



Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2013 – 2014

**Reconstructie van de ‘water use efficiency’ van
Congoese boomsoorten onder invloed van
klimaatsverandering**

Baekelandt Grégory, Demuytere Celestin, Pausenberger Nancy, Roels Jana

Promotoren: Prof. dr. ir. Pascal Boeckx ; dr. ir. Hans Verbeeck

Tutor: ir. Elizabeth Kearsley

AUTEURSRECHT

De auteurs en promotoren geven toestemming deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor individueel gebruik.

Elk ander gebruik, zoals aanhalen van resultaten waarbij de bron niet wordt vermeld, valt onder de beperkingen van het auteursrecht.

6 juni 2014

Baekelandt Grégory, Demuytere Celestin, Pausenberger Nancy, Roels Jana

Promotoren: Prof. dr. ir. Pascal Boeckx ; dr. ir. Hans Verbeeck

Tutor: ir. Elizabeth Kearsley

Handtekeningen:

WOORD VOORAF

Vooreerst willen wij onze tutor ir. Elizabeth Kearsley bedanken. Zij heeft ons geholpen van het verzamelen van de stalen tot het afwerken van de laboproef, verder heeft zij ons begeleid en de weg getoond naar het maken van een volwaardige bachelorproef. Zonder haar was dit niet mogelijk geweest. Verder willen wij onze promotoren Prof. dr. ir. Pascal Boeckx en dr. ir. Hans Verbeeck bedanken voor het mogelijk maken van deze scriptie.

Voor de boomschijven betuigen wij onze dank aan Emmanuel Kasongo, zonder hem zouden er geen stalen geweest zijn. Het was de verdienste van Hans Beeckman dat wij met hem in contact kwamen, ook stelde hij zijn labo in Tervuren beschikbaar, waarvoor onze dank.

INHOUDSOPGAVE

1.	INLEIDING.....	1
2.	LITERATUURSTUDIE.....	3
2.1.	CONTEXT EN SITUERING	3
2.1.1.	‘Water use efficiency’	3
2.1.1.1.	Definitie.....	3
2.1.1.2.	‘Water use efficiency’ en klimaat	3
2.1.2.	Klimaatsverandering en de koolstofcyclus.....	4
2.1.3.	Tropische wouden, effect op klimaat	6
2.2.	FYSIOLOGIE	6
2.2.1.	Watertransport in het xyleem	6
2.2.2.	Fotosynthese	8
2.2.3.	Floëemtransport.....	9
2.2.4.	Respiratie.....	10
2.3.	FRACTIONATIE	10
2.3.1.	Algemeen.....	10
2.3.2.	Controlerende factoren	12
2.3.2.1.	Temperatuur	13
2.3.2.2.	Instraling.....	13
2.3.2.3.	Boomhoogte	14
2.3.2.4.	Boomleeftijd.....	14
2.3.3.	Farquhar-vergelijking	15
2.3.3.1.	Farquhar-vergelijking zonder correctie.....	15
2.3.3.2.	Farquhar-vergelijking met correctie.....	15
3.	MATERIALEN EN METHODE	18
3.1.	STUDIEGEBIED.....	18
3.2.	ENTANDROPHRAGMA ANGOLENSE (WELW.) C.DC.	19
3.3.	STAALNAME	20
3.4.	CELLULOSE-EXTRACTIE	21
3.5.	ISOTOPENANALYSE.....	23
3.6.	WATER USE EFFICIENCY	23
4.	RESULTATEN	27
4.1.	LANGE TERMIJN TRENDS IN $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$, c_i en WUE_i	27
4.2.	LANGE TERMIJN RESULTATEN DOOR MIDDEL VAN CORRELATIE	31
5.	DISCUSSIE.....	34
6.	BESLUIT	38

7. LITERATUURLIJST	39
8. BIJLAGE	46

1. INLEIDING

De klimaatsverandering is een zeer actueel thema geworden de laatste decennia. De respons van vegetatie op de klimaatsverandering en de verhoogde atmosferische koolstofconcentratie heeft zijn effect op de hydrologische cyclus en koolstofcyclus en bijgevolg op het klimaat zelf (Brienen et al., 2010). Zeker grote bosgebieden zoals ondermeer het Amazoneregenwoud en het tropisch regenwoud in Congo zullen een effect hebben op het klimaat, aangezien de neerslag in tal van gebieden afhankelijk is van de verdamping in deze regenwouden (Van der ent et al., 2010). Door verschillende terugkoppelingseffecten is het moeilijk in te schatten hoe bossen precies zullen reageren op de klimaatsverandering. Daarom is het belangrijk om verder onderzoek te voeren naar de veranderende fysiologische respons van bomen en bij te leren over hoe deze mechanismen zullen evolueren in de toekomst.

De 'water use efficiency' (WUE), de hoeveelheid droge stof die geproduceerd wordt per geëvaporeerde hoeveelheid water, is een parameter die algemeen gebruikt wordt in onderzoeken omtrent de effecten van droogte en opwarming van de aarde. Desalniettemin is dit onderhevig aan sterk uiteenlopende factoren die de resultaten kunnen beïnvloeden, waardoor er een afweging moet gemaakt worden met welke factoren er rekening zal gehouden worden bij het verwerken van de bekomen data. Om de reactie van de WUE van bomen op deze factoren te kunnen begrijpen, is het van belang zowel de context op 'grote' als op 'kleine' schaal te beschouwen. Daarvoor is enerzijds kennis nodig omtrent verschillende processen die zich op 'grote' schaal afspelen zoals de klimaatsverandering, de koolstofcyclus en de feedbacks van tropische wouden op het klimaat. Maar natuurlijk mogen de processen op 'kleine' schaal niet vergeten worden. Daarom is het belangrijk om bij het laagste organisatorische niveau te beginnen, met name de fysiologie, en via 'upscaling' zo het volledige plaatje te omvatten.

Dit onderzoek spitst zich toe op veranderingen in de WUE van de Afrikaanse boomsoort *Entandrophragma angolensis*, de mogelijke oorzaken hiervan en correlaties met omgevingsfactoren. Zo werden onderling verbanden gelegd tussen intrinsieke 'water use efficiency' (WUE_i), temperatuur, neerslag, interne koolstofconcentraties en atmosferische koolstofconcentratie. Eerder verricht onderzoek rond een vergelijkbaar tropisch bos in Mexico (Brienen, Wanek, & Hietz, 2010) toonde aan dat bomen een sterke fysiologische verandering ondergingen tijdens de stijgende CO₂ concentratie van de laatste 40 jaar. Hoewel er een bijna identieke interne koolstofconcentratie in de cel (c_i) gevonden werd, nam de WUE_i toe met maar liefst 40%. De quasi gelijke c_i duidt aan dat een hogere CO₂ concentratie geen evenredige verhoging van de fotosynthesesnelheid induceert. De stijging van de WUE_i zal dus waarschijnlijk een gevolg zijn van een reductie in stomatale geleidbaarheid.

Er zijn nog maar weinig studies uitgevoerd omtrent het bepalen van stabiele isotopen verhoudingen in jaarringen van bomen afkomstig uit tropische gebieden in tegenstelling tot deze afkomstig van gematigde streken (Brienen *et al.*, 2010). De belangrijkste reden hiervoor is dat er maar weinig boomsoorten zijn in tropische gebieden die jaarringen produceren. Wel zijn er enkele studies die gebruik maakten van jaarringloze boomsoorten maar dit maakt het natuurlijk moeilijk om deze te linken met exacte jaardata. Het is ideaal om de invloed van een stijgende CO₂ concentratie en de klimaatsverandering op bomen (Fritts, 1976) te onderzoeken via isotopen analyse van jaarringen. Behalve het vastleggen van de historische groeisnelheden, geeft dit ook

een beeld van de stabiele C-isotopenverhouding in bijvoorbeeld cellulose (McCarroll & Loader, 2004) gedurende de levensperiode van de boom. Deze verhouding tussen ^{12}C en ^{13}C , die gedreven is door de vraag naar CO_2 en de aanvoer ervan via de stomatale geleidbaarheid, is het resultaat van een selectieve discriminatie ten nadele van het zwaardere $^{13}\text{CO}_2$ tijdens de diffusie doorheen de stomata en de fotosynthesereacties die daarop volgen. Deze mechanismen zijn naar onderzoek van (Francey & Farquhar, 1982) lineair gecorreleerd. De isotopen analyse van jaarringen biedt dus de kans om de veranderende fysiologische respons van bomen te bestuderen in het veranderende klimaat van de voorbije decennia.

2. LITERATUURSTUDIE

2.1. CONTEXT EN SITUERING

2.1.1. 'Water use efficiency'

2.1.1.1. Definitie

De 'water use efficiency' (WUE) is de hoeveelheid droge stof die geproduceerd wordt per geëvaporeerde hoeveelheid water (Reheul, 2005). Ze is ondermeer afhankelijk van klimaatsomstandigheden zoals luchtvochtigheid, instraling, temperatuur en neerslag. Daarom wordt vaak de intrinsieke 'water use efficiency' (WUE_i) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) gebruikt om de WUE te berekenen, dit is de ratio van de assimilatie rate A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en de stomatale geleidbaarheid voor waterdamp g_w ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$):

$$WUE_i = \frac{A}{g_w} \quad (1)$$

Deze variabele heeft als voordeel dat verschillen in WUE gemakkelijk kunnen vergeleken worden met elkaar. De stomatale geleidbaarheid wordt gedefinieerd als een maat voor de snelheid waarmee koolstofdioxide de stomata binnenkomt of waarmee waterdamp de stomata verlaat. De stomata openen bij gunstige weersomstandigheden doordat er een turgordruk wordt gecreëerd in de sluitcellen die de stomata vormen. De sluitcellen zijn fotosynthetisch actief, waardoor bij het invallen van fotosynthetische actieve straling K^+ ionen in sluitcellen zullen binnen stromen, begeleid met de tegenionen Cl^- en malaat (afbraakproduct van zetmeel), waardoor de osmotische potentiaal Ψ_s zal dalen. Dit wordt mogelijk gemaakt doordat de protonenpompen H^+ ionen naar buiten pompen. Door de verhoogde concentratie aan ionen in de sluitcellen zal via osmose water in deze cellen stromen, de turgordruk zal stijgen en de stomata gaan open. Overdag zal de concentratie aan K^+ ionen dalen maar blijven de stomata toch geopend. Het is de sucrose, geproduceerd door fotosynthese, die verantwoordelijk is voor de turgordruk in de sluitcellen gedurende het verdere verloop van de dag. Tegen de avond zal de fotosynthetisch actieve straling dalen waardoor de concentratie aan sucrose afneemt en de stomata zullen sluiten. Via de stomata kunnen zowel O_2 , H_2O en CO_2 getransporteerd worden van of naar de atmosfeer. De stomatale geleidbaarheid, of omgekeerd de stomatale weerstand, van een blad is van essentieel belang voor de fotosynthese en transpiratie.

2.1.1.2. 'Water use efficiency' en klimaat

Stomata zijn in staat om tijdens droogtestres hun evaporatie te beperken door de stomatale weerstand te vergroten (Bacon, 2004). Dit gaat echter gepaard met andere verliezen zoals de inhibitie van fotosynthese aangezien CO_2 opname hoofdzakelijk via stomata gebeurt. Dit resulteert finaal in een verminderde accumulatie van organische stoffen. De concentratie van het plantenhormoon abscisinezuur (ABA) toont een significant verband met droogtestress. Bij droogte stijgt de concentratie aan ABA in de wortels. Vervolgens wordt het zuur via het xyleem getransporteerd naar de bladeren en komt het in de sluitcellen terecht waar het de instroomkanalen van Ca^{2+} en de protonenpompen inhibeert waardoor de pH van het cytosol stijgt. Hierdoor wordt instroom verhinderd van K^+ ionen en zelfs een uitstroom geïnduceerd, begeleid met zijn

tegenionen. Als gevolg is er een wateruitstroom en zal er geen turgordruk opgebouwd worden in de sluitcellen waardoor deze gesloten blijven.

Sinds de industriële revolutie wordt er een sterke toename in de atmosferische CO₂ concentratie waargenomen, dit heeft ook zijn effect op de WUE_i. Verhoogde CO₂ concentraties leiden tot een hogere assimilatie rate A en een kleinere stomatale geleidbaarheid g_s doordat er een sterkere gradiënt heerst tussen atmosferische CO₂ (c_a) en CO₂ in de intercellulaire ruimten (c_i) dan voorheen. In verschillende onderzoeken werden er tegenstrijdige resultaten bekomen voor de verhouding tussen intercellulaire en atmosferische koolstof (c_i/c_a) bij een langdurige blootstelling aan verhoogde CO₂ concentraties. Zo bleef bij Bunce (2001) de verhouding constant terwijl dit bij Kaminski (2013) significant was gestegen. Een stijging van deze verhouding c_i/c_a werd toegeschreven aan de stomatale acclimatisatie, dit wordt gedefinieerd als fysiologische veranderingen ten gevolge van veranderende milieucondities (Morison, 1998). Een constante verhouding zou verkregen kunnen worden bij zowel stomatale als fotosynthetische acclimatisatie (Bunce, 2001). Er is echter nog maar weinig geweten over stomatale acclimatisatie ten opzichte van de kennis omtrent fotosynthetische acclimatisatie.

Een gevolg van de klimaatsopwarming is de verhoging van de luchttemperatuur. In de door Kaminski et al. (2013) uitgevoerde experimenten werd aangetoond dat planten een significante stijging in WUE_i kenden als ze werden blootgesteld aan verhoogde CO₂ concentraties bij verschillende temperaturen over een langere periode. Dit kwam doordat bij lagere temperaturen de fotosynthese steeg terwijl bij hogere temperaturen de stomatale geleidbaarheid daalde en de fotosynthese daalde. Bij gemiddelde temperaturen was dit een combinatie van beide. Een van de verklaringen voor de daling van fotosynthese bij hogere temperaturen is dat de activiteit van RuBP en RuBP-activase worden gehinibeerd. Beide zijn echter cruciaal tijdens de Calvin-cyclus waardoor deze wordt verstoord en de aanmaak van sucrose bemoeilijkt wordt.

2.1.2. Klimaatsverandering en de koolstofcyclus

Tegenwoordig zijn zowel de opwarming van de aarde als het uit evenwicht zijn van de koolstofcyclus door de input van extra koolstof via fossiele brandstoffen algemeen gekende problemen. Beiden hebben een bewezen invloed op de groei en fysiologie van bomen. Zo zal een plant zijn stomatale geleidbaarheid trachten te reduceren bij een stijgende CO₂ concentratie en zal hierdoor de WUE_i toenemen (Farquhar *et al.*, 1989). Deze resultaten werden bevestigd in zowel korte als lange termijn experimenten in een kunstmatige omgeving, als in onderzoek naar natuurlijke vegetatie waarbij de CO₂-veranderingen door de opkomst van de industriële revolutie in acht werden genomen (Norby *et al.*, 1999; Saurer *et al.*, 2004; Waterhouse, *et al.*, 2004). Er is echter nog veel onenigheid en twijfel over welke parameters de grootste invloed hebben op de groei en fysiologie van bomen en over de invloed van parameters onderling. Deze kunnen namelijk zowel een positief als negatief gecorreleerd feedback effect uitoefenen. Feedback-mechanismen zijn vaak nog onbeschreven of niet voldoende onderzocht om eenduidig aan te tonen hoe de invloed van parameters, zoals een verhoogde temperatuur of CO₂-concentratie, de groei kan versterken of benadelen. Tevens is ook onvoldoende gekarakteriseerd hoe deze daaropvolgend hun effect hebben op andere cycli, zoals de hydrologische en koolstofcyclus die ondermeer een verminderde neerslag of veranderingen in bodemvochtigheid als gevolg hebben (Betts *et al.*, 2004).

Het globale aandeel van bossen is van groot belang in onderzoek naar klimaatsverandering aangezien deze samen voor ca. 42 miljoen km² instaan, wat overeenkomt met 30% van het totaal landoppervlak (Bonan, 2008). Bossen hebben niet enkel een invloed via CO₂-verbruik, maar ook via energie-uitwisselingen, de waterkringloop, uitwisseling van chemische stoffen met de atmosfeer en parameters zoals het albedo, bodemtemperatuur en het vochtgehalte van de ondergrond. Tropische wouden worden afzonderlijk als een belangrijke schakel bestudeerd, ondermeer omdat ze voor 40-50% (Lewis *et al.*, 2006; Metz *et al.*, 2007) van de terrestrische koolstofstock en voor ca. 50% (Sabine *et al.*, 2004) van de netto primaire koolstofproductie instaan en zo de koolstofcyclus in grote mate beïnvloeden. Deze cyclus is onderhevig aan wijzigingen door klimaatsveranderingen en menselijke tussenkomsten zoals boskap, gebruik van fossiele brandstoffen en de nieuwe invulling van landgebruik.

Eén van de aannames bij de uitgevoerde onderzoeken naar de koolstofcyclus en het fossiele brandstofverbruik was dat de stijgende CO₂ concentratie een CO₂-bemestingseffect zou veroorzaken (Lloyd & Farquhar, 2008; Lewis *et al.*, 2009). Hierdoor zou het onevenwicht tussen de extra input en assimilatie, al dan niet in meer beperkte mate, teniet gedaan worden door natuurlijke vegetatie aangezien de synthesesnelheid evenredig zou evolueren. Deze veronderstelling werd aanvaard omdat men van mening was dat fotosynthese in tropische bossen koolstof gelimiteerd is (Clark, 2004) en door middel van een stijging in de atmosfeer, de assimilatie sterk kon stijgen. Dit idee is intussen echter weerlegd (Wright, 2005) vermits het effect van koolstofbemesting geen evenredige fotosynthese snelheid teweeg brengt en de extra uitstoot de gestimuleerde biomassa-assimilatie van de flora sterk overstijgt. Verder is het belangrijk om de interactie met andere aspecten zoals de hoeveelheid instraling en extreme temperaturen in acht te nemen aangezien deze een invloed hebben op ondermeer de WUE en stomatale geleidbaarheid. Een stijgende temperatuur kan enerzijds resulteren in een positief effect op de bodemfauna waardoor de nutriëntbeschikbaarheid zal stijgen en de groei kan verhogen. Via extra respiratie van bodemfauna kan er ook vastgelegde bodemkoolstof vrijgeven worden, wat een positieve feedback teweegbrengt. Anderzijds zal door de onevenwichtige temperatuurstijging verspreid over de volledige planeet, in bepaalde gebieden een veel ingrijpendere temperatuurstijging behaald worden. Door denaturatie van enzymen kan de efficiëntie van assimilatie echter opnieuw dalen indien zich extreme momenten voordoen (Krapp *et al.*, 1994). Hiernaast zullen vele gebieden op meer regelmatige basis onderhevig zijn aan extreme droogteperiodes en temperatuurschommelingen, waarbij de vraag zal opkomen of er nog voldoende diversiteit zal heersen in tropische wouden om deze omschakeling aan te kunnen.

Zo stelt men tijdens El Niño jaargangen vast dat er een netto koolstofverlies van de biosfeer naar de atmosfeer is (Denman & Solomon, 2007), voornamelijk in tropische gebieden. Tevens zijn door de toenemende droogte bepaalde gebieden meer onderhevig aan bosbranden, wat op zich een schakel kan zijn in een feedback systeem dat versterkend werkt op het koolstofverlies. De veerkracht van het ecosysteem is op dat moment van groot belang om de uiteindelijke uitkomst te bepalen.

