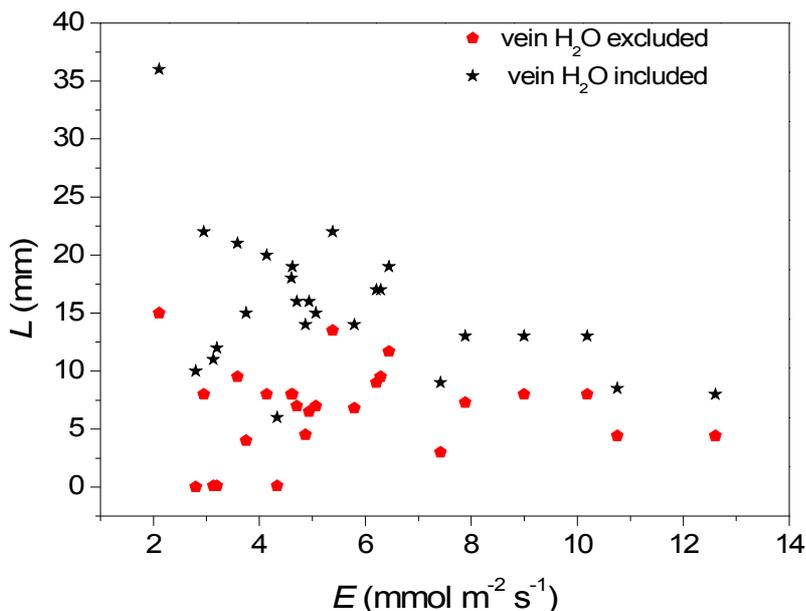


Fig. 2 - Correlazione tra i valori di L (distanza effettiva tra l'acqua più arricchita del sito di evaporazione e quella meno arricchita proveniente dalla nervatura) e di traspirazione (E) con (asterischi) o senza (simboli circolari) il contributo dell'acqua impoverita delle nervature.

la conduttanza interna della CO_2 dagli spazi intercellulari ai cloroplasti (g_i) è di $0.65 (\pm 0.05 \text{ S.E.}) \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$, mentre il valore medio del rapporto c_c/c_i è di $0.89 (\pm 0.03 \text{ S.E.})$, corrispondente a una riduzione della concentrazione da c_i a c_c di circa il 10%. In letteratura si stimano riduzioni variabili dal 5% al 30%, facendo lievitare l'errore che può essere commesso nel

calcolo di c quando la c_i è assimilata a c_c (Caemmerer & Evans 1991, Gillon & Yakir 2000a). I valori di δ_c corretti per c_c sono stati poi plottati con i valori δ_e (arricchimento in $\delta^{18}O$ al sito di evaporazione), ottenendo una correlazione significativa ($r = 0.84, P = 0.0001, n = 65$ per $29^\circ C$; $r = 0.66, P = 0.001, n = 23$ per $20^\circ C$), come mostrato in fig. 3. δ_c è stato correlato an-

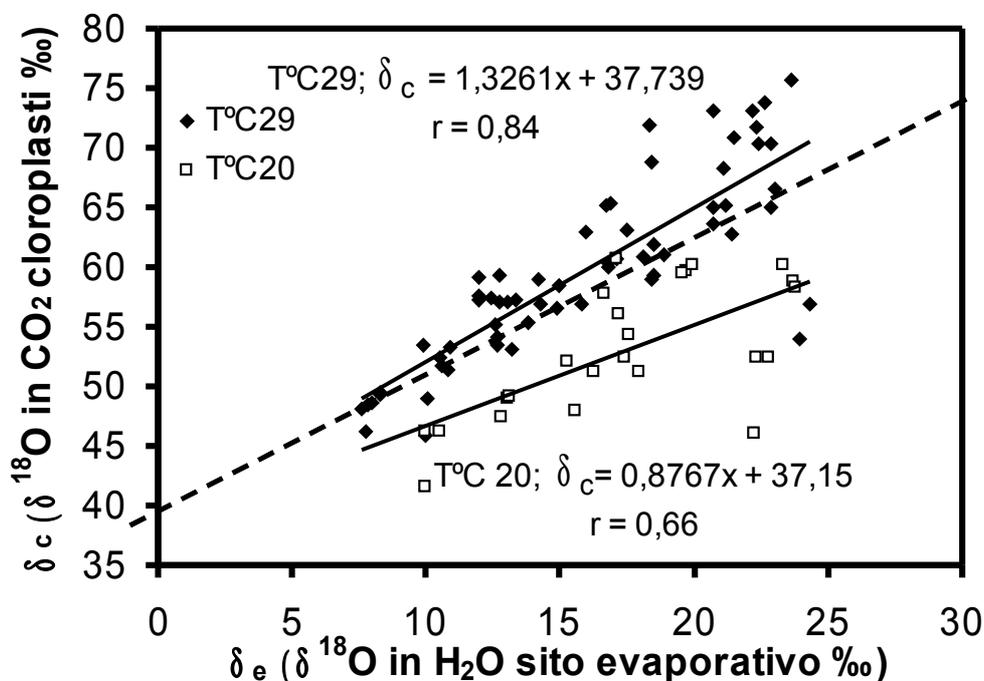


Fig. 3 - Correlazione tra δ_c ($\delta^{18}O$ della CO_2 dei cloroplasti) e δ_e ($\delta^{18}O$ dell'acqua al sito di evaporazione) a due diverse temperature fogliari ($29^\circ C$ per simboli romboidali; $20^\circ C$ per simboli quadrati). La linea tratteggiata rappresenta la relazione attesa se la CO_2 dei cloroplasti fosse in pieno equilibrio isotopico dell'ossigeno con l'acqua al sito di evaporazione. I valori di $\delta^{18}O$ sono espressi rispetto a VSMOW (vedi testo).