Cowling *et al.* (2004) stelden hieromtrent een klimaat-vegetatiemodel (HadCM3LC) voor dat toepasbaar is op zowel het verleden (de Laatste ijstijd en het Jonge Dryas) als de nabije toekomst. Ze besluiten dat de lagere respiratiekost en evapotranspiratie in moeilijkere periodes dominant zijn in het proces van onderhoud voor de bossen. Tevens stellen ze dat er op dit moment een limiet

bereikt is waarbij deze mechanismen een positieve feedback zullen vertonen om zo een terugval en het afsterven van bossen te induceren.

2.1.3. Tropische wouden, effect op klimaat

Er werd reeds aangehaald dat tropische wouden een grote invloed hebben op verschillende kringlopen zoals de hydrologische en koolstofcyclus. Bossen oefenen niet enkel een invloed uit, maar zijn tevens ook zelf gevoelig aan de invloed van veranderingen. Door middel van terugschakelingsprocessen zullen ze zich in de mate van het mogelijke aan de situatie adapteren. Deze feedback-mechanismen kunnen zich zowel positief als negatief uiten en kunnen uiteindelijk aanleiding geven tot een verandering op ecosysteem- en/of klimaatniveau. Eén bepaalde verandering in het milieu die de groeisnelheid of WUE verandert, kan als cascade de klimaatsverandering zowel vertragen als versnellen (Betts *et al.*, 2004).

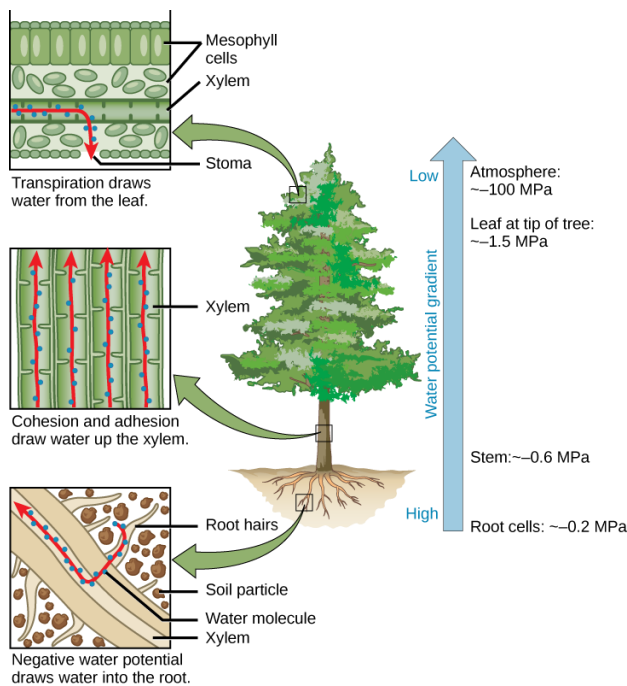
In eerste instantie zal de boom zich aanpassen aan de gewijzigde situatie door, bijvoorbeeld het beschikbare water efficiënter aan te wenden en de stomata anders te gebruiken via het regelen van de stomatale geleidbaarheid. Dit is tevens ook waar dit onderzoek zich op richt. Indien de veranderingen echter te brusk optreden zullen verschillende bomen zich niet voldoende snel kunnen aanpassen en zal dit aanleiding geven tot een stijging van de 'dieback' (Cowling *et al.*, 2004). Als de biodiversiteit groot genoeg is, kan een ecosysteem dit overwinnen dankzij het 'survival of the fittest' principe. Wanneer echter de overgang van situatie te snel verloopt of de diversiteit niet groot genoeg is, door bijvoorbeeld zware boskap of beschadiging van het ecosysteem, dan zal dit onherroepelijk leiden tot het tenietgaan van het ecosysteem.

2.2. FYSIOLOGIE

Zoals reeds eerder werd toegelicht geeft de WUE_i de ratio tussen fotosynthese en stomatale geleidbaarheid. Hieronder worden deze fysiologische aspecten in meer detail besproken zodat de onderliggende mechanismen duidelijk worden. Vervolgens wordt het fractionatieproces behandeld waarbij deze fysiologische processen een belangrijke rol spelen.

2.2.1. Watertransport in het xyleem

Water is een zeer belangrijke component in plantencellen. Groeiende plantenweefsels bevatten 80-95% water, verschillend voor elk plantendeel (Reheul, 2005). Het water wordt opgenomen door de wortels, vervolgens getransporteerd doorheen de plant en daarna ter hoogte van de bladeren getranspireerd (Figuur 1). Watertransport doorheen de plant is passief met als drijfkracht de waterpotentiaal. Deze bestaat uit drie termen: de osmotische potentiaal, de hydrostatische potentiaal en de gravimetrische potentiaal. De laatstgenoemde kan verwaarloosd worden ten opzichte van de twee andere potentialen. In plantencellen heerst een negatieve waterpotentiaal, hierdoor zal via osmose water in de wortelcellen opgezogen worden uit de rhizosfeer. Het water kan drie verschillende pathways volgen om het xyleem te bereiken, alvorens naar hoger gelegen plantendelen getransporteerd te worden. Een eerste pathway is via de apoplast, dit is een systeem van intercellulaire ruimtes en celwanden waardoor het water in staat is te migreren. Een tweede mogelijkheid is de cellulaire pathway waarbij het water doorheen de celmembranen gaat. De laatste weg die kan gevolgd worden, is via de symplast. Hier zal het water zich een weg banen via



het cytoplasma. Het cytoplasma van verschillende cellen staat hierbij in verbinding met elkaar via plasmodesmata. Zowel deze pathways als de stroomsnelheid van het water bepalen de hydraulische geleidbaarheid in de wortels, deze is niet constant over heel het wortelstelsel.

Figuur 1: Watertransport in het xyleem met als drijvende kracht de waterpotentiaal (Tension Theory of Sap Ascent., van <https://www.boundless.com>)

Hoe het water precies zijn weg kan vervolgen tot aan de bladeren wordt besproken in de 'cohesion-tension' theorie (CT-theorie) die eind 19^e eeuw werd voorgesteld door John Joly en Henry Horatio Dixon. In deze theorie speelt de transpiratie een belangrijke rol. Die is verantwoordelijk voor een zeer negatieve hydrostatische druk bovenaan de plant, de zogenaamde trekspanning. Deze kan oplopen tot -30 MPa in de xyleemvaten en is voldoende negatief om het water te transporteren in hoge planten (er moet een drukverschil aanwezig zijn van 2 MPa om water 100 m hoog te transporteren). De negatieve hydrostatische druk wordt gecreëerd doordat door de transpiratie van de waterfilm aan het bladoppervlak de menisci (oppervlakte tussen de waterfilm en de lucht) holler worden en dus een grotere oppervlaktespanning kennen. Om de oorspronkelijke vorm van de menisci te herstellen wordt een negatieve spanning gecreëerd in het xyleem. De oppervlaktespanning is dus de drijvende kracht van dit proces. Een tweede factor die het mogelijk maakt om het water naar de bladeren te transporteren zijn de cohesiekrachten tussen de watermoleculen. Het water vormt zogenaamde waterdraden, die grote negatieve drukken kunnen verdragen.

Het was met de ontwikkeling van de drukkamer in de jaren '60 van de voorgaande eeuw dat deze drukken voor het eerst indirect konden gemeten worden (Scholander et al., 1965). Dit liet toe om de CT-theorie grotendeels te bevestigen. Pas bij de uitvinding van de 'xylem pressure probe' (XPP) werd er sceptisch omgegaan met de theorie van John Joly en Henry Horatio Dixon. Met de XPP kon de druk direct gemeten worden in de cellen van het xyleem, de bekomen resultaten gaven aan dat de drukken vaak te klein waren om het water van transpirerende planten tot bij de bladeren te transporteren. Er zou dus nog een tweede factor aanwezig moeten zijn die voldoende druk levert om het water naar boven te stuwen. In 1994 publiceerde Canny een artikel waarin hij de CT-theorie aanvulde met een 'compensating pressure' theorie. Deze druk zou gegenereerd worden door weefseldrukken in het xyleem- en straalparenchym. De theorie kwam sterk onder druk te staan door vele wetenschappers en werd niet aanvaard (Comstock, 1999).

2.2.2. Fotosynthese

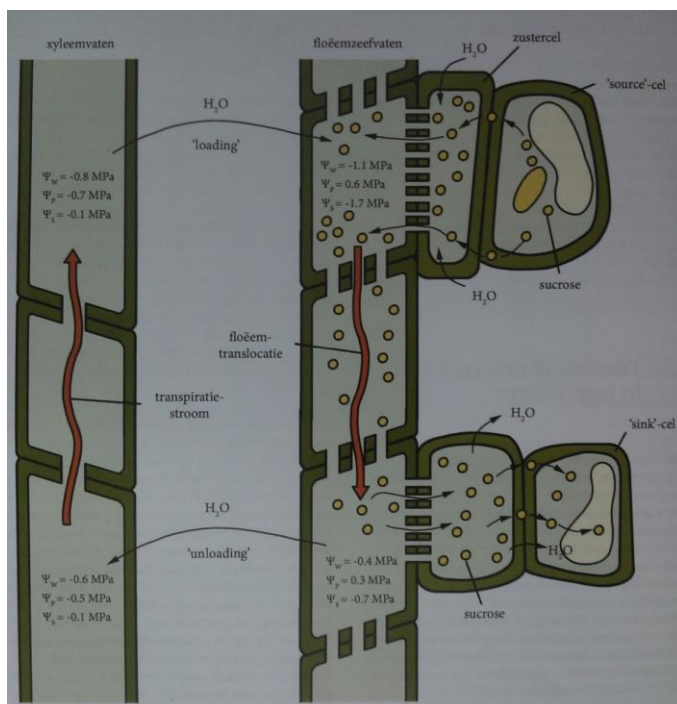
De fotosynthese bestaat uit twee reacties; de lichtreacties en de carboxylatiereacties. Deze vinden plaats in chlorofyl-bevattende chloroplasten in mesofylcellen. De lichtreacties kunnen slechts doorgaan indien er fotosynthetisch actieve straling invalt op de bladeren. Fotosynthetisch actieve straling (PAR) ligt in het lichtspectrum tussen 400-700nm. De belangrijkste molecuule die verantwoordelijk is voor de absorptie van deze straling is chlorofyl a, welk het gevoeligst is in het blauwe en rode gebied (400-500nm en 600-700nm). Chlorofyl b en carotenoïden zijn ook belangrijke lichtabsorberende moleculen maar worden bijkomende pigmenten genoemd aangezien ze hun lichtenergie doorgeven aan chlorofyl a en bijgevolg zorgen voor een verruiming van het absorptiespectrum. Wanneer deze pigmenten licht absorberen worden ze geëxciteerd. Deze lichtenergie kan verloren gaan aan fluorescentie, maar wordt meestal via energietransfer of elektronentransfer doorgegeven aan de volgende chlorofylmolecuule. Carotenoïden hebben nog een bijkomende functie met een beschermende rol. Doordat de energie van geëxciteerde carotenoïden niet groot genoeg is, kunnen zuurstofmoleculen niet reageren tot superperoxiden als er een overmaat aan inkomende lichtenergie is. Deze radicalen zouden echter schadelijk zijn voor het celmembraan. Hierdoor fungeren carotenoïden als anti-oxidanten. De lichtreacties gaan door in het thylakoïdenmembraan waarin verschillende eiwitcomplexen een rol spelen, zoals de twee fotosystemen (PSI en PSII). Zo'n fotosysteem bestaat uit een reactiecentrum en een antennecomplex. De laatst genoemde zorgt voor het opvangen van lichtenergie en het transfereren ervan naar het reactiecentrum. In het reactiecentrum zijn er slechts twee chlorofyl a moleculen die de lichtenergie kunnen gebruiken om fotochemische reacties door te voeren. Het PSII bevat P₆₈₀ pigmenten aangezien hier het licht best geabsorbeerd wordt bij een golflengte van 680nm in tegenstelling tot het PSI waar dit het best gebeurt bij 700nm (P₇₀₀). Na het doorlopen van deze twee reactiecentra wordt er ATP geleverd door de protonenpomp ATP-synthase. Tevens genereert de elektronentransfer NADPH. Verder worden twee watermoleculen gesplitst met als gevolg dat zuurstof vrij in de lucht terecht komt via de stomata. Dit proces wordt ook wel non-cyclische fotofosforylatie genoemd aangezien de elektronen niet opnieuw worden gebruikt.

De ATP en de NADPH moleculen die gegenereerd worden in de lichtreacties, worden gebruikt in de koolstofreacties of meer bepaald de Calvin-cyclus voor C₃-planten. Atmosferische koolstofdioxide komt via de stomata in het blad terecht. In deze reacties worden CO₂ moleculen omgezet tot koolhydraten in het stroma van de chloroplasten. De eerste reactie is de carboxylatie, hier reageren drie moleculen koolstofdioxide met ribulose 1,5-bifosfaat (RuBP), gekatalyseerd door het enzym RuBisCo (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase), tot zes moleculen 3-fosfoglyceraat (PGA). Bij de carboxylatie kan RuBP echter ook reageren met zuurstof, dit wordt fotorespiratie genoemd. Het nadeel hiervan is dat het rendement veel lager is en dat er geen CO₂ wordt gefixeerd. Zowel de opname van CO₂ als de carboxylatie gaan gepaard met een discriminatie ten nadele van ¹³C. Hier wordt verder op ingegaan in het deel 'fractionatie'. Na de carboxylatie vindt de reductie plaats van PGA tot 1,3-bifosfoglyceraat met tussenkomst van ATP en wordt dan verder gereduceerd tot glyceraldehyde 3-fosfaat (PGAL) door NADPH, er worden telkens zes moleculen gevormd. Tijdens de regeneratie wordt slechts één molecuule PGAL omgevormd tot sucrose. De overige vijf moleculen zorgen voor de regeneratie van RuBP, dit kost drie ATP moleculen. Een deel van het PGAL wordt getransporteerd naar het cytosol en direct omgezet tot sucrose en ander deel blijft in de chloroplast en wordt omgevormd tot zetmeel. 's Nachts zal het zetmeel worden omgezet tot sucrose in het cytosol, hierdoor is er altijd sucrose ter

beschikking voor de plant. Deze reacties genereren enkel ATP en dit proces wordt ook wel de cyclische fotofosforylatie genoemd.

2.2.3. Floëemtransport

Na de fotosynthese moeten de gegenereerde producten, voornamelijk suikers, verdeeld worden over de hele plant. Dit gebeurt aan de hand van het floëemtransport waardoor dit ook wel het 'suikertransport' wordt genoemd. Dit maakt het floëemtransport essentieel voor de allocatie van koolstof in de plant en bijgevolg ook voor plantengroei aangezien koolstof een essentiële component is voor de opbouw van ondermeer cellulose. De drijfveer van dit type transport is de osmotische drukgradiënt die heerst tussen 'source' en 'sink' (Reheul, 2005; De Schepper *et al.*, 2013). Deze gradiënt ontstaat doordat bij het laden van de zeefvatcellen de osmotische potentiaal en dus ook de waterpotentiaal in het 'source' weefsel daalt en de osmotische potentiaal in de 'sink' stijgt (d.i. vruchten, wortels en meristematisch weefsel). Dit 'pressure-flow' model of ook de Münch-theorie is algemeen aanvaard (Figuur 2) maar er zijn additionele hypothesen die om



Figuur 2: Het 'pressure-flow' model voor het verklaren van het floëemtransport (Taiz & Zeiger, 2002)

verder onderzoek vragen. Een mogelijke tekortkoming van de Münch-theorie is dat deze eerder zou gelden voor planten dan voor bomen. Aangezien de zeefvaten langer zijn bij bomen, zou er niet voldoende drukgradiënt heersen waardoor de floëemstroom niet zou kunnen doorgaan. Münch dacht dat de druk in bomen groter was dan in planten maar dit bleek net omgekeerd te zijn, ook hebben bomen en planten andere lading strategieën. Een aanvulling bij de Münch-theorie is het 'lek-herstel' mechanisme. Er werden gaten geobserveerd in de zeefvaten zodat suikers ook lateraal kunnen getransporteerd worden om laterale 'sinks' te voeden. Dit mechanisme zou ook dienst doen als buffersysteem om verstoorde concentratiegradiënten in het floëem te herstellen (Ludewig *et al.*, 2013; De Schepper *et al.*, 2013).

Er zijn drie strategieën mogelijk voor het laden van floëem. De drie strategieën zijn: actief apoplastisch laden, actief symplastisch polymeer trapping en passief symplastische diffusie. Welke strategie er gebruikt wordt is afhankelijk van welke soort molecuule er wordt getransporteerd en het type aanwezige zustercellen. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen apoplastisch en symplastisch laden alsook tussen actief en passief laden. Apoplastisch en symplastisch transport werden al eerder besproken in het deel fotosynthese. Het passief laden gebeurt door middel van diffusie terwijl het actief laden gebruikt maakt van pompen. Het actief laden zou als voordeel hebben dat er meer fotosyntheseproducten uit het mesofyl worden ontladen

en de hoeveelheid niet-productief koolstof zou dalen (Harper, 1989; Turgeon, 2010b). Fotosynthese zal het laden indirect beïnvloeden aangezien het instaat voor de productie van de assimilatieproducten die terecht komen in het mesofyl. Er bestaan feedbackmechanismes die er voor zorgen dat er geen overproductie is van deze assimilatieproducten zodat de osmotische gradiënten in balans blijven. Nadat het floëem geladen is, moeten de fotosyntheseproducten nog een lange weg afleggen alvorens deze ontladen worden en terecht komen in hun ‘sink’.

De heersende klimaatsveranderingen hebben ook hun effect op het floëemtransport. Een verhoogde CO₂ concentratie zorgt voor een negatief effect op het enzym ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) (Galmes, 2013). De activiteit van RuBisCO daalt tot 50% bij verhoogde CO₂ concentraties, maar toch wordt er een verhoogde assimilatie rate *A* waargenomen en dus een verhoogd floëemtransport. Dit wijst er op dat er nog andere enzymen in de Calvin-cyclus verantwoordelijk zijn voor het behoud van de fotosynthese. Droogte heeft bij planten niet direct een effect op de vegetatieve groei maar eerder op de reproductieve organen (Lemoine *et al.*, 2013).

2.2.4. Respiratie

Respiratie is het proces waarbij de suikers afkomstig van het fotosyntheseproses worden afgebroken. De CO₂ moleculen die hierbij vrijkomen, dienen als bouwstenen voor andere biosyntheseprocessen. Ook ATP moleculen worden hierbij vrijgesteld, die gebruikt kunnen worden voor de opbouw van plantenweefsels. De energie kan op verschillende manieren worden vrijgesteld. In het glycolyseproces wordt één sucrose omgezet naar twee pyruvaat moleculen waarbij twee ATP's gegenereerd worden. Indien dit plaatsvindt in aerobe omstandigheden zullen de pyruvaat moleculen naar de Krebs-cyclus in de mitochondriën worden gebracht waar ze worden omgezet tot CO₂ en verschillende energiedragers worden geleverd (GTP, NADPH, FADH₂). De totale energie gecreëerd door de Krebs-cyclus is equivalent aan 38 ATP moleculen (Madigan *et al.*, 2012). Indien er anaerobe omstandigheden heersen vindt fermentatie plaats, hier zal het pyruvaat worden omgezet naar ethanol. Dit proces levert veel minder bruikbare energie dan de Krebs-cyclus. Een tweede weg is de oxidatieve pentosefosfaatweg. 5-20% van de verademing van suikers zou via deze manier verlopen (Taiz en Zeiger, 2006).

2.3. FRACTIONATIE

2.3.1. Algemeen

Koolstof beschikt over 2 stabiele isotopen, ¹²C en ¹³C, welke over 6 protonen en respectievelijk 6 en 7 neutronen beschikken (McCarroll & Loader, 2004). Hierdoor ontstaat er een verschil in massa tussen beide isotopen. De verhouding van ¹³C ten opzichte van ¹²C kan worden uitgedrukt als de δ-notatie (‰), het percentage relatief ten opzichte van de internationale standaard ‘Vienna Pee Dee Belemnite’ (VDPB). De berekening van de isotopenverhouding wordt gedaan via onderstaande formule:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{staal}}}{R_{\text{standaard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2)$$

waarbij R de ratio ¹³C/¹²C is van het bestudeerde staal ten opzichte van de standaardwaarden.

De koolstof isotopenanalyse $\delta^{13}\text{C}$ werd voor het eerst geïntroduceerd in de jaren '80 (Farquhar *et al.*, 1982). Enige tijd later werd ook de zuurstof isotopenanalyse $\delta^{18}\text{O}$ geïntroduceerd. Volgens Ferrio en Voltas (2004), is de relatie tussen zuurstof isotopen en klimaatvariabelen minder duidelijk. Zij stellen dat $\delta^{18}\text{O}$ uit plantenweefsels vooral de variatie in $\delta^{18}\text{O}$ van bronwater reflecteert. Tevens geeft het ook de evaporatieve aanrijking van het water in het blad door transpiratie en de biochemische fractionatie gedurende de synthese van organisch materiaal weer (Yakir, 1992, Farquahar & Llyod, 1993). Algemeen is $\delta^{18}\text{O}$ van bronwater vooral afhankelijk van regenwater. Wat op zijn beurt sterk bepaald wordt door de temperatuur van de druppel, waarbij $\delta^{18}\text{O}$ recht evenredig is met de temperatuur. Een analyse op zuurstof isotopen levert dus voornamelijk info over de waterstatus van de boom. Eén van de belangrijkste conclusies uit de resultaten van Ferrio en Voltas, was dat het signaal van $\delta^{18}\text{O}$ in precipitatie wordt overschaduwed door de grote variabiliteit in aanrijking van bladtranspiratie. Daarom is het nuttig om ook een analyse op koolstofisotopenanalyse uit te voeren. Volgens Y.Gori *et al.*, is analyse op zuurstof vooral nuttig voor informatie over het klimaat, ondermeer de correlatie met de temperatuur. $\delta^{18}\text{O}$ waarden geven ook meer correlatie met de gemiddelde jaartemperatuur tijdens het groeiseizoen (lente en zomer), dan op andere momenten tijdens het jaar. Ferrio en Voltas (2004) raden aan om een gecombineerde analyse uit te voeren, waarbij zowel C als O in rekening worden gebracht, omdat er weinig correlatie is tussen beide en omdat ze andere informatie leveren over de correlatie met de klimaatvariabelen.

Aangezien in ons onderzoek de vereiste meetdata om een analyse op zuurstof te doen niet beschikbaar was, werd enkel voor koolstof gekozen. Het voordeel is dat met deze analyses de ogenblikkelijke WUE kan worden berekend over een grotere tijdsreeks in tegenstelling tot de integrale WUE, waarbij de bekomen WUE wordt gedomineerd door de waarde waarvan de stomata het meest geopend zijn. Met deze technieken is het mogelijk om historische data te bekomen van ondermeer jaarringen.

Voor atmosferische lucht wordt een $\delta^{13}\text{C}$ -waarde van -8‰ (VPDB) bekomen, relatief ten opzichte van de standaardwaarden. In bomen levert dit veel lagere waarden op, -20 tot -30‰, wat dus bijgevolg aantoont dat er een discriminatie optreedt ten aanzien van ^{13}C in bomen. De verandering in isotopenratio vanaf de bron tot een bepaald product, wordt 'fractionatie' genoemd. Deze waarde wordt beïnvloed door de stomatale geleidbaarheid en de snelheid van fotosynthese.

Stomata zijn gelokaliseerd in de epidermis van bovengrondse plantenorganen, zoals bladeren. Via deze openingen in het blad kan lucht binnendringen en CO_2 via diffusie in oplossing gaan. Deze moleculen worden door fotosynthetische enzymen die zich bevinden in de chloroplasten omgezet tot suikers. Een eerste vorm van discriminatie vindt hierbij plaats doordat de lichtere CO_2 -moleculen mobieler zijn dan de zwaardere ^{13}C -bevattende CO_2 -moleculen en bijgevolg makkelijker overgaan tot diffusie. Stomatale geleidbaarheid wordt hoofdzakelijk beïnvloed door het aantal epidermale poriën en de ruimtelijke dimensies ervan. De dynamische eigenschappen van stomata geven het blad de mogelijkheid om controle te hebben over de CO_2 -influx en water-efflux. Zo zullen stomata zich openen in fysiologisch goede condities om zo de diffusie van CO_2 in de bladeren toe te laten en de fotosynthese te bevorderen. Zoals reeds eerder vermeld, kunnen ze echter ook sluiten om zo waterverlies te beperken opdat uitbundige dehydratatie, en bijgevolg verminderde fotosynthese capaciteit, kan worden tegengegaan (Farquhar and Sharkey, 1982). Dit impliceert dat de diffusie van CO_2 bemoeilijkt zal worden wanneer er enerzijds weinig water

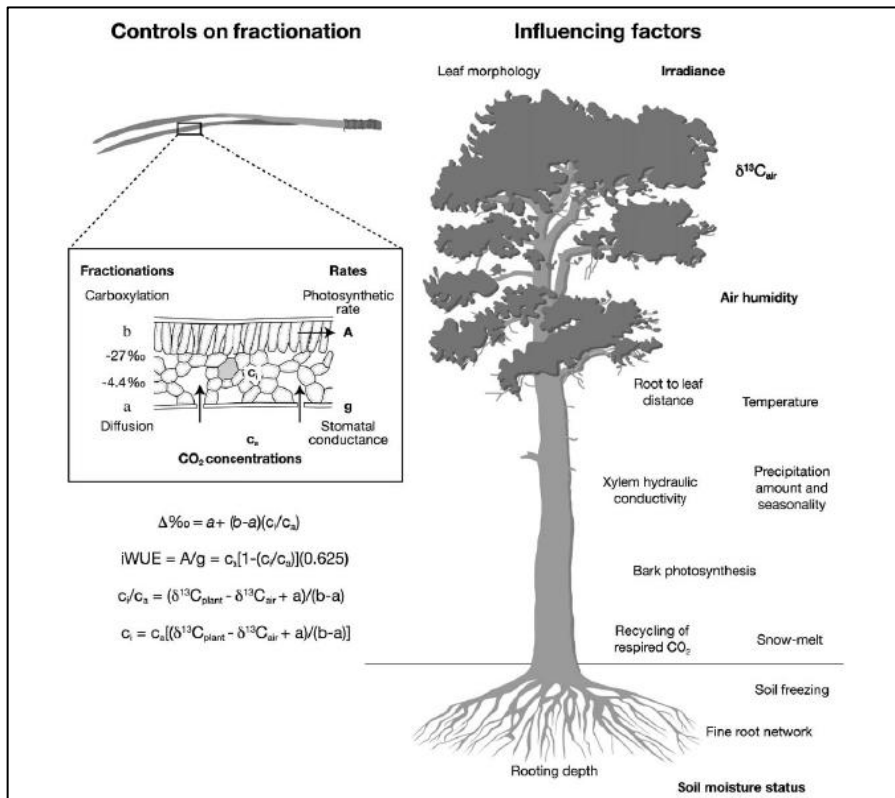
voorhanden is in de bodem en anderzijds wanneer de atmosferische vraag naar water hoog is (Marshall & Waring, 1984). Zoals reeds eerder vermeld, vindt er discriminatie plaats tijdens dit diffusieproces ten voordele de lichtere CO₂-moleculen wat resulteert in een interne verarming aan ¹³C.

Een tweede vorm van discriminatie is te wijten aan RuBisCO, het sleutelenzym tijdens de fotosynthese. RuBisCO of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase verzorgt ondermeer de carboxylatie van ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) ter vorming van een C₆-suiker dat onmiddellijk zal uiteenvallen in twee identieke C₃-suikers, 3-fosfoglyceraat (PGA) (Farquhar & Lloyd, 2008). Hierbij is er een preferentie van RuBisCO voor de inbouw van ¹²C, vandaar de zogenaamde 'fractionatie door carboxylatie'.

Fractionatie ten gevolge van respiratie behoort tot de post-carboxylatie fractionatie en is dus geassocieerd met de metabolische 'pathways' na de RuBisCO-carboxylatie. Bijgevolg heeft de post-carboxylatie fractionatie een verschillende $\delta^{13}\text{C}$ in de diverse plantenorganen (Cernusak *et al.*, 2009). Fractionatie ten gevolge van respiratie heeft te maken met het feit dat de $\delta^{13}\text{C}$ van CO₂ sterk afhankelijk is van de intra-moleculaire positie van het koolstofatoom dat gebruikt wordt tijdens de decarboxylatie (Brüggemann *et al.*, 2011). Afhankelijk van de 'pathway' die gevolgd wordt tijdens de decarboxylatie zal er een interne verarming of verrijking zijn van ¹³C. Zo zal er bij de decarboxylatie van pyruvaat door het pyruvaat dehydrogenase complex relatief meer ¹³C-aangerijkt CO₂ worden gevormd in vergelijking met het respiratorisch substraat, terwijl er bij de pentose fosfaat 'pathway' echter relatief meer ¹³C-verarmd CO₂ gevormd in vergelijking met het respiratorisch substraat.

2.3.2. Controlerende factoren

De mate van fractionatie wordt hoofdzakelijk bepaald door de stomatale geleidbaarheid en de fotosynthesesnelheid. Het is moeilijk om aan te geven van wat deze twee sleutelprocessen exact afhankelijk zijn aangezien dit telkens zou leiden tot een te grote simplificatie (Figuur 3). Toch kan worden gesteld dat de relatieve luchtvochtigheid en de vochtigheid van de bodem de dominerende factoren zijn voor de stomatale geleidbaarheid. De fotosynthesesnelheid wordt voornamelijk gecontroleerd door de temperatuur en instraling (McCarroll & Loader, 2004). Hieronder worden enkele controlerende factoren in meer detail besproken.



Figuur 3:
 Schema die de verschillende factoren weergeeft die een invloed hebben op de koolstofisotopen fractionatie en de omgevingsfactoren die deze beïnvloeden.
 (McCarroll, D. & Loader, N.J., 2004)

2.3.2.1. Temperatuur

‘Vapour pressure deficits’ (vpd) kan gedefinieerd worden als het verschil tussen de vochthoeveelheid in de lucht en de vochthoeveelheid die de lucht onder gesatureerde omstandigheden kan bevatten. Vermits hogere temperaturen leiden tot een hogere vpd zal de plant hierop reageren door de stomata te sluiten. Hierdoor daalt c_i (Brienen *et al.*, 2010) en wordt $\delta^{13}\text{C}$ meer negatief. Anderzijds zorgt een stijgende temperatuur ervoor dat de viscositeit van water daalt. Hierdoor zal het watertransport van de bodem naar de evaporatieplaatsen in de bladeren verhogen, waardoor de stomatale geleidbaarheid en diffusie van CO_2 in de bladeren toeneemt. Dit resulteert in een hogere c_i/c_a (Roderick & Berry, 2001).

2.3.2.2. Instralning

Planten die blootgesteld worden aan lage fotonenflux-densiteiten vertonen hogere c_i/c_a en vervolgens ook een hogere $\Delta^{13}\text{C}$ (Ehleringer *et al.*, 1986). $\Delta^{13}\text{C}$ elimineert het effect van de atmosferische CO_2 concentratie (c_a) aangezien deze niet stabiel is doorheen de tijd. Een hogere c_i/c_a en vervolgens ook een hogere $\Delta^{13}\text{C}$ worden geassocieerd met een lagere fotosynthesesnelheid (Ehleringer *et al.*, 1986). Wanneer de fotonenflux-densiteiten echter hoger zijn dan $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ is de c_i/c_a onafhankelijk van de irradiatie. In dit geval kan $\Delta^{13}\text{C}$ echter nog steeds dalen door een toename van de fotosynthese aangezien er hierbij een afname is van c_i naar c_c (de CO_2 -molfracties ter hoogte van de carboxylatie-plaatsen). Het effect van schaduw zorgt ervoor dat $\delta^{13}\text{C}$ bij alleenstaande bomen hoger is (minder negatief) dan bij bomen in een bos (Koch *et al.*, 2004). De exacte invloed van instralning is echter moeilijk in te schatten aangezien het niet makkelijk is om dit te scheiden van andere factoren, zoals ondermeer het effect van de C-isotopencompositie in de lucht.

2.3.2.3. Boomhoogte

Door waterstress zal de stomatale geleidbaarheid verminderen, waardoor de CO₂ concentratie in de bladeren daalt. Deze daling zorgt ervoor dat de mate van enzymatische discriminatie ten opzichte van ¹³CO₂ eveneens afneemt. Dit resulteert in een minder negatieve Δ¹³C waarde. De waterstress is bij toenemende boomhoogte enerzijds het gevolg van de dalende waterpotential en anderzijds het gevolg van de stijgende weerstand die de waterflux ondervindt (Koch *et al.*, 2004). De hiermee geassocieerde daling van de stomatale geleidbaarheid, waardoor de fotosynthese wordt belemmerd, wordt echter deels tegengewerkt doordat de verhouding van watergeleidend weefsel ten opzichte van bladoppervlakte verhoogt, waardoor er meer water potentieel ter beschikking is (McCarroll & Loader, 2003).

2.3.2.4. Boomleeftijd

Vaak wordt in dergelijke onderzoeken het juveniel effect vermeld omdat door schaduweffecten en verschil in groeiomstandigheden fysiologische parameters verschillend kunnen zijn tijdens de juveniele fase ten opzichte van de latere levensstadia. Dit is vooral te wijten aan het feit dat bomen het CO₂ dat niet werd gebruikt door bovenliggende vegetatielagen kunnen ‘recycleren’. Dit kan zich uiten op verschillende manieren en bij dit onderzoek potentieel ook op het δ¹³C gehalte in de jaarringen. Zoals hieronder toegelicht wordt, zal er tijdens de juveniele fase een hogere δ¹³C waargenomen worden, wat overeenkomt met een lagere WUE_i. Door deze afwijkende parameters kunnen de data tot een foute interpretatie leiden indien hiervoor niet gecorrigeerd wordt. Wat de fenomenen zijn die de grootste verschillen in de parameters veroorzaken en welke mechanismen er schuilgaan achter het juveniel effect zijn echter nog niet volledig opgehelderd en moeten nog verder onderzocht worden. Algemeen worden er echter 3 fenomenen aangehaald met betrekking tot het juveniel effect die veranderingen in de WUE_i kunnen veroorzaken.

Ten eerste zullen bomen die dichter tegen het bodemoppervlak groeien meer lucht van hogere lagen, die een lager gehalte aan ¹³C bevat, gebruiken (Schleser & Jayasekera, 1985). Dit effect is echter in grote mate beperkt tot de laagste plantlagen in bossen en dus weinig waarschijnlijk om in latere levensstadia significante wijzigingen te induceren met betrekking tot parameterwaarden. Enige tijd later, werd er echter weerlegd dat de recyclage van lucht een groot effect kon hebben, zelfs in tropische wouden (van der Merwe & Medina, 1991). In dergelijke wouden is de dichtheid aan boomsoorten en de kans dat lucht gerecycleerd wordt nogtans veel groter omdat het in veel gevallen onmogelijk gemaakt wordt door een (matige) doorlatendheid van het bos en zo de circulatie van lucht hierdoorheen op lager niveau voorziet. Cernusak *et al.* (2001) stelden vast dat de geobserveerde hoogtegradiënt in ¹³C te verklaren is door de dalende bijdrage van fotosyntheseproducten van de stam. Aangezien namelijk de stam dikker wordt en de hoeveelheid licht die opgevangen wordt daalt naarmate de boom ouder wordt, mindert het aandeel van de fixatie van gerecycleerd CO₂ door de stam (McCarroll & Loader, 2004).

Ten tweede is ook het effect van schaduwgroei belangrijk, wat eveneens een verandering in het microklimaat veroorzaakt. In natuurlijke vegetaties is deze factor niet te verwaarlozen en zal dit significante verschillen geven in bossen die een grote dichtheid en sterke gelaagdheid hebben en waarbij de onderzochte soorten geen deel uitmaken van de hoogste lagen van het bos.

Een derde mogelijkheid is het verschil in hydraulische geleidbaarheid van grond naar blad naarmate de bomen groter en ouder worden (Ryan & Yoder, 1997). Dit zou een wezenlijk verschil kunnen geven. Net zoals in vorige onderzoeken is het echter moeilijk hiervoor bewijs te leveren. In het geval dat een significant verschil verondersteld wordt, zou het effect niet sterk genoeg zijn in vergelijking met de invloed van de hogere CO₂ concentratie, wat dus als dominante factor mag beschouwd worden (Brienen *et al.*, 2010; McDowell *et al.*, 2002).

2.3.3. Farquhar-vergelijking

2.3.3.1. Farquhar-vergelijking zonder correctie

De koolstof isotopenratio's kunnen gebruikt worden als proxy voor de WUE_i aangezien beide gecontroleerd worden door de stomatale geleidbaarheid en de fotosynthesesnelheid.

De WUE_i kan via deze relatie als volgt worden berekend:

$$WUE_i = \frac{A}{g_w} \quad (3)$$

Hierbij is $g_w = 1.6 g_c$ en $A = g_c (c_a - c_i)$ (Wet van Fick), wat resulteert in:

$$WUE_i = A/g_w = c_a * [1 - (c_i/c_a)] * 0.625 = c_a * (b - \Delta^{13}C) / 1.6 * (b - a) \quad (4)$$

waarbij A staat voor de opname van koolstof doorheen de stomata via diffusie en g_w en g_c respectievelijk de stomatale geleidbaarheid van waterdamp en CO₂ voorstellen (Brienen *et al.*, 2010). De constante waarden a en b zijn respectievelijk 4,4 ‰ en 27 ‰. De waarde a verwijst hierbij naar de tragere diffusie van ¹³CO₂ doorheen stomata, relatief uitgedrukt ten opzichte van de diffusie van ¹²CO₂. De waarde b daarentegen representeert de discriminatie voor ¹³C door RuBisCO tijdens de carboxylatie (Farquhar *et al.*, 1982, Brienen *et al.*, 2010). Formule (4) maakt gebruik van $\delta^{13}C$ in jaarring-cellulose (Farquhar *et al.*, 1982). De atmosferische CO₂ concentratie (c_a) is echter niet stabiel doorheen de tijd. Daarom werd geopteerd om bij de berekeningen een oude concentratie te gebruiken als referentiewaarde. Deze waarde, verkregen uit Keeling *et al.* (2009), bedroeg 315.98 ppmv in 1959.