che con δ_L stimato con Pécelet per TC 29 ($r = 0.70$, $P = 0.0001$, $n = 65$), ma la correlazione non è stata così forte come per δ_e . Questo dimostra, come in altri lavori, che δ_e è più affidabile di δ_L nella stima di $\delta^{18}\text{O}$ in quanto l'acqua dei cloroplasti ha una segnatura isotopica più vicina al sito di evaporazione che all'acqua fogliare totale (Flanagan 1998).

La stima di θ (grado della reazione di equilibrio nello scambio di atomi di ossigeno tra CO_2 ed H_2O) è stata ottenuta mediante le equazioni 5 e 6 (Gillon & Yakir 2000b). I valori medi sono stati di 1.10 ± 0.02 (SE, $n = 65$) per 29°C e 0.80 ± 0.02 (SE, $n = 23$) per 20°C . Il valore di θ ottenuto a 29°C , prossimo all'unità, indica lo stato di quasi completo equilibrio tra CO_2 ed H_2O come evidenziato dalla linea tratteggiata nella fig. 3, mentre a temperatura di 20°C , un θ di 0.8 indica uno scambio parziale. Pertanto, i risultati mostrano che il grado di equilibrio, mediato dall'enzima CA, è notevolmente sensibile alla temperatura fogliare (fig. 3). Gillon & Yakir (2001) hanno suggerito un valore di $\theta = 0.78$ da utilizzare nei modelli globali, invece di un valore di 1. Tale valore medio è stato ottenuto sulla base di una misura diretta dell'attività catalitica dell'enzima CA effettuato su 52 specie appartenenti a diversi gruppi di piante sia C_3 sia C_4 .

In conclusione, ignorare i fattori che influenzano il frazionamento isotopico che avviene durante l'attività di fotosintesi potrebbe determinare una sottostima del $\delta^{18}\text{O}$ atmosferico anche del 40-50% (Ciais et al. 1997, Peylin et al. 1999).

Ringraziamenti

Si ringraziano i dottori Hilary Stuart-Williams e Claudia Keitel per l'assistenza con le analisi isotopiche, Peter Groeneveld e Chin Wong per l'assistenza e la costruzione del sistema per la misura degli scambi gassosi e tutto il gruppo di Environmental Biology per gli utili suggerimenti e discussioni su questa ricerca. Si ringraziano inoltre Franco Miglietta (CNR IBIMET) e il Commissario Europeo Mr. Peter che nell'ambito del Progetto Europeo MIND (*Mediterranean terrestrial ecosystem and Increasing Drought*), hanno autorizzato lo stage di F. Ripullone presso la Research School of Biological Sciences dell'Australian National University di Canberra (Australia).

Bibliografia

Barbour MM, Farquhar GD (2000). Relative humidity and ABA-induced variation in carbon and oxygen isotope ratios of cotton leaves. *Plant Cell and Environment* 23: 473-485.

Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD (1997). CO_2 and water vapour across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant physiology* 114: 185-191.

Caemmerer S, Farquhar GD (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.

Caemmerer S, Evans JR (1991). Determination of the average partial pressure of CO_2 in chloroplasts from leaves of several C_3 plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 287-305.

Cernusak L, Wong SC, Farquhar GD (2003). Oxygen isotope composition of phloem sap in relation to leaf water in *Ricinus communis*. *Functional Plant Biology* 30: 1059-1070.

Cernusak L, Farquhar GD, Wong SC, Stuart-Williams H (2004). Measurement and Interpretation of the Oxygen Isotope Composition of Carbon Dioxide Respired by Leaves in the Dark. *Plant Physiology* 136: 3350-3363.

Ciais P, Denning AS, Tans PP, Berry JA, Randall DA, Collatz GJ, Sellers PJ, White JWC, Trolier M, Meijer HAJ (1997). A three dimensional synthesis study of $\delta^{18}\text{O}$. 1. Surface fluxes. *Journal Geophysical Research* 102: 5857-5872.

Craig H, Gordon LI (1965). Deuterium and oxygen-18 variations in the ocean and the marine atmosphere. In: (Tongiorgi E ed.) *Proceedings of a Conference on Stable Isotopes in Oceanographic Studies and Paleo-temperatures*. Lischi and Figli, Pisa, Italy, pp 9-130.

Evans JR, Sharkey TD, Berry JA, Farquhar GD (1986). Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 110: 339-346.