Vervolgens kan men c_i en WUE_i bepalen aan de hand van de Farquhar-vergelijking:

$$\Delta^{13}C (\text{‰}) = a + (b - a) * c_i/c_a \quad (5)$$

met de constante waarden a en b , respectievelijk 4,4 ‰ en 27 ‰.

2.3.3.2. Farquhar-vergelijking met correctie

Recent werd er een ternaire correctie toegepast op de eerder vernoemde Farquhar-vergelijking (Farquhar & Cernusak, 2012). Deze ternaire correctie houdt rekening met de invloed van transpiratie op de diffusie van CO₂ tussen de atmosfeer en de intercellulaire ruimtes. De term 'ternair' refereert naar de 3 gassen die betrokken zijn tijdens dit proces: CO₂, O₂ en waterdamp. Indien de transpiratie in rekening wordt gebracht tijdens de berekeningen, blijkt echter dat c_i in

realiteit 1-2‰ lager is dan wanneer deze factor genegeerd wordt. Het model waarin de ternaire correctie wordt toegepast ziet er als volgt uit (Farquhar & Cernusak, 2012):

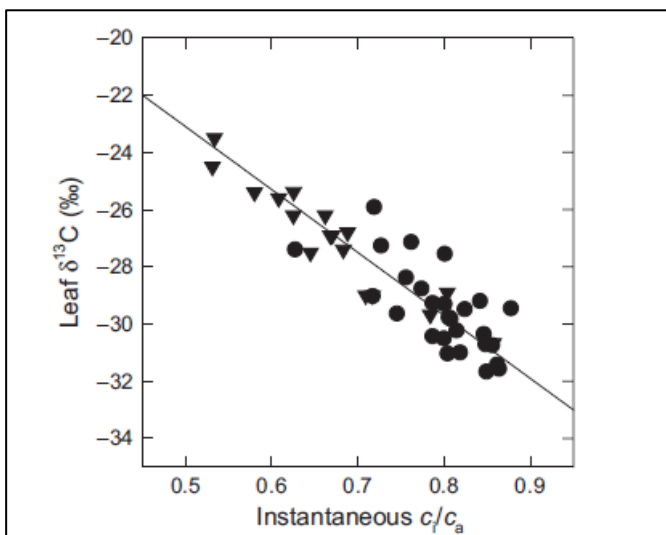
$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \frac{1}{1-t} \left(a_b \frac{c_a - c_s}{c_a} + a_s \frac{c_s - c_i}{c_a} \right) + \frac{1+t}{1-t} \left(a_m \frac{c_i - c_c}{c_a} + b \frac{c_c}{c_a} - \frac{\alpha_b}{\alpha_e} e \frac{R_d}{V_c} \frac{c_c}{c_a} - \frac{\alpha_b}{\alpha_f} f * \frac{\Gamma^*}{c_a} \right) \quad (6)$$

Hierbij is t de ternaire correctiefactor, welke gegeven wordt door $t = \frac{\alpha_a c E}{2 g a_c}$. a_b staat voor de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionatie voor CO_2 -diffusie doorheen de grenslaag (2.8‰), a_s representeert de diffusie doorheen de stomata (4.4‰) en a_m staat voor de diffusie en oplossing van de intercellulaire lucht naar de carboxylatieplaatsen in de chloroplasten (1.8‰). De b -term stelt de fractionatie door carboxylatie voor welke voornamelijk door RuBisCO gebeurt in C_3 -planten (29‰). Verder geven e en f de fractionatie gedurende dagrespiratie en gedurende fotorespiratie, respectievelijk, weer. R_d staat voor de snelheid van dagrespiratie, V_c staat voor de snelheid van RuBisCO-carboxylatie en Γ^* representeert het CO_2 -compensatiepunt bij afwezigheid van de dagrespiratie. c_a , c_s , c_i en c_c zijn de CO_2 -molfracties in de omringende lucht, bij het bladoppervlak, in de intercellulaire luchtruimtes en bij de carboxylatie-plaatsen, respectievelijk. De termen α_b , α_e en α_f worden gegeven door $1+b$, $1+e$ en $1+f$, respectievelijk.

Wanneer men enkel rekening houdt met de effecten ten gevolge van stomatale geleidbaarheid en carboxylatie kan vergelijking (6) worden vereenvoudigd tot de eerder genoemde welgekende vorm:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = a + (b-a) * c_i/c_a \quad (5)$$

Deze vereenvoudiging houdt stand wanneer c_a relatief constant is en vereist dat er gewerkt wordt met boomsoorten die een lange vegetatieve fase hebben. Deze assumpties in rekening gebracht, geeft Figuur 4 een illustratie van de correctheid van deze vereenvoudiging (Orchard *et al.*, 2010). Het berekenen van een geometrisch gemiddelde zorgt voor volgende vergelijking: $\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = -12.1 - 22.0 c_i/c_a$. Het gebruik van de vereenvoudigde vergelijking levert ons echter: $\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = -12.4 - 22.6 c_i/c_a$, waarbij gebruik werd gemaakt van $a = 4.4\text{‰}$, $b = 27\text{‰}$ en $\delta^{13}\text{C}_{\text{atmosfeer}} = -8\text{‰}$. Op die manier bekomt men voor $\Delta^{13}\text{C}$ dus een verschil van 1-3‰, terwijl dit slechts 0.6‰ is indien men kijkt per soort.



Figuur 4: Blad koolstofisotopenratio ($\delta^{13}\text{C}$) geplot tegenover de ratio van de intercellulaire en atmosferische- CO_2 -molfracties (c_i/c_a) gedurende fotosynthese. Elk datapunt stelt het gemiddelde voor van verschillende individuen van een soort. De rechte is de regressie van het geometrisch gemiddelde: $\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = -12.1 - 22.0 c_i/c_a$ (Cernusak *et al.*, 2013)

In de meeste onderzoeken waarbij er berekeningen worden gedaan die uitgaan van een normale gas-uitwisseling zal de ternaire correctie niet opgenomen vanwege te kleine verschillen in de resultaten. Indien men echter streeft naar een grotere accuraatheid en consistentie wordt er geopteerd om de ternaire correctie op te nemen in de vergelijking (Farquhar & Cernusak, 2012).

3. MATERIALEN EN METHODE

3.1. STUDIEGEBIED

Deze studie werd uitgevoerd op stamschijven afkomstig uit het UNESCO ‘Man and Biosphere’ reservaat in Yangambi (N00°46'53'';E24°29'10''), ongeveer 100 km ten westen van Kisangani, D.R. Congo (Figuur 5 en Figuur 6). Het reservaat bestrijkt een oppervlak van 6.297 km² (Ebuy *et al.* 2011), ten noorden van de Congo rivier. Alle studiegebieden liggen in het Zuid-Westelijk en Noord-Westelijk gedeelte van het reservaat, op 447 m boven het zeeniveau (Kearsley *et al.*, 2013). De regio heeft een Af-type tropisch bos (Peel *et al.*, 2007) (volgens de Köppen-classificatie), of anders gezegd een tropisch regenwoud klimaat. Dit houdt in dat gedurende het hele jaar de gemiddelde neerslag minimum 60 mm bedraagt. Dit klimaat heerst normaal binnen een breedteligging van 5-10°, tot zelfs 25°. De gebieden met dit klimaat worden gedomineerd door de intertropische convergentiezone (ITCZ), waardoor het geen natuurlijke seizoenen kent.

Uit de metadata, beschikbaar gesteld door I.N.E.R.A. (‘l’Institut de l’Environnement et de Recherches Agricoles’), bleek dat de gemiddelde jaarlijkse neerslag in het onderzochte gebied 1860 mm per jaar met een standaardafwijking van 328,3318 mm bedroeg. Het gebied ondervindt gedurende het jaar verschillende intensiteiten aan regen, vandaar dat er een nat (augustus tot en met november) en droog (december tot en met februari) seizoen kan worden onderscheiden. De grens voor een droog seizoen werd gelegd bij 150 mm neerslag per seizoen. Bodems in de YGB plateau zijn ferrasols, voornamelijk gevormd uit eolische sedimenten, die hoofdzakelijk bestaan uit kwartszand, kaoliniet klei en gehydrateerde ijzer-oxides (Kearsley, 2010-2011, Gilson *et al.*, 1956, Van Ranst *et al.*, 2010). De vegetatie in het reservaat wordt gekenmerkt door dat van een vochtig semi-loof regenwoud, met fragmenten van vochtig en altijdgroen regenwoud, overgangsbos, landbouwgrond, braakland en moerasbos.

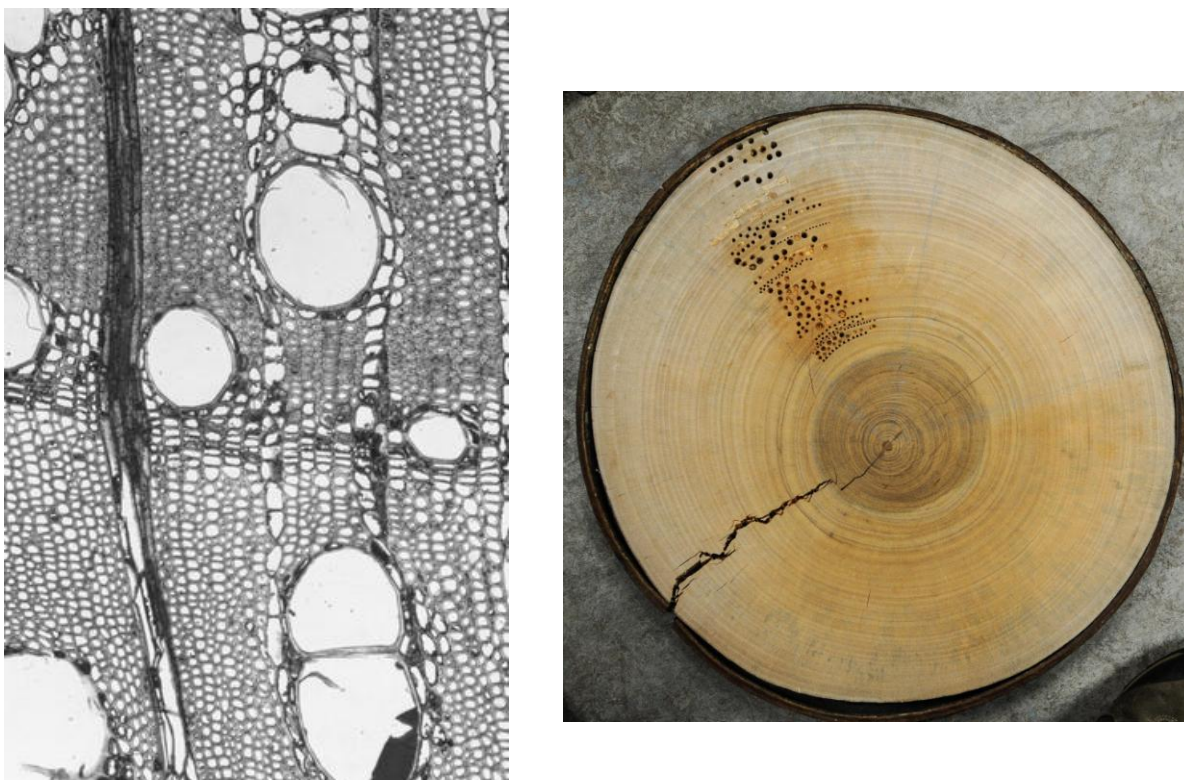
De stamschijven gebruikt voor dit onderzoek werden verzameld in plantages in het reservaat in Yangambi die meer dan 80 jaar geleden aangeplant werden (de exacte datum werd ons niet doorgegeven), toen er nog sprake was van het ‘Belgisch Congo’. Het gaat dus om gelijkjarige bestanden. De stamschijven werden gekapt in september 2013 en opgestuurd naar België, in samenwerking met Koninklijk Museum voor Midden-Afrika (KMMA). Dit onderzoek focust op drie verschillende stamschijven van dezelfde boomsoort, namelijk *Entandrophragma angolense* (Welw.) C. DC.. Deze soort werd geselecteerd om onderzoek op te voeren aangezien het één van de weinige tropische bomen is die jaarringen produceert (Groenendijk *et al.*, 2014). Aangezien de stalen werden verzameld uit een plantage die gelijktijdig werd aangeplant, zullen de bomen aan een gelijkmatige snelheid gegroeid hebben en zal de hoogte van de bovenste vegetatielaag gelden voor het merendeel van het bos. Hierdoor zal de CO₂ recyclage beperkt gehouden worden en het juveniel effect bij deze plantages verwaarloosbaar zijn.

bladverliezend voor een korte periode op het einde van het grote droogseizoen (eind januari - februari) (Kearsley *et al.* unpublished data).

Het hout heeft een medium gewicht, met een dichtheid van 510–735 kg/m³ bij een vochtgehalte van 12%. Het belangrijkste kenmerk bij deze soort is dat er uitgesproken jaarringen aangemaakt worden. Het hout is diffuus poreus en de gemiddelde tangentiale diameter van de vaten ligt minimum tussen 100 en 200 µm (A.T. Tchinda (2008), Prota Dataset, Geraadpleegd op 8 mei 2014, <http://www.prota4u.org/protav8.asp?h=M4&t=Entandrophragma,angolense&p=Entandrophragma+angolense#Synonyms>).

3.3. STAALNAME

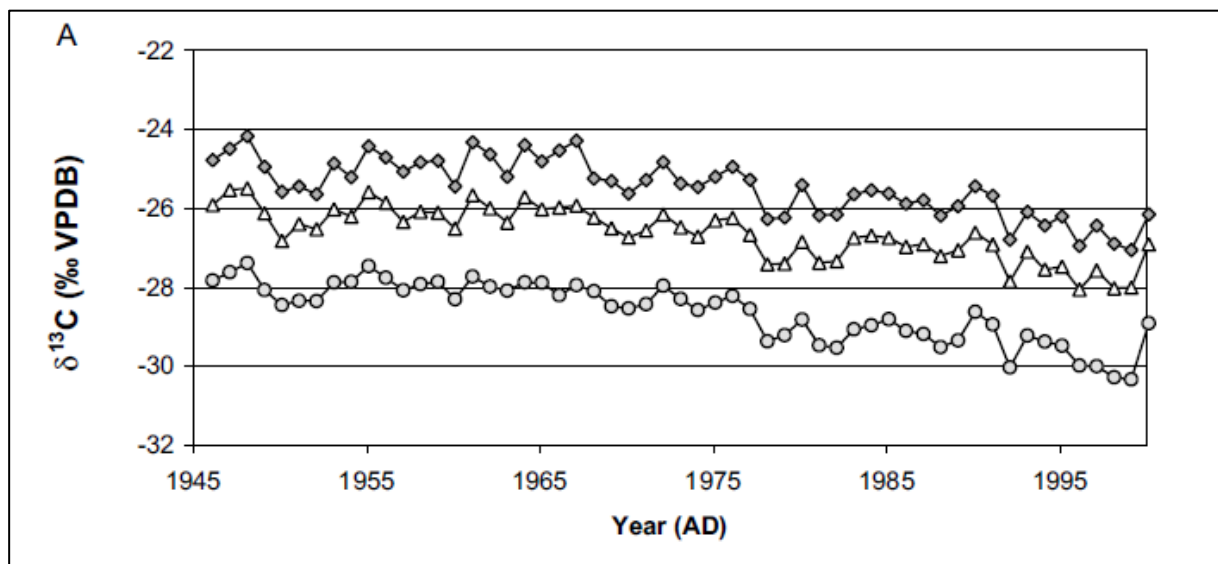
Er werden drie stamschijven onderzocht (Figuur 7). In het labo werden, per stamschijf en per jaarring, de stalen verzameld met behulp van een handboor en een beitel. Telkens werd de volledige breedte van de jaarring geëxtraheerd opdat het staal representatief zou zijn voor het hele groeiseizoen. Om contaminatie met de jaarring van het daaropvolgende jaar te vermijden, werd er extra precies gewerkt ter hoogte van de overgang tussen de jaarringen. Elk houtstaal werd met een pincet uit de boor gehaald en in een capsule geplaatst. Als er een nieuw staal werd genomen, werden zowel de boor als het pincet vooraf ontsmet met ethanol om contaminaties met het vorige staal te vermijden. De hele procedure van staalname werd in beeld gebracht en is terug te vinden in de Bijlage van Figuur I tot en met Figuur VI.



Figuur 7: (links) Foto van een coupe waarop de jaarringen te zien zijn (Coupe cross section, InsideWood. 2004-onwards. Published on the Internet. <http://insidewood.lib.ncsu.edu/search> [date of accession] en Wheeler, E.A. 2011. InsideWood). (rechts) Foto toont één van de drie boomschijven die gebruikt werd voor staalname. Er zijn reeds boorgaten gemaakt (Eigen fotomateriaal).

3.4. CELLULOSE-EXTRACTIE

Om een representatief beeld te krijgen van de isotopenverhouding in de jaarringen werd er enkel gewerkt met de cellulose-fractie van het hout. De preferentie voor het gebruik van cellulose is er vanwege verschillende redenen en werd ook teruggevonden in voorgaande studies (Gori *et al.*, 2012; McCarroll & Loader, 2004; Hietz *et al.*, 2005). De koolstof die wordt opgenomen door de boom zal deels via respiratie terug overgaan naar de atmosfeer, deels worden ingebouwd in niet-structurele elementen en deels worden ingebouwd in structurele elementen, waaronder cellulose en lignine (Cernusak *et al.*, 2013). Lignine en cellulose hebben hun individuele synthese 'pathway' en een eigen isotopensamenstelling. Gleixner *et al.* (1993), Gori *et al.* (2012) en Ferrio & Voltas (2004) rapporteren dat $\delta^{13}\text{C}$ in lignine 2-5‰ lager ligt dan in cellulose, of dus: lignine is isotopisch lichter. Er is in lignine dus een sterkere discriminatie ten opzichte van ^{13}C in vergelijking met cellulose. Volledige houtstalen leveren voor $\delta^{13}\text{C}$ sterkere negatieve waarden op ten opzichte van cellulose, namelijk een verschil van ongeveer 0.9‰ tot 1.5‰ (Figuur 8) (Loader *et al.*, 2003). Verder kan cellulose gemakkelijk gelinkt worden aan een specifieke groeiperiode aangezien deze celwandcomponent het cellulaire netwerk vormt van de jaarringen. Bijgevolg geeft dit de beste weerspiegeling van de isotopensamenstelling van de primaire fotosynthese-producten (Hietz *et al.*, 2005).