Farquhar GD, Richards RA (1984). Isotopes composition of plant carbon correlates with water use-efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11: 519-538.

Farquhar GD, Lloyd J (1993). Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations* (Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD eds.), Academic Press, New York, USA, pp 47-70.

Farquhar GD, Lloyd J, Taylor JA, Flanagan LB, Syversten JP, Hubick KT, Wong S, Ehleringer JR (1993). Vegetation effects on the isotope composition of oxygen in atmospheric CO_2 . *Nature* 363: 439-442.

Farquhar GD, Henry BK, Styles JM (1997). A rapid on-line technique for determination of oxygen isotope composition of nitrogen-containing organic matter and water. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11: 1554-1560.

Flanagan LB, Bain JF, Ehleringer JR (1991b). Stable oxygen

- and hydrogen isotope composition of leaf water in C₃ and C₄ plant species under field conditions. *Oecologia* 88: 394-400.
- Flanagan LB, Phillips SL, Ehleringer JR, Lloyd J, Farquhar GD (1994). Effects of changes in leaf water oxygen isotopic composition on discrimination against C¹⁸O¹⁶O during photosynthetic gas exchange. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 221-234.
- Flanagan LB (1998). Oxygen isotope effects during CO₂ exchange: from leaf to ecosystem processes. *Stable isotopes*, edited by H. Griffiths, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, pp 185-201.
- Flanagan LB, Ehleringer JR (1998). Ecosystem-atmosphere CO₂ exchange: interpreting signals of change using stable isotope ratios. *Trends in Ecology & Evolution* pp 10-14.
- Francey RJ, Tans PP, Allison CE, Enting IG, White JWC, Trolier M (1995). Changes in oceanic and terrestrial carbon uptake since 1982. *Nature* 373: 326-330.
- Gan KS, Wong SC, Yong JWH, Farquhar GD (2002). ¹⁸O Spatial patterns of vein xylem water, leaf water and dry matter in cotton leaves. *Plant Physiology* 130: 1008-1021.
- Gillon JS, Yakir D (2000a). Internal conductance to CO₂ diffusion and C¹⁸OO discrimination in C₃ leaves. *Plant Physiology* 123: 201-213.
- Gillon JS, Yakir D (2000b). Naturally low carbonic anhydrase activity in C₄ and C₃ plants limits discrimination against C¹⁸OO during photosynthesis. *Plant cell and environment* 23: 903-915.
- Gillon JS, Yakir D (2001). Influence of Carbonic Anhydrase Activity in Terrestrial Vegetation on the ¹⁸O Content of Atmospheric CO₂. *Science* 291:2584-2587.
- Hardwood KG, Gillon JS, Griffiths H, Broadmeadow MSJ (1998). Diurnal variation of delta ¹³CO₂, delta C¹⁸O¹⁶O and evaporative site enrichment of delta H₂ ¹⁸O in *Piper aduncum* under field conditions in Trinidad. *Plant Cell and Environment* 21: 269-283.
- IPCC (1996). *Climate change 1995. The Science of Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge pp 572.
- Leaney F, Osmond C, Allison G, Ziegler H (1985). Hydrogen isotope composition of leaf water in C₃ and C₄ plants: its relationship to the hydrogen-isotope composition of dry matter. *Planta* 164: 215-220.
- Peylin P, Ciais P, Denning AS, Tans PP, Berry JA, White JWC (1999). A 3-dimensional study of d ¹⁸O in atmospheric CO₂: contribution of different land ecosystems. *Tellus* 51B: 642-667.
- Roden JS, Ehleringer JR (1999). Observations of hydrogen and oxygen isotopes in leaf water confirm the Craig-Gordon model under wide-ranging environmental conditions. *Plant Physiology* 120: 1165-1173.
- Tans PP, Fung IY, Takahashi T (1990). Observational constraints on the global atmospheric CO₂ budget. *Science* 247: 1431-1438.
- Tans PP, Keeling RF, Berry JA (1993). Oceanic ¹³C data. A new window on CO₂ uptake by the oceans. *Global Biogeochemical Cycles* 7: 353-368.
- Williams TG, Flanagan LB, Coleman JR (1996). Photosynthetic gas exchange and discrimination against ¹³CO₂ and C¹⁸O¹⁶O in *Pleurozium* and *Sphagnum*. *Oecologia* 108: 38-46.
- Yakir D (1992a). Water compartmentation in plant tissue: isotopic evidence. In: *Water and Life* (Somero SGN, Osmond CB, Bolis CL eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 205-222.
- Yakir D, Berry JA, Giles L, Osmond CB (1993). The ¹⁸O of water in the metabolic compartment of transpiring leaves. (eds J.R. Ehleringer, A.E. Hall & G.D. Farquhar), Academic Press, New York, USA.
- Yakir D, Wang XF (1996). Estimation of CO₂ and water fluxes between terrestrial vegetation and the atmosphere from isotope measurements. *Nature* 380: 515-517.
- Yakir D (1998). Oxygen-18 of leaf water: a crossroad for plant-associated isotopic signals. In: *Stable Isopes* (Griffiths H ed.), BIOS Scientific, Oxford, UK, pp 147-168.