Figuur 8: Koolstof-isotopentijdsreeks 1946 – 2000. Cellulose = grijze vierkanten; volledige houtstalen = witte driehoeken; lignine = grijze cirkels (Loader *et al.*, 2003)

De belangrijkste reden echter om voor cellulose te kiezen is echter dat er interannueel, tussen de verschillende jaren onderling, problemen kunnen voorkomen door verschillen in de lignine:cellulose-ratio. Dit komt voort uit het feit dat cellulose sneller afbreekt dan lignine waardoor de finale isotopenratio van het hout zal wijzigen (Suberkropp & Klug, 1976; Spiker & Hatcher, 1987; Schleser *et al.*, 1999). Dit probleem kan omzeild worden door gebruik te maken van een cellulose-extractie. Hierdoor wordt een grotere homogeniteit verkregen (Loader *et al.*, 1995; Switsur *et al.*, 1995; Schleser *et al.*, 1999). Desalniettemin zijn er gelijkaardige trends terug te vinden voor zowel de isotoop-tijdsreeks als de relatie met het klimaat wanneer er gebruik wordt gemaakt van het volledige houtstaal of enkel van cellulose (McCarroll & Loader, 2004). Toch worden er via het gebruik van cellulose sterkere en minder variabele relaties gevonden dan

wanneer er gebruik wordt gemaakt van het volledige houtstaal. Dit is te wijten aan de sterk variabele compositie en concentratie van lignine tussen de verschillende jaarringen. Wanneer het onderzoek focust op lange termijn-trends volstaat het gebruik van het volledige houtstaal als proxy voor het klimaat en is de arbeidsintensieve cellulose-extractie niet noodzakelijk. Indien men echter interesse heeft in interannuele verschillen is het aangeraden om het cellulose te extraheren (Cullen *et al.*, 2008).

De cellulose-extractie is een cruciale stap in het hele procedé en werd uitgevoerd aan het ISOFYS labo van Universiteit Gent, gebaseerd op een protocol dat opgesteld werd door dr. Koen Hufkens in samenwerking met dr. Gerhard Helle aan GFZ Potsdam. De houtstalen werden hiertoe eerst versneden met behulp van een scalpel opdat het contactoppervlak met de solventen groter zou worden. Uiteindelijk werden er stalen verkregen met een gewicht tussen 3 mg en 25 mg.

De cellulose-extractie bestaat uit twee grote stappen; de NaOH- en de NaClO₂-cyclus. De gehele procedure vindt plaats in een warmwaterbad op 60°C, waarin de stalen met behulp van glazen flacons en een glasfilter werden geplaatst (Figuur 9).



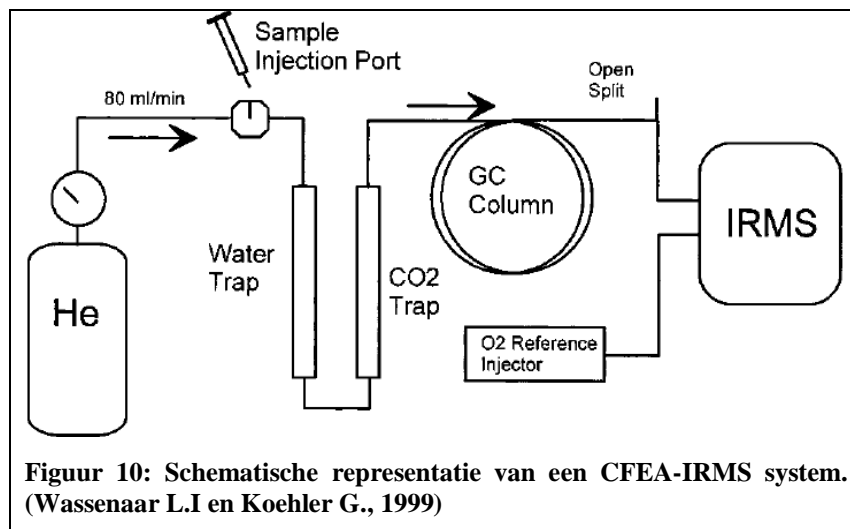
Figuur 9: Opstelling die de glasfilter in de glazen flacons weergeeft . De micropipet waarmee de oplossingen werden toegevoegd, is eveneens in beeld gebracht. De procedure werd uitgevoerd in een warmwaterbad bij 60°C (Eigen fotomateriaal).

Aan elk staal werd 5% NaOH-oplossing toegevoegd gedurende 6 cycli van elk 2u. Vervolgens werd de oplossing weggepompt en werden de stalen minstens 5 keer gewassen met kokend water, tot als de stalen pH-neutraal waren. De reactie die hierbij plaatsvond, zorgde ervoor dat het hars in het hout werd verwijderd. Vervolgens werd een 7,5% NaClO₂-oplossing, waarvan de pH werd aangepast tot 4-5 met azijnzuur, aan elk staal toegevoegd gedurende 4 cycli van elk 4u. Deze stap was essentieel om alle lignine en kleurstoffen te verwijderen. De stalen werden gewassen met kokend water tot een neutrale pH werd bekomen. Na voorgaande stappen was de extractie afgelopen en bleven witte stukjes cellulose over. De stalen werden gehomogeniseerd met behulp van een BRANSON sonische mixer opdat het staal representatief zou zijn voor de volledige

jaarring. Vervolgens werden de stalen gedroogd bij 75°C. Ter voorbereiding van de isotopenanalyse werden de stalen in tinnen bekertjes afgewogen op 1 ± 0.1 mg.

3.5. ISOTOPENANALYSE

De eigenlijke isotopenanalyse gebeurde met behulp van 'Continue Flow Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry' (CFEA-IRMS). De voorbereide stalen werden in een autosampler geplaatst en gezuiverd met helium (He) stroom in een verbrandingsbuis en pulsen van zuurstof (O_2), die tijdelijk het He-dragers gas vervingen. De verbrandingsbuis werd gevuld met Cr_2O_3 , een oxidatie katalysator, doorweeft met een CuO draad, om de koolwaterstoffen te oxideren, en Ag-wol om zwavel (S) en halogenen te vangen. Een temperatuur van ongeveer 1000°C verzekerde een oxidatie. De verbrandingsproducten werden in een reductiebuis geveegd (koperdraden van 600°C), waar NO_x gereduceerd werd tot N_2 , en een overvloed aan O_2 werd verwijderd. Een watertrap [$Mg(ClO_4)_2$] zorgde voor het verwijderen van overtollig water. Een gepakte GC-kolom verwijderde onzuiverheden en zorgde voor de scheiding van N_2 en CO_2 .



Een massaspectrometer (IRMS) zorgde voor ionisatie van gasmoleculen en scheiding van ionen in een spectrum volgens hun massa-tot-lading verhouding (m/z) met behulp van elektrische en magnetische velden. De relatieve verdeling van de moleculen met verschillende m/z werd gevonden door meting van de stromingen, veroorzaakt door de gescheiden ionenbundels. Een sterk vacuüm hield hierbij

de druk laag genoeg (10^{-5} mbar) om zo botsingen tussen de ionen en de achtergrondgassen tot een acceptabel niveau te reduceren. Een permanent magnetisch veld (gefixeerde B) werd gebruikt en massa's werden geselecteerd door variaties in sterkte van het elektrisch veld V.

Een universele *triple collector* werd gebruikt om B en V constant te houden voor elk element dat moest worden gemeten. Voor de ^{13}C metingen daalde de spanning van het elektrisch veld V en werden m/z 44, 45 en 46 (respectievelijk $^{12}C^{16}O_2$, $^{13}C^{16}O_2$ of $^{12}C^{16}O^{17}O$, $^{12}C^{16}O^{18}O$ of $^{13}C^{16}O^{17}O$ en $^{12}C^{17}O_2$) opgeslagen in drie gescheiden verzamelcups.

3.6. WATER USE EFFICIENCY

Het eigenlijke doel van dit onderzoek is om de WUE te bepalen aangezien de verhouding van gefixeerde koolstof tot waterverlies vergelijkbaar is met de koolstof isotoop discriminatie. Die discriminatie wordt gecontroleerd door de stomatale geleidbaarheid en snelheid van fotosynthese. De WUE werd bepaald aan de hand van onderstaande berekeningen.

Atmosferisch CO₂ bevat de natuurlijk voorkomende stabiele C-isotopen ¹²C en ¹³C voor 98.982% en 1.108%, respectievelijk (Staddon P.L., 2004). De chemische eigenschappen van ¹³CO₂ zijn identiek als deze van ¹²CO₂ maar door het kleine verschil in massa (2.3%), gebruiken planten minder ¹³CO₂ dan ¹²CO₂ aangezien de diffusie van de eerstgenoemde molecule naar de chloroplasten veel trager gebeurt. De standaard in de C-isotopenverhouding is de Pee Dee kalksteenformaties (PDB) in South Carolina (R = 0.011237 of 1.1237 atoom%). Negatieve waarden wijzen erop dat de planten minder ¹³C hebben dan de standaard.

De berekeningen zijn gebaseerd op de methode die gebruikt werd in het onderzoek beschreven in Brien *et al.*(2010). Er werd gestart met het berekenen van de cellulaire ratio van ¹³C ten opzichte van ¹²C, genoteerd als $\delta^{13}C_{cell}$.

$$\delta^{13}C_{cell} = \left(\frac{R_{staal}}{R_{standaard}} - 1 \right) \times 1000 \quad (7)$$

met R de ratio van ¹³C/¹²C van de stalen ten opzichte van de standaardwaarden. Aangezien bij de metingen direct $\delta^{13}C_{cell}$ werd bepaald, was het niet nodig om de ratio's te bepalen. De isotopen discriminatietheorie werd in rekening gebracht door c_i en WUE_i te berekenen. De sterkte van koolstof discriminatie door planten, $\Delta^{13}C$, werd berekend aan de hand van stabiele koolstofisotopen in het cellulose, $\delta^{13}C_{cell}$, met behulp van volgende formule:

$$\Delta^{13}C (\text{‰}) = (\delta^{13}C_a - \delta^{13}C_{cell}) / (1 + \delta^{13}C_{cell}/1000) \quad (8)$$

met $\delta^{13}C_a$ de isotopische waarde van atmosferisch CO₂, de input voor de plant.

Een probleem van de laatste twee eeuwen is het gebruik van isotopisch lichtere fossiele brandstoffen waardoor er een daling is van het zware ¹³CO₂ in de atmosfeer. Hier moet rekening mee gehouden worden. De gepubliceerde waarden van McCarroll en Loader (2003) werden hiervoor gebruikt (Bijlage, Tabel I). Meestal wordt voor dit probleem statistische 'de-trending' toegepast, maar dit kan echter niet het direct effect in afname van ¹³C/¹²C in rekening brengen, zoals in dit onderzoek wel het geval was. Omdat dit onderzoek over een langere tijdspanne liep en er nog te weinig zekerheid was over het effect van deze kleine en pre-industriële variaties, werd er gecorrigeerd voor de dalende trend in atmosferische ¹³C.

Tijdens de CO₂-fixatie bij C₃ planten treedt ook koolstof discriminatie op die lineair gerelateerd is aan de verhouding van intracellulaire tot atmosferische CO₂ concentratie, zoals weergegeven in vergelijking (9). Dit is de vereenvoudigde versie van vergelijking (8). Het gebruik van deze vereenvoudiging is verantwoord aangezien in ons onderzoek gebruik gemaakt wordt van materiaal afkomstig van bomen, die een lange vegetatieve fase hebben.

$$\Delta^{13}C (\text{‰}) = a + (b-a) * c_i/c_a \quad (9)$$

met c_i en c_a respectievelijk de intracellulaire en atmosferische concentratie van CO₂ en de eerder vernoemde constante waarden a en b, respectievelijk 4,4 ‰ en 27 ‰. Zoals reeds eerder vermeld, verwijst de waarde a hierbij naar de tragere diffusie van ¹³CO₂ doorheen stomata, relatief uitgedrukt ten opzichte van de diffusie van ¹²CO₂. De waarde b daarentegen representeert de

discriminatie voor ^{13}C door RuBisCO tijdens de carboxylatie (Farquhar *et al.*, 1982, Brienen *et al.*, 2010).

De enige onbekende tot hiertoe was c_i . Deze werd berekend door vergelijkingen 8 en 9 te combineren. De atmosferische CO_2 concentratie (c_a) is niet stabiel in de tijd. Daarom werd geopteerd om een oude concentratie te gebruiken als referentiewaarde bij de berekeningen. Deze waarde bedroeg 315.98 ppmv in 1959 (Keeling *et al.* 2009). Zoals reeds eerder vermeld, wordt de discriminatie bepaald door de stomatale geleidbaarheid (g) en de snelheid van fotosynthese (A). Met deze info werd de WUE_i als volgt gedefinieerd.

$$\text{WUE}_i = A/g_w = c_a * [1 - (c_i/c_a)] * 0.625 = c_a * (b - \Delta^{13}\text{C}) / 1.6 * (b - a) \quad (10)$$

Deze vergelijking werd bekomen door rekening te houden met de Wet van Fick: $A = g_c (c_a - c_i)$. Met vergelijking (10) was alleen info over stomatale controle op het waterverbruik ter beschikking gekomen, maar hierbij werd geen rekening gehouden met de evaporatie van de bomen. Alleen wanneer deze evaporatie in rekening werd gebracht, kon over een meting van werkelijke waterverliezen per eenheid geassimileerde koolstof worden gesproken. Een hogere waterdampspanningstekort rond de stomata leidt tot toename in evaporatie en resulteert in grotere waterverliezen, ook al blijven g_w en WUE_i constant.

De directe WUE kan gedefinieerd worden als de verhouding van assimilatie (A) en transpiratie (E).

$$E = v * g_w \quad (11)$$

met v het waterdampspanningstekort tussen blad (e_i) en atmosfeer (e_a), gedeeld door P , de atmosferische druk

$$v = (e_i - e_a) / P \quad (12)$$

Zo kon de directe WUE berekend worden:

$$A/E = \text{WUE}_i / v = (\text{WUE}_i * P) / (e_i - e_a) \quad (13)$$

Maar aangezien hierover geen gegevens beschikbaar waren, werd enkel WUE_i bepaald. Deze berekeningen werden aldus voor de drie stamschijven uitgevoerd. Vooraleer een gemiddelde van de drie waarden voor WUE_i (voor elke stamschijf één) werd genomen, diende de correlatie voor de WUE_i van de drie stamschijven voldoende hoog te liggen. Dit werd nagegaan met een Pearson correlatie, zowel voor WUE_i , c_i als voor $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$.

Vervolgens werd de link met de meteodata gelegd. De meteodata werd beschikbaar gesteld door I.N.E.R.A. De data met betrekking tot de neerslag loopt van 1931 tot en met 2012 en de data met betrekking tot de temperatuur en instraling loopt van 1951 tot 2013. De correlatie met regenval werd op verschillende manieren onderzocht, om te bekijken of er hogere correlatie is met jaarlijkse neerslag, kort of lang droog seizoen of kort of lang nat seizoen. De regenval data wordt dus onderverdeeld in: 'Totale jaarlijkse neerslag (met in maart de start van een jaarring)', 'Groot

nat seizoen (aug. - nov.)', 'Groot droog seizoen (dec. - feb.)', 'Klein nat seizoen (maart - mei)' en 'Klein droog seizoen (juni - juli)'.

Om de fysiologische responsen van de bomen op de klimaat variabelen na te gaan, werden de verschillende variabelen gecorreleerd met de c_i . Er werd voor gekozen om zowel met c_i als WUE_i verder te werken, aangezien zowel de intracellulaire CO₂ concentratie als de intrinsieke 'water use efficiency' stijgingen vertoonden doorheen de tijd. Dit is echter in tegenstelling tot het onderzoek van Brien *et al.* (2010), waar de c_i onafhankelijk bleek te zijn van de stijgende atmosferische CO₂. Dit werd nog eens aangetoond met het berekenen van de correlatie tussen c_a met c_i en de correlatie tussen c_a en $WUE_{i, \text{gemiddeld}}$. WUE_i en c_i werden bijgevolg gelinkt met de neerslag voor alle vijf de seizoenen, met de temperatuur (zowel de gemiddelde, de minimale en de maximale) en met de instraling. Hierbij diende rekening te worden gehouden met correlaties tussen de klimaat variabelen zelf, waarvoor partiële correlaties worden gebruikt (Brien *et al.*, 2010).

4. RESULTATEN

De 3 stamschijven hebben een geschatte leeftijd van tussen de 80 en 83 jaar oud. Aangezien de bomen in hetzelfde jaar geplant zijn, betekent dit dat er enkele jaren geen ringvorming heeft plaatsgevonden. Binnen deze studie was het echter niet mogelijk om na te gaan wanneer deze zich situeerden. Er wordt voor elke boom teruggeteld van 2013. Er werd zowel onderzoek gedaan naar lange termijn trends als naar de fysiologische reactie van bomen op klimatologische variatie. De lange termijn heeft betrekking op de stijgende CO₂ concentratie en het (eventuele) effect daarvan op $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$, c_i en WUE_i .

4.1. LANGE TERMIJN TRENDS IN $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$, c_i en WUE_i

De Pearson correlaties voor de drie variabelen, $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$, c_i en WUE_i , zijn terug te vinden in Tabel 1. Voor zowel $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$, WUE_i als c_i bleek op het 5%-significantieniveau dat de drie bomen goed gecorreleerd zijn. Vooral het vergelijken van boom 2 met boom 3 leverde significante correlaties op, namelijk 0.82 (WUE_i) en 0.73 (c_i).

Op basis van Figuur 11 kunnen de isotoopratio's in cellulose vergeleken worden tussen de drie bomen. Voor de periode rond 1974 zijn er veel afwijkingen tussen de drie stamschijven aanwezig, terwijl later een vrij vergelijkbare trend zichtbaar is. De lage richtingscoëfficiënten en dus de lage lineariteit is te wijten aan die afwijkingen. Dit kan tevens een verklaring zijn voor de lage Pearson correlaties (Tabel 1). Aan de hand van Figuur 12 blijkt dat vanaf 1960 de gemiddelde $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$ blijft schommelen tussen -25 en -26‰, maar een stijging (minder negatief) vertoont van 1934 tot en met ongeveer 1960. De $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ daarentegen vertoont een daling, van -6.78 tot -8.28‰ over de periode 1934 tot 2013, die vanaf omstreeks 1960 licht versterkt (Figuur 12).

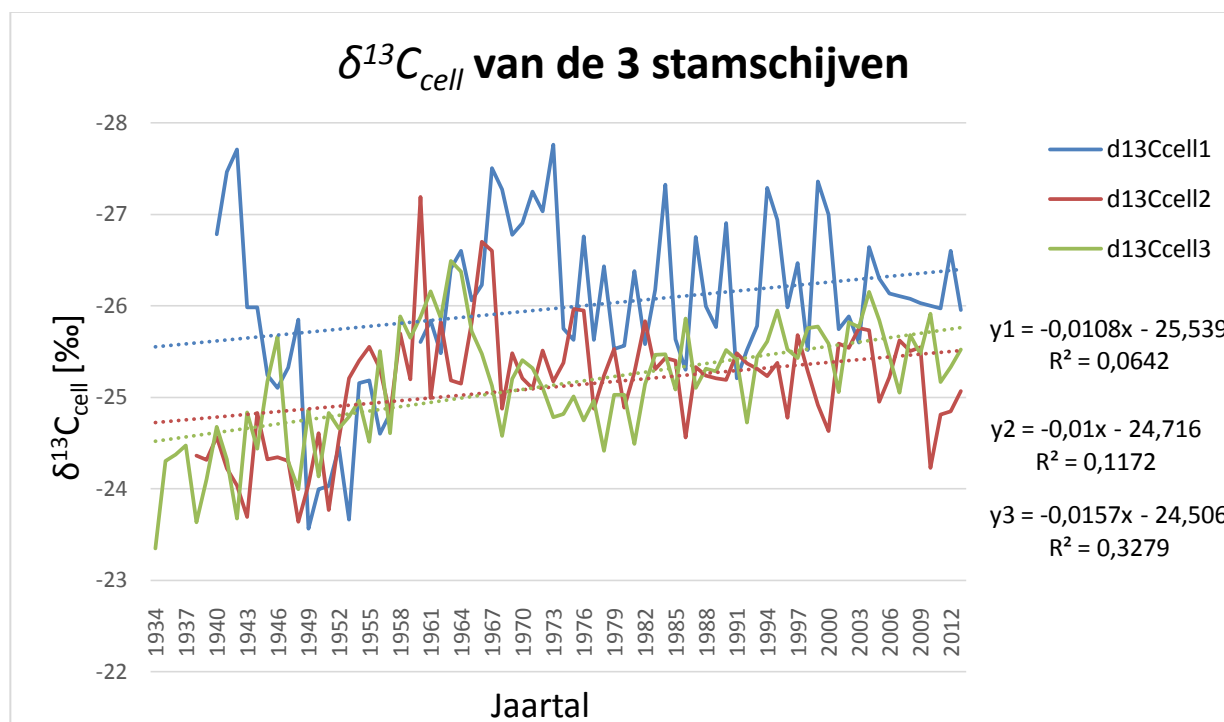
Zowel de intracellulaire CO₂ concentratie als de atmosferische CO₂ concentratie stijgen over de beschouwde periode (Figuur 13). De c_a nam toe van ongeveer 306 tot 389 ppm over de periode van 1934 tot 2012, dit betekent dus een toename van ongeveer 27.5%. De c_i steeg van 172 tot 229 ppm, een toename van 33.5%. Dat zowel c_i als c_a stijgen, zorgt ervoor dat de WUE_i ook stijgt. Dit kon ook bevestigd worden (Figuur 14). WUE_i stijgt van 62,67 tot 99,94 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Per toename in ppm van de atmosferische CO₂-concentratie verkrijgt men aldus een toename van 0.40 Lmol mol⁻¹ van de WUE_i .

Figuur 15 toont de evolutie van c_i in functie van de tijd. Er kan voor alle drie de stamschijven een duidelijke stijging waargenomen worden. Tevens is ook de gevonden correlatie hoog voor alle schijven, respectievelijk 0,456; 0,6207 en 0,7521. De correlatie is het meest uitgesproken voor stamschijf 3.

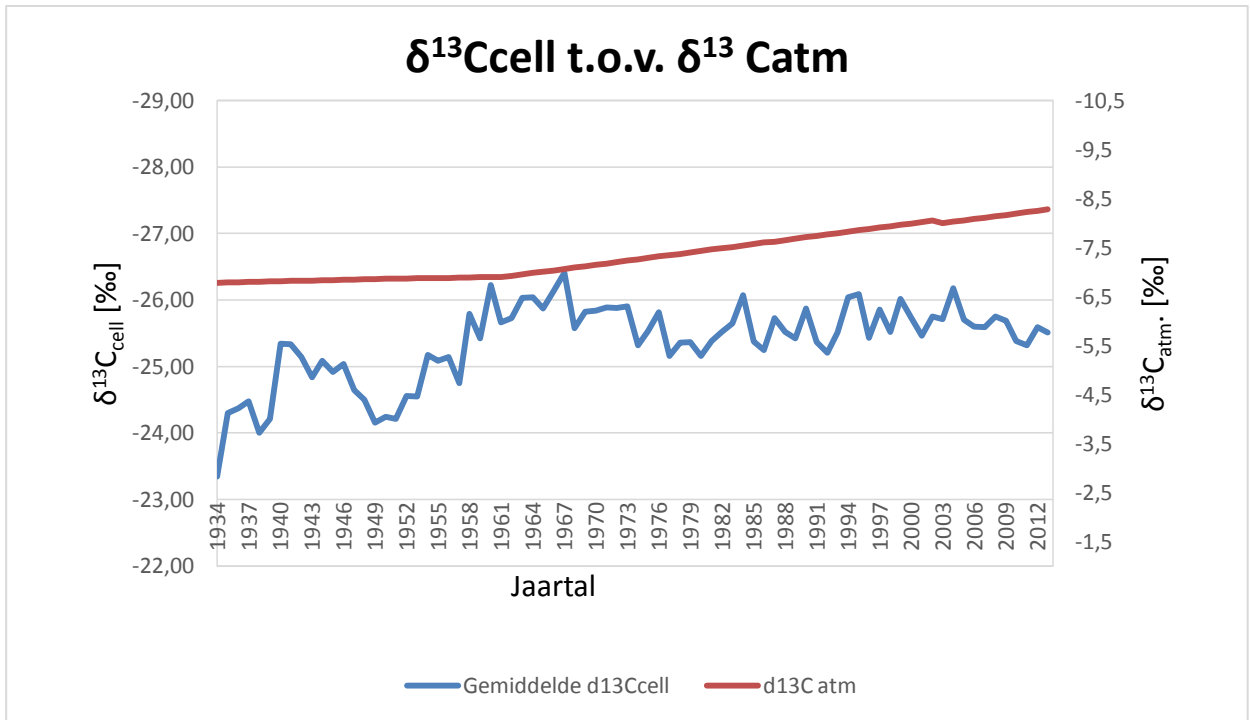
Figuur 16 geeft de neerslag weer gedurende de beschouwde periode, met eveneens de temperatuur erbij geplot. Van de temperatuur waren enkel data vanaf 1951 beschikbaar gesteld. Bij de neerslag zijn duidelijk drie pieken te zien in de jaren 1949, 1956 en 1960.

Tabel 1: De Pearson correlatie tussen de 3 stamschijven voor WUE_i , $\delta^{13}C$ en c_i . Verder wordt ook de p-waarde weergegeven. Deze testen werden toegepast op de volledige dataset van 1934 t.e.m. 2013. De nummers 1, 2 en 3 verwijzen naar de 3 stamschijven.

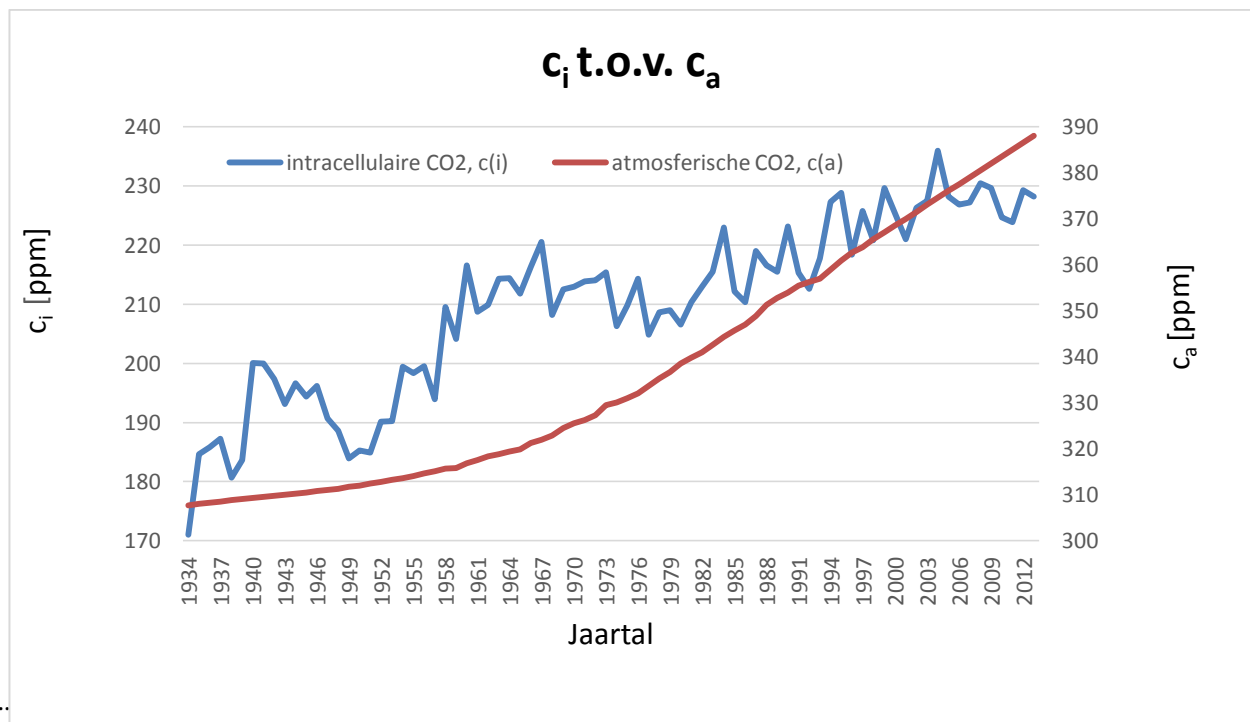
	Pearson		Pearson		Pearson
WUE_i 1 vs. 2	0,65	c_i 1 vs. 2	0,53	$\delta^{13}C_{cell}$ 1 vs. 2	0,17
WUE_i 2 vs.3	0,82	c_i 2 vs. 3	0,73	$\delta^{13}C_{cell}$ 2 vs. 3	0,41
WUE_i 1 vs. 3	0,62	c_i 1 vs. 3	0,57	$\delta^{13}C_{cell}$ 1 vs. 3	0,12



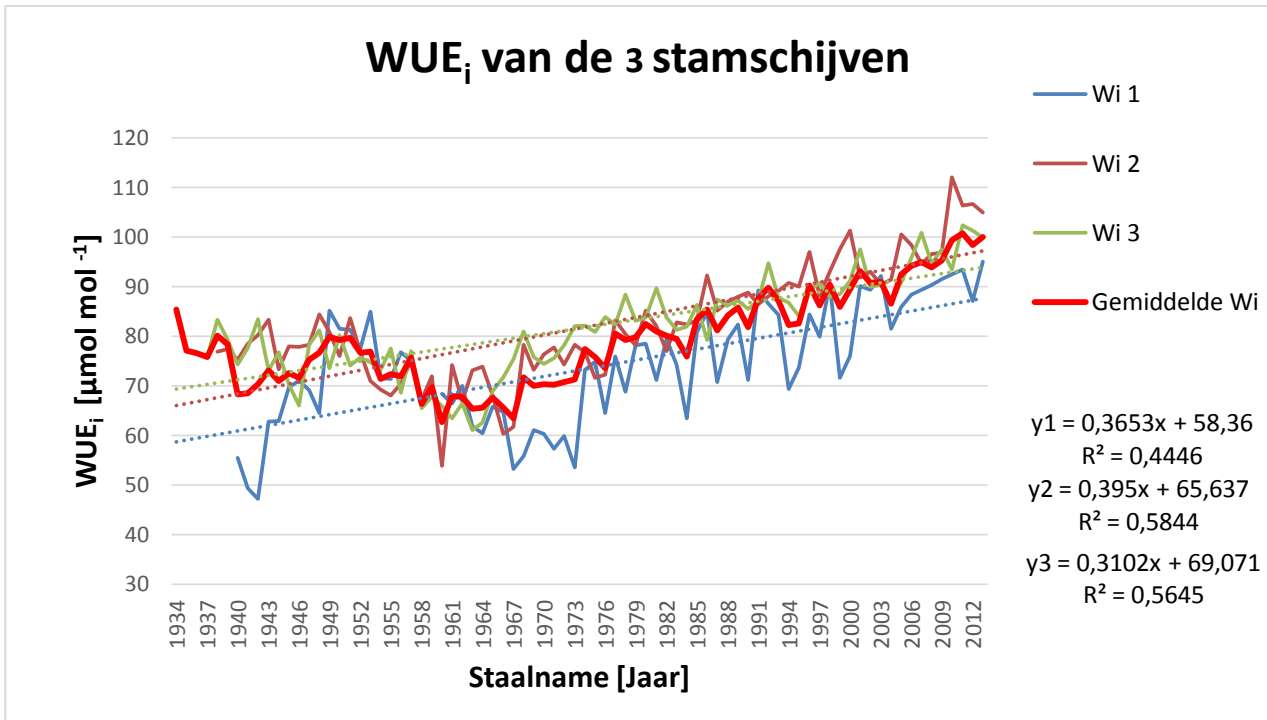
Figuur 11: De $\delta^{13}C_{cell}$ waarde van de drie stamschijven werd boven elkaar geplot. Daarbij werd ook de lineariteit nagegaan en werd zowel de vergelijking als de R2 weergegeven om na te gaan of de resultaten vergelijkbaar zijn.



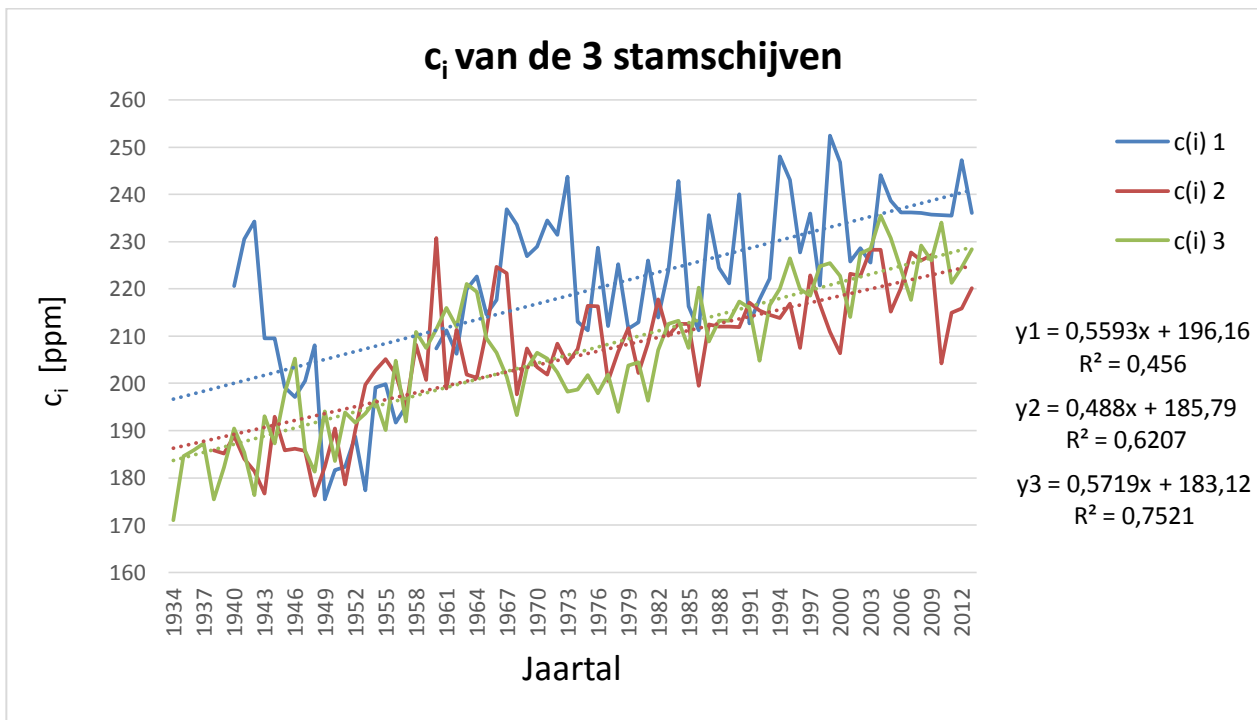
Figuur 12: Gemiddelde $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$ ten opzichte van $\delta^{13}\text{C}_{\text{atm}}$ van 1934 tot en met 2013.



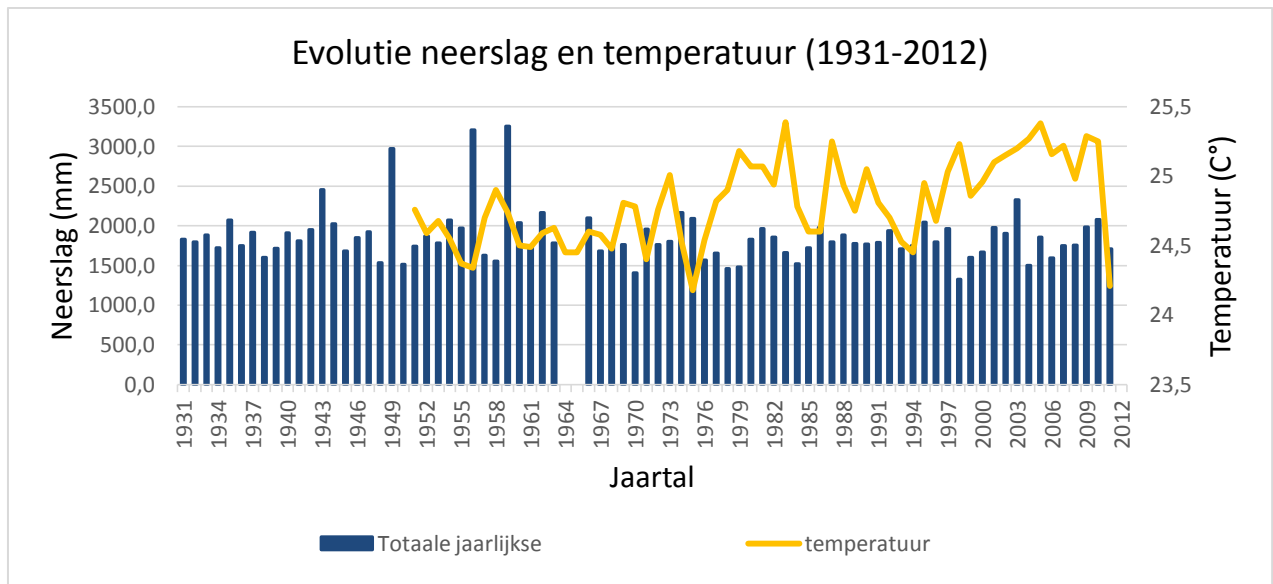
Figuur 13: Gemiddelde c_i ten opzichte van gemiddelde c_a van 1934 tot en met 2013.



Figuur 14: De WUE_i waarde van de drie stamschijven werd boven elkaar geplot. Daarbij werd ook de lineariteit nagegaan en werd de vergelijking en de R2 weergegeven om na te gaan of de resultaten vergelijkbaar zijn. Verder is ook de gemiddelde WUE_i geplot.



Figuur 15: De c_i waarde van de drie stamschijven werd boven elkaar geplot. Daarbij werd ook de lineariteit nagegaan en werd de vergelijking en de R2 weergegeven om na te gaan of de resultaten vergelijkbaar zijn.



Figuur 16: Jaarlijkse neerslag van 1931 tot en met 2011. Data voor jaarlijks gemiddelde temperatuur werd pas vanaf 1951 beschikbaar gesteld. Data is afkomstig van I.N.E.R.A.

4.2. LANGE TERMIJN RESULTATEN DOOR MIDDEL VAN CORRELATIE

Voor de verdere beschouwingen en correlaties werd gewerkt met de gemiddelde waarde van WUE_i , $\Delta^{13}C$ en c_i , wat het gemiddelde is voor de bekomen waarden van de 3 aparte stamschijven. De waarden tussen haakjes in Tabel 3 geven de correlatie weer indien voor het groot nat en het klein nat seizoen gecorrigeerd werd voor de neerslagwaarde van respectievelijk 1998 en 1949, die beide sterk verschillend zijn van de trendlijn waarden. Vermits er geen zekerheid is over de juistheid van de resultaten en de natuurlijke variatie groot is, kunnen deze datapunten niet zomaar verwijderd worden.

De correlaties betreffende de variabelen c_a , $c_{i,gem}$, $WUE_{i,gem}$, neerslag en temperatuur zijn terug te vinden in Tabel 1 tot en met 4. Voor verschillende onderlinge relaties werd een hoge correlatie verkregen, maar eveneens werden verschillende interacties als niet significant aangetoond. Zo wordt er een sterke correlatie gevonden tussen de atmosferische en interne CO₂ concentratie (0,847) van dezelfde grootteorde als deze tussen de $WUE_{i,gem}$ en c_a (0,887). De correlatie tussen de atmosferische CO₂ concentratie en instraling is echter niet hoog. (0,0887) Voor elke interactie met instraling werd slechts een lage, negatieve correlatie bekomen, met als waarde voor respectievelijk in combinatie met $c_{i,gem}$ en $WUE_{i,gem}$, -0,070 en -0,141.

In geval van de correlatie met de neerslag werd er een onderverdeling gemaakt voor de verschillende groeiseizoenen, vermits externe factoren een invloed kunnen hebben op onderlinge reacties en variabelen. Deze onderverdeling brengt een betere kijk op de verdeling van interactie doorheen de seizoenen. Voor het hele jaar is de correlatie met c_a , $c_{i,gem}$ en $WUE_{i,gem}$ licht negatief, maar voor het groot nat seizoen is de correlatie met zowel de c_a , $WUE_{i,gem}$ als $c_{i,gem}$ sterker, respectievelijk 0,220; 0,193 en 0,187. Door middel van de correctie stijgt voor het extremum in 1998 de correlatie nog verder tot 0,304; 0,277 en 0,246. Voor de andere seizoenen wordt de correlatie beïnvloed door de opdeling, maar deze zijn na de correctie slechts licht gewijzigd, zoals

de correctie voor 1949 waar van de ene kant een stijgende en anderzijds een dalende trend opgemerkt wordt voor c_a en $WUE_{i,gem}$.

Voor de correlaties in combinatie met de temperatuur, die onderverdeeld wordt in het jaarlijks gemiddelde enerzijds en de minimum en maximumtemperatuur anderzijds om extreme weersmomenten te visualiseren, is voornamelijk de maximumtemperatuur een sturende factor. Zo is de correlatie voor respectievelijk c_a , $c_{i,gem}$ en $WUE_{i,gem}$ 0,780; 0,546 en 0,774 met de maximale temperatuur in beschouwing. De correlatie voor de minimale temperatuur levert voor deze 3 variabelen de laagste waarden op (0,405; 0,318 en 0,386), die tevens sterk verschillen van de bekomen waarden van de maximale temperatuur. Naderhand werden ter visualisatie verscheidene interacties geplott, welke te zien zijn in de 8 grafieken in Figuur 17 en Figuur 18.

De grafieken die de atmosferische CO2 concentratie uitzetten ten opzichte van de interne CO2 concentratie, de neerslag in het grote natte seizoen, de $WUE_{i,gem}$ en de maximale temperatuur (Figuur 17) vertonen een stijgende trend die uitgezonderd voor de maximale temperatuur een toename van 20-25% aanduidt. Bij de grafieken die $c_{i,gem}$ en $WUE_{i,gem}$ weergeven ten opzichte van de maximale temperatuur en de neerslag (Figuur 18) zorgt een sterke spreiding voor een moeilijkere interpretatie van de verkregen data. Voor de interactie van de maximale temperatuur en de 2 variabelen wordt er echter wel een compacte scatter en stijgende trend bekomen.

Tabel 2: De Pearson correlaties voor de parameters waarbij geen verdere onderverdeling werd gemaakt, worden in deze tabel weergegeven. Hierbij representeren $c_{i,gem}$ en $WUE_{i,gem}$ de gemiddelde waarden verkregen voor de 3 bomen.

	$c_{i,gem}$	$WUE_{i,gem}$	instraling
c_a	0,847	0,887	0,0887
$c_{i,gem}$	-	0,451	-0,070
$WUE_{i,gem}$	-	-	-0,141

Tabel 3: Deze tabel met Pearson correlaties geeft het onderscheid tussen de verschillende periodes die bomen jaarlijks ondergaan (groeiseizoen, startend van maart) en die een effect kunnen veroorzaken op de onderzochte parameters.

Neerslag	Jaarlijks	Groot nat	Groot droog	Klein nat	Klein droog
c_a	-0,177	0,220 (0,304)	-0,175	-0,184 (-0,138)	-0,114
$WUE_{i,gem}$	-0,134	0,193 (0,277)	-0,204	-0,058 (-0,102)	-0,097
$c_{i,gem}$	-0,156	0,187 (0,246)	-0,116	-0,189 (-0,055)	-0,040

Tabel 4: Hierbij werd voor de correlatie met de temperatuur een onderscheid gemaakt tussen het gemiddelde en de extrema, zowel de minimum als de maximumwaarde per jaar.

Temperatuur	Gemiddeld	Maximum	Minimum
c_a	0,571	0,780	0,405
$c_{i,gem}$	0,462	0,546	0,318
$WUE_{i,gem}$	0,523	0,774	0,386



Figuur 17: (4 subplots) Visualisatie van de c_i , neerslag, WUE_i en maximale temperatuur ten opzichte van de atmosferische CO₂ concentratie. Een lineaire trendlijn werd geplott om het stijgend karakter voor te stellen.

Figuur 18: (4 subplots) Voorstelling van WUE_i en c_i ten opzichte van de maximale jaarlijkse temperatuur en de hoeveelheid neerslag (groot nat seizoen). De trendlijn werd toegevoegd om de plots te kunnen interpreteren.

5. DISCUSSIE

De laagste gemiddelde WUE_i bedroeg $62,67 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (in het jaar 1960; Gegevens niet weergegeven in deze scriptie) en de maximale $100,74 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (in het jaar 2011, Gegevens niet weergegeven in deze scriptie), wat dus een sterke stijging van ongeveer 60% aantoont. Echter is dit bekeken voor de extreme waarden. Een genuanceerdere manier is om te kijken naar de regressielijn van de gemiddelde WUE_i , ' $y = 0,3087x + 66,99$ ', met een helling van 0,3087 eenheid WUE/jaar . Deze stijging is niet noodzakelijk uitsluitend het gevolg van een toenemende CO_2 concentratie, maar kan ook het resultaat zijn van andere factoren. Temperatuurstijging is één van die factoren, aangezien de stomata bij droogtestress gaan sluiten en het waterdampdruktekort gaat toenemen (Brienen *et al.*, 2010).

Met bepaalde factoren werd er tijdens dit onderzoek echter geen rekening gehouden. Dit is omdat er ofwel geen gegevens over waren of omdat ze niet voor significante verschillen in het eindresultaat zorgden. Een eerste factor is het feit dat er een verschil in $\delta^{13}\text{C}$ is tussen blad en hout. Omwille van de neerwaartse fractionatie van koolstof van blad naar stam, is het hout meer aangerijkt met ^{13}C (McCarroll & Loader, 2004). Omdat deze aanrijking geen grote invloed heeft, wordt ze vaak niet in rekening gebracht. Ook met de mesofyl geleidbaarheid (g_m) werd in dit onderzoek geen rekening gehouden. g_m representeert de geleidbaarheid van CO_2 transfer van de intercellulaire stomatale ruimtes van het blad naar de sites van carboxylatie, zijnde de chloroplasten. Bernacchi *et al.* (2002) en Yamori *et al.* (2006) toonden aan dat de fotosynthese significant gelimiteerd wordt bij hogere temperaturen. De temperatuur-afhankelijke respons van g_m impliceert dat een temperatuur-sensitief eiwit een cruciale rol speelt tijdens dit transport. Hiervoor komen het eiwit 'carbonic anhydrase' (Vолоkita *et al.*, 1981, 1983; Tsuzuki *et al.*, 1985; Makino *et al.*, 1992; Price *et al.*, 1994) en de aquaporines, die de CO_2 -permeabiliteit van de celmembranen verhogen, in aanmerking. Het verwaarlozen van de mesofyl geleidbaarheid kan leiden tot een onderschatting van WUE_i en c_i . Desalniettemin werd gebruik gemaakt van het lineaire model van Farquhar *et al.* (1982), aangezien er geen informatie beschikbaar was omtrent de mesofyl geleidbaarheid en het gebruik van gemiddelde g_m -waarden geen extra informatie opgeleverd zou kunnen hebben. Zoals reeds vermeld in de literatuurstudie, werd ook het juveniel effect niet in beschouwing genomen aangezien de bomen afkomstig zijn van een gelijkjarige plantage.

Uit de resultaten bleek dat er in 1949, 1956 en 1960 uitzonderlijke pieken waren met betrekking tot de neerslag (Resultaten, Figuur 16). In dit onderzoek werd er nagegaan of dit een effect had op de jaarringsamenstelling. Uit de data resultaten (niet in bijlage, aangezien de data nog moeten worden gepubliceerd) bleek op die drie jaartallen geen opmerkelijke hoge of lage waarde waar te nemen bij één of meer van de drie parameters onder studie (WUE_i , c_i en $\delta^{13}\text{C}_{\text{cell}}$). Er is niet onmiddellijk een verklaring of gevolg gevonden voor deze pieken met betrekking tot de neerslaghoeveelheid.

De verhouding c_i/c_a werd bepaald om na te gaan wat de invloed is van een stijgende CO_2 concentratie op de gasuitwisseling. De resultaten leverden een licht fluctuerende ratio op tussen 0.56 en 0.68, wat als min of meer constant mag worden beschouwd. Dit spreekt de resultaten van Brienen *et al.* (2010) tegen, namelijk dat c_i ongeveer gelijk blijft. Maar zoals reeds vermeld in de

literatuurstudie is het mogelijk dat een constante ratio van c_i/c_a wordt bekomen (Saurer *et al.*, 2004 en Wong *et al.*, 1979) indien de link tussen stomatale geleidbaarheid en assimilatie wordt behouden bij een stijgende c_a . Dit is volgens verschillende bronnen (Feng, 1998; Hietz *et al.*, 2005; Leavitt and Lara, 1994; Nock *et al.*, 2010; Saurer *et al.*, 2004) de meest voorkomende reactie op een stijgende CO₂ concentratie.

Wat is nu de invloed van een stijgende ‘water use efficiency’ op ecosystemen? Als de stomatale geleidbaarheid daalt, dan kan dit een invloed hebben op de hydrologische cyclus en de koolstofcyclus. Yangambi is gelegen in een tropisch regenwoud klimaat, waarbij de neerslag niet van oceanische oorsprong is, maar van geëvapotranspireerd water van het gebied (continentaal) (van der Ent *et al.*, 2010). Dit impliceert dat indien de stomatale geleidbaarheid daalt, en dus de evapotranspiratie afneemt, dit een effect kan hebben op een continentaal klimaat. De transpiratie zal mogelijks verminderen en de luchttemperatuur verhogen, waardoor de luchtvochtigheid daalt en bijgevolg de hercirculatie van de neerslag zal afnemen. Dit kan problemen geven voor het Afrikaanse woud, waarvan verondersteld wordt dat het dichter tegen de neerslag-limiet ligt dan bijvoorbeeld het Amazonewoud (Lewis *et al.*, 2013). Dit was ook reeds voorspeld door Keenan *et al.* (2013) in hun gelijkaardig onderzoek, maar op gematigde en boreale bossen in het Noordelijk halfrond. Zij voorspellen dat een daling in recyclage van regenwater kan zorgen voor een stijging in continentale water ‘run-off’, dat gepaard zou gaan met meer droogte in gebieden die net gebruik maken van water dat getranspireerd wordt door planten en bomen in andere gebieden (Keenan *et al.*, 2013, Betts *et al.*, 2007, Keys *et al.*, 2012). Keenan *et al.* (2013) verkregen ook een significante stijging in WUE_i en konden zelfs aantonen dat de grootste oorzaak hiervan de stijging in atmosferische CO₂ concentratie is. Hiervoor was bij ons onderzoek echter te weinig data beschikbaar. Er zouden ook voordelen kunnen zijn aan een dergelijke stijging, zoals een verbeterde houtkwaliteit en meer waterbeschikbaarheid, wat toekomstige droogtes zou kunnen tegengaan (Niinemets *et al.*, 2011). Er moet echter wel rekening gehouden worden met het potentiële bestaan van feedback mechanismen. Bijvoorbeeld doordat de stomatale geleidbaarheid daalt, gaat de bladafkoeling afnemen waardoor de bladtemperatuur toeneemt (Idso *et al.*, 1993). Dit kan dan tot gevolg hebben dat de transpiratieverliezen weer gaan toenemen.

Volgens een onderzoek naar globale trends in NPP (‘Net Primary Production’) (Nemani *et al.*, 2003) bleek dat globaal de NPP sterk positief gecorreleerd was met de stijgende CO₂ concentratie, met de sterkste stijging in tropische ecosystemen. Kortom, de toename aan atmosferische CO₂ zorgt ervoor dat de fotosynthese wereldwijd stijgt. Verschillende studies concludeerden dat koolstofopname door land en oceanen (‘koolstofsinks’) afneemt (Piao S. *et al.*, 2008, McKinley G.A. *et al.*, 2011, Le Quéré C. *et al.*, 2007, Schuster U. & Watson A.J., 2007), wat wereldwijd een gevolg kan hebben op het klimaat. Een reductie in C-opname door land zou te wijten zijn aan een afname in productiviteit en een toename in respiratie. De reductie in C-opname door oceanen is daarentegen eerder te wijten aan verzuring, verandering in menging en een toename van oceanische temperaturen. Doch blijkt er nog onvoldoende empirisch bewijs dat C-opname al op globale schaal aan het afnemen is (Ballantyne A.P. *et al.*, 2012).

Volgens Lewis *et al.* (2009) is er door de stijgende CO₂ concentratie ook een toename in globale snelheid van aangroei van bos. Hun onderzoek spitte zich toe op Afrikaanse tropische bossen. Hierbij dient de aandacht nog eens gevestigd te worden op het feit dat tropische bossen één van de grootste C-‘sinks’ zijn doordat ze een hoge dichtheid aan koolstof hebben en erg productief zijn.

Hoe lang de CO₂ fertilisatie een effect zal hebben is echter een andere vraag, want op een bepaald moment zullen andere factoren limiterend worden zoals ondermeer nutriënten.

Het staat dus vast dat de stijging in CO₂ concentratie een impact zal hebben op onze ecosystemen, zowel in tropische, gematigde als boreale bossen. Maar hoe groot de impact zal zijn en wat die precies zal inhouden is nog niet zeker.

In deze scriptie bleek uit de analyse van de correlaties dat onderscheid maken in klimatologische fenomenen een kans biedt om onderliggende oorzaken beter te bestuderen. Zoals in Tabel 2 tot en met Tabel 4 (Resultaten) te zien is, zullen correlaties meer neigen naar een sterke of zwakke waarde indien er ingezet wordt op verschillende seizoenen of extreme temperaturen.

Aan de hand van Tabel 2 kan besloten worden dat de atmosferische CO₂ concentratie een sterke correlatie vertoont met de c_i en de WUE_i . Deze correlatie ten opzichte van de intercellulaire CO₂ concentratie werd, zoals eerder vermeld, reeds aangetoond in voorgaande studies maar ondanks de sterke correlatie volgt de stijgende trend in de intercellulaire concentratie de atmosferische niet op gelijke tred. Dit gegeven werd reeds in vroegere onderzoeken (Lloyd & Farquhar, 2008; Lewis *et al.*, 2009) aangehaald als bewijs dat de extra input van koolstof via fossiele brandstof, de extra assimilatie van biomassa oversteeg. Deze redenering volgt uit de assumptie dat de fysiologie van deze planten reeds aangepast is aan de huidige omgevingsparameters. Een blijvend stijgende trend in atmosferisch CO₂ zal na een bepaalde periode een verzadigingsplateau bereiken en geen extra toegevoegde waarde meer leveren.

Er kan echter wel een verschuiving in het belang van CO₂ bemesting komen door het onderscheid tussen C₃- en C₄-plantensoorten. Aangezien C₃- en C₄-planten een verschillend regulatiemechanisme vertonen met betrekking tot het CO₂-gehalte dat de enzymatische kringloop haalt, is het aanneembaar dat een hogere concentratie tot op een bepaald niveau kan blijven stijgen. Dit zal doorgaan tot het moment dat andere plantensoorten met het C₃/C₄ fotosynthese mechanisme een voordeel halen uit de klimaatsverandering en de veranderende omgevingsparameters zoals de temperatuur. Dit kan ook deel uitmaken van de vraag of de stijgende atmosferische concentratie een te bruske overgang zal veroorzaken voor planten en een zodanige stress op de biodiversiteit zal leggen dat deze niet genoeg genetische diversiteit zal vertonen om hierop een antwoord te bieden (Visser, 2008). Indien planten echter niet voldoende tijd hebben om zich aan de veranderende omgeving aan te passen, kan dit aanleiding geven tot een definitief verlies van biodiversiteit en ecosystemen. Extreme fenomenen zullen hier een sterke invloed op hebben via ondermeer langdurige droogte, een verhoogde kans op bosbranden, erosieverschijnselen, veranderingen in neerslagpatronen en dalingen in de grondwatertafel. Deze fenomenen kunnen een ecosysteem op dergelijke wijze verzwakken zodat de onafhankelijke, draagbare effecten een cascade beginnen waar het ecosysteem niet tegen bestand is.

Verder valt ook uit Tabel 2 af te leiden dat de duur van instraling een zeer lage interactie vertoont met zowel de atmosferische als interne CO₂ concentratie als met de WUE_i . Dit valt te verklaren doordat de locatie van de onderzoeken niet sterk Noordelijk of Zuidelijk gelegen is ten opzichte van de evenaar en er bijgevolg op dagelijkse basis geen tekort aan licht zal zijn. In hoog Noordelijke gebieden daarentegen kan dit echter wel het geval zijn tijdens bepaalde periodes van het jaar.

Voor de correlaties betreffende de neerslag, weergegeven in Tabel 3, werd het duidelijk dat de correlatie voornamelijk te wijten was aan de periode van het grote natte seizoen. Dit kan een indicatie zijn voor de bepaling van de periode waarin de meeste groei vertegenwoordigd wordt, maar is momenteel nog niet eenduidig onderzocht. Deze aanname is echter wel plausibel aangezien groei het sterkst zal vertegenwoordigd zijn tijdens periodes met een grote hoeveelheid aan zowel licht als water. Tijdens een nat seizoen zijn er echter meer wolken waardoor de instralingsduur per dag verlaagd zal worden. Er zal dus nog verder onderzoek nodig zijn om te bepalen welke factoren hierin de bovenhand nemen en het sterkste effect hebben op de groei van bomen.

Correlaties met de temperatuur, weergegeven in Tabel 4, waren voor alle 3 de onderverdelingen groot, variërend van 0,4 tot 0,78, maar waren het meest uitgesproken bij de maximale jaartemperatuur. Een stijgende maximale temperatuur op jaarbasis heeft dus een sterke samenhang met de interne CO₂ concentratie. Op basis van de trend die bekomen wordt, wijst dit voor de toekomst een verder stijgend verloop aan. WUE_i is eveneens sterk gerelateerd met de maximale temperatuur, maar dan komt de vraag op in hoeverre dat deze parameters een stijgend verloop zullen blijven kennen of deze in afzienbare tijd een plateauwaarde zullen bereiken.

Veel van deze vragen omtrent drempelwaarden van fysiologische parameters, bepaling van het effectieve groeiseizoen van bomen en de biologische diversiteit zullen een antwoord moeten bieden op klimaatsverandering en andere gerelateerde processen. Deze zullen echter nog verder onderzocht moeten worden om een éénduidig resultaat te kunnen presenteren met betrekking tot het klimaatsveranderingsthema. Hierbij zal uiteraard ook aandacht moeten gegeven worden aan de belangen van feedbackmechanismen die momenteel nog niet volledig begrepen of beschreven zijn.

6. BESLUIT

Wat met zekerheid kan worden gesteld, is dat de WUE wel degelijk stijgt onder invloed van een stijgende CO₂ concentratie. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt duidelijk dat de verhouding van c_i ten opzichte van c_a min of meer gelijk blijft onder deze omstandigheden en dus beantwoordt aan de voorspelling dat de link tussen de stomatale geleidbaarheid en de assimilatie wordt behouden. Maar aangezien er nog maar weinig gelijkaardige studies uitgevoerd zijn, kan echter niet gezegd worden in welke mate deze resultaten zouden kunnen gebruikt worden voor voorspellingen en modellen. Hoe dit zich dus in de toekomst in realiteit zal ontwikkelen is nog zeer onduidelijk. Dit hangt sterk af van het bepalen van de eerder vermelde drempelwaarden en van de draagkracht van de ecosystemen, maar ook van de mens, die de grote veroorzaker is van CO₂ uitstoot. Gaat de uitstoot in de toekomst nog verder stijgen? Is er nog een mogelijkheid op terugkeer, of het voorkomen van de voorspelde scenario's? Verder onderzoek om op al deze vragen te kunnen antwoorden is nodig.

Er zouden verder ook nog correlaties kunnen worden gelegd met de instraling, bewolking, temperatuur van het zeeoppervlak en de El Niño en La Niña jaren, maar dit werd buiten het bestek van onze analyse gelaten wegens een gebrek aan data en onderzoek tijd.

7. LITERATUURLIJST

- Bacon, M.A., 2004. Water use efficiency in plant biology, p.17-18, p.27-31, p.37-40, p.50-51
- Ballantyne, A.P., Alden, C.B., Miller, J.B., Tans, P.P. & White, J.W.C. (2012). Increase in observed net carbon dioxide uptake by land and oceans during the past 50 years. *Nature* 488: 70-72.
- Bernacchi, C.J., Portis, A.R., Nakano, H., von Caemmerer, S. & Long, S.P. (2002). Temperature Response of Mesophyll Conductance. Implications for the Determination of Rubisco Enzyme Kinetics and for Limitations to Photosynthesis in Vivo.
- Betts, R., Cox, P., Collins, M., Harris, P., Huntingford, C. & Jones, C. (2004). The role of ecosystem-atmosphere interactions in simulated Amazonian precipitation decrease and forest dieback under global climate warming. *Theor Appl Clim* 78:157–175.
- Brienen, R.J., Wanek, W. & Hietz, P. (2010). Stable carbon isotopes in tree rings indicate improved water use efficiency and drought responses of a tropical dry forest tree species., *Trees* (2011) 25: 103-113.
- Brüggemann, N., Gessler, A., Kayler, Z., Keel, S.G., Badeck, F., Barthel, M., Boeckx, P., Buchmann, N., Brugnoli, E., Esperschütz, J., Gavrichkova, O., Ghashgaie, J., Gomez-Casanovas, N., Keitel, C., Knohl, A., Kuptz, D., Palacio, S., Salmon, Y., Uchida, Y. & Bahn, M. (2011). Carbon allocation and carbon isotope fluxes in the plant-soil-atmosphere continuum: a review. *Biogeosciences*, 8, 3457-3489, 2011.
- Bunce, J.A. (2001). Direct and acclimatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field. *Glob. Change Biol.* 7, 323–331. (Kaminski P.K et al., 2013).
- Canny, M.J. (1994). A new theory for the ascent of sap—cohesion supported by tissue pressure.
- Cernusak, L., Marshall, J., Comstock, J. & Balster, N. (2001). Carbon isotope discrimination in photosynthetic bark. *Oecologia* 128, 24–35.
- Cernusak, L.A., Ubierna, N., Winter, K., Holtum, J.A.M., Marshall, J.D. & Farquhar, G.D. (2013). Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist* (2013) 200: 950–965.
- Clark, D.A. (2004). Sources or sinks? The responses of tropical forests to current and future climate and atmospheric composition.
- Comstock, J.P. (1999). Why Canny's theory doesn't hold water.
- Denman, K.L. & Solomon, S. (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*
- Cullen, L.E. & Grierson, P.F. (2005). Is cellulose extraction necessary for developing stable carbon and oxygen isotopes chronologies from *Callitris glaucophylla*? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 236 (2006) 206–216.

- Cullen, L.E., Adams, M.A., Anderson, M.J., Grierson, P.F. (2008). Analyses of delta C-13 and delta O-18 in tree rings of *Callitris columellaris* provide evidence of change in stomatal control of photosynthesis in response to regional changes in climate. *Tree fysiolog* 28: 1525-1533
- De Schepper, V., De Swaef, T., Bauweraerts I. & Steppe K. (2013). Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany*, 64, 4839 - 4850.
- Ebey, J., Lokombe, J. & Ponette, Q. (2011) Allometric equation for predicting aboveground biomass of three species. *J. Trop. For. Sci.* 23, 125-132.
- Ehleringer, J.R., Field, C.B., Lin, Z.F. & Kuo, C.Y. (1986). Leaf carbon isotope and mineral composition in subtropical plants along an irradiance cline. *ecologia* 70: 520–526.
- Farquhar, G. D. & Cernusak, L.A. (2012). Ternary effects on the gas exchange of isotopologues of carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* (2012) 35, 1221–1231.
- Farquhar, G.D, Ehleringer, J. & Hubick, K. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:503–537.
- Farquhar, G.D. & 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*. Academic Press, San Diego, CA, 47-70
- Farquhar, G.D., O’Leary, M.H. & Berry, J.A. (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9: 121–137.
- Farquhar, G.D. & Sharkey, T.D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 317–345.
- Ferrio, J.P. & Voltas, J. (2004). Carbon and oxygen isotope ratios in wood constituents of *Pinus halepensis* as indicators of precipitation, temperature and vapour pressure deficit. *Tellus* (2005), 57B, 164–17.
- Francey, R. & Farquhar, G. (1982). An explanation of C-13/C-12 variations in tree rings. *Nature* 297:28–31.
- Fritts, H. (1976). *Tree rings and climate*. Academic Press, London.
- Galmes, J., Aranjuelo, I., Medrano, H. & Flexas, J. (2013). Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynth Res.*, 117, 73–90.
- Gilson, P., Van Wambeke, A. & Gutzweiler, R. (1956). Notice Explicative de la Carte des Sols et de la Végétation, N° 6: Yangambi, planchette 2: Yangambi (INEAC).
- Gleixner, G., Danier, H., Werner, R.A. & Schmidt, H. (1993). Correlations between the ¹³C Content of Primary and Secondary Plant Products in Different Cell Compartments and That in Decomposing Basidiomycetes. *Plant Physiol.* (1993) 102: 1287-1290.

- Gori, Y., Wehrens, R., Greule, M., Keppler, F., Ziller, L., La Porta, N. & Camin, F. (2012). Carbon, hydrogen and oxygen stable isotope ratios of whole wood, cellulose and lignin methoxyl groups of *Picea abies* as climate proxies. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, 27, 265–275.
- Groenendijk, P., Sass-Klaassen, U., Bongers, F. & Zuidema, P.A. (2014). Potential of tree-ring analysis in a wet tropical forest: A case study on 22 commercial tree species in Central Africa. *Forest Ecology and Management* 323, 65-78
- Harper, J.L. (1989). The value of a leaf. *Oecologia* 80, 53–58. (De Schepper *et al.* (2013). Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany*, 64, 4839 - 4850.).
- Harvey, R.B. (2013). The Theory of the Rise of Sap in Trees: Some Historical and Conceptual Remarks.
- Hawthorne, W.D. (1995). Ecological profiles of Ghanaian forest trees. *Tropical Forestry Papers* 29. Oxford Forestry Institute, Oxford.
- Idso S.B., Kimball B.A., Akin DE, Kridler J. (1993). A general relationship between CO₂-induced reductions in stomatal conductance and concomitant increases in foliage temperature. *Environ Exp Bot* 33:443–446.
- Kaminski P.K., Kørup K., Nielsen K.L., Liu F., Topbjerg H.B., Kirk H.G. & Andersen M.N. (2013). Gas-exchange, water use efficiency and yield responses of elite potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars to changes in atmospheric carbon dioxide concentration, temperature and relative humidity.
- Kearsley, E., (2011). Characterizing spatial variability of tropical rainforest structure using hemispherical photography, in the reserves of Yangambi and Yoko (Democratic Republic of Congo), Scriptie, Universiteit Gent, 117p.
- Kearsley, E., Haulleville, T., Hufkens, K., Kidimbu, A., Toirambe, B., Baert, G., Huygens, D., Kebede, Y., Defourny, P., Bogaert, J., Beeckman, H., Steppe, K., Boeckx, P. & Verbeeck, H. (2013). Conventional tree height-diameter relationships significantly overestimate aboveground carbon stocks in the Central Congo Basin., *Nature Communications*, 1-8.
- Keeling, R.F., Piper, S.C., Bollenbacher, A.F. & Walker, J.S. (2009). Atmospheric Carbon Dioxide Record from Mauna Loa, Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC), Oak ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, USA.
- Keenan, T.F., Hollinger, D.Y., Bohrer, G., Dragoni, D., Munger, J.W., Schmid, H.P., Richardson, A.D. (2013). Increase in forest water-use efficiency as atmospheric carbon dioxide concentrations rise., *Nature*, Vol.499: 324-327.
- Koch, G.W., Sillett, S.C., Jennings, G.M. & Davis, S.D. (2004). The limits to tree height.
- Lebrun, J. & Gilbert, G. (1954). Une classification écologique des forêts du Congo. *Publ. Inst. Natl. Etude Agron. Congo Belge, Ser. Sci.*, 38: 89pp.

Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamps, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J. & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.*, 4, 272.

Lewis, S.L. (2006). Tropical forests and the changing earth system.

Lewis, S.L., Lopez-Gonzalez, G., Sonké, B., Affum-Baffoe, K., Baker, T.R., Ojo, L.O., Phillips, O.L., Reitsma, J.M., White, L., Comiskey J.A., Djuikouo, K.M.N., Ewango, C.E., Feldpausch, T.R., Hamilton, A.C., Gloor, M., Hart, T., Hladik, A., Lloyd, J., Lovett, J.C., Makana, J.R., Malhi, Y., Mbago, F.M., Ndangalasi, H.J., Peacock, J., Peh, K.S., Sheil, D., Sunderland, T., Swaine, M.D., Taplin, J., Taylor, D., Thomas, S.C., Votere, R. & Wöll, H. (2009). Increasing carbon storage in intact African tropical forests., *Nature*.

Lewis, S., Lloyd, J., Sitch, S., Mitchard, E., & Laurance, W. (2009). Changing ecology of tropical forests: evidence and drivers. *Annu Rev Ecol Syst* 40:529–549.

Lewis, S.L., Sonke, B., Sunderland, T., Begne, S.K., Lopez-Gonzalez, G., van der Heijden, G.M.F., Phillips, O.L., Affum-Baffoe, K., Baker, T.R., Banin, L., Bastin, J.F., Beeckman, H., Boeckx, P., Bogaert, J., De Cannière, C., Chezeaux, E., Clark, C.J., Collins, M., Djagbletey, G., Noël, M., Djuikouo, K., Droissart, V., Doucet, J.L., Ewango, C.E.N., Fauset, S., Feldpausch, T.R., Foli, E.G., Gillet, J.F., Hamilton, A.C., Harris, D.J., Hart, T.B., Haulleville, T., Hladik, A., Hufkens, K., Huygens, D., Jeanmart, P., Jeffery, K.J., Kearsley, E., Leal, M.E., Lloyd, J., Lovett, J.C., Makana, J.R., Malhi, Y., Marshall, A.R., Ojo, L., Peh, K.S.H., Pickavance, G., Poulsen, J.R., Reitsma, J.M., Sheil, D., Simo, M., Steppe, K., Taedoumg, H.E., Talbot, J., Taplin, J.R.D, Taylor, D., Thomas, S.C., Toirambe, B., Verbeeck, H., Vleminckx, J., White, L.J.T., Willcock, S., Woell, H. & Zemagho, M. (2013). Above-ground biomass and structure of 260 African tropical forests. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120295.

Le Quéré, C., Rödenbeck, C., Buitenhuis, E.T., Conway, T.J., Langenfelds, R., Gomez, A., Labuschagne, C., Ramonet, M., Nakazawa, T., Metz, N., Gillett, N. & Heimann, M. (2007). Saturation of the southern Ocean CO₂ sink due to recent climate change., *Science* 316: 1735-1738.

Lloyd, J., & Farquhar, G.D. (2008). Effects of rising temperatures and [CO₂] on the physiology of tropical forest trees.

Loader, N.J., Robertson, I. & McCarroll, D. (2003). Comparison of stable carbon isotope ratios in the whole wood, cellulose and lignin of oak tree-rings. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 196 (2003) 395-407.

Ludwig, F. & Flügel, U.I. (2013). Role of metabolite transporters in source–sink carbon allocation. *Front Plant Science*, 4, 231.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. & Clark, D. *Biology of Microorganisms*. San Francisco, 2012, Thirteenth Edition, Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, p. 134.

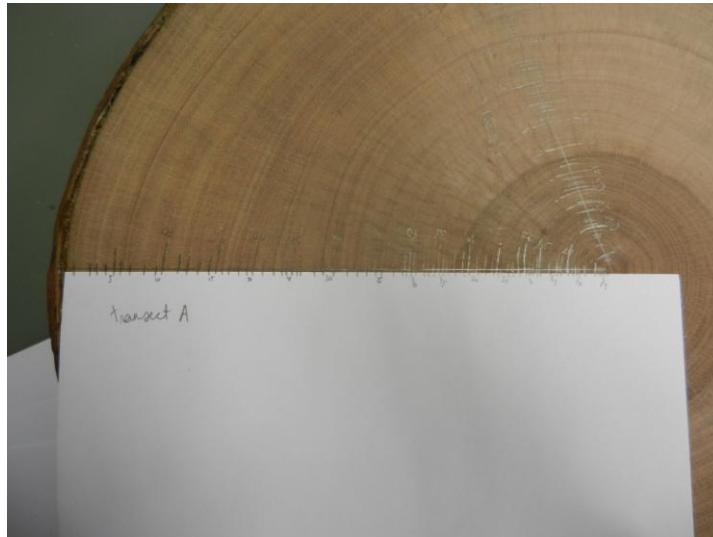
Makino, A., Sakashita, H., Hidema, J., Mae, T., Ojima, K. & Osmond, B. (1992). Distinctive response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to carbon dioxide transfer resistance. *Plant Physiol* 100: 1737–1743.

- Marshall, J.D. & Waring, R.H. (1984). Conifers and broadleaf species- stomatal sensitivity differs in western Oregon. *Canadian Journal of Forest Research* 14: 905–908.
- McCarroll, D., & Loader, N.J. (2004). Stable isotopes in tree rings., *Quaternary Science Reviews* 23 (2004):771-801.
- McDowell, N., Phillips, N., Lunch, C., Bond, B. & Ryan, M. (2002). An investigation of hydraulic limitation and compensation in large, old Douglas-fir trees. *Tree Physiology* 22, 763–774.
- McKinley, G.A., Fay, A.R., Takahashi, T. & Metzl, N. (2011). Convergence of atmospheric North Atlantic carbon dioxide trends on multidecadal timescales., *Nature Geosci* 4: 606-610.
- Meinzer, F.C., Clearwater, M.J., Goldstein, G. (2000). Water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies.
- Metz, B., Davidson, O., Bosch, P., Dave, R. & Meyer, L. (2007). *IPCC Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change*.
- Morison, J.I.L.(1998). Stomatal response to increased CO₂ concentration. *Journal of Experimental Botany*, 49, 443±542.
- Nemani, R.R., Keeling, C.D., Hashimoto, H., Jolly, W.M., Piper, S.C., Tucker, C.J., Myneni, R.B. & Running, S.W. (2003) Climate-driven increases in global terrestrial net primary production from 1982 to 1999. *Science* 300: 1560-1563.
- Niinemets, U., Flexas, J. & Peñuelas, J. (2011). Evergreens favoured by higher responsiveness to increased CO₂. *Trends Ecol. Evol.*26: 136-142.
- Norby, R., Wullschleger, S., Gunderson, C., Johnson, D. & Ceulemans, R. (1999). Tree responses to rising CO₂ in field experiments: implications for the future forest. *Plant Cell Environ* 22:683–714.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L. & McMahon, T.A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 4: 439-473.
- Piao, H., Ciais, P., Friedlingstein, P., Peylin, P., Reichstein, M., Luyssaert, S., Margolis, H. Fang, J., Barr, A., Chen, A., Guelle, A., Hollinger, D.Y., Laurila, T., Lindroth, A., Richardson, A.D. & Vesala, T. (2008). Net carbon dioxide losses of northern ecosystem in response to autumn warming., *Nature* 451: 49-52.
- Price, G.D., von Caemmerer, S., Evans, J.E., Yu, J., Lloyd, L., Oja, V., Kell, P., Harrison, K., Gallagher, A. & Badger, M.R. (1994). Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta* 193: 331–340.
- Saurer, M., Siegwolf, R. & Schweingruber, F. (2004). Carbon isotope discrimination indicates improving water-use efficiency of trees in northern Eurasia over the last 100 years. *Glob Change Biol* 10:2109–2120.

- Sabine, C.L., Field, C.B. & Raupach, M.R. (2004). The Global Carbon Cycle: Integrating Humans, Climate, and the Natural World.
- Schleser, G., & Jayasekera, R. (1985). Delta C-13-variations of leaves in forests as an indication of reassimilated CO₂ from the soil. *Oecologia* 65:536–542.
- Schleser, G.H., Frielingsdorf, J. & Blair, A. (1999). Carbon isotope behaviour in wood and cellulose during artificial aging. *Chemical Geology* 158, 121–130.
- Schuster, U. & Watson, A.J. (2007). A variable and decreasing sink for atmospheric CO₂ in the North Atlantic., *J. Geophys. Res.* 112, C11006.
- Spiker, E.C. & Hatcher, P.G. (1987). The effects of early diagenesis on the chemical and stable carbon isotopic composition of wood. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51, 1385–1391.
- Suberkropp, K. & Klug, M.J. (1976). Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecology* 57, 707–719.
- Switsur, V.R., Waterhouse, J.S., Field, E.M., Carter, A.H.C. & Loader, N.J. (1995). Stable isotope studies in tree rings from oak techniques and some preliminary results. *Pal.aoklimaforschung* 15, 129–140.
- Reheul, D. (2005). *Plantenkunde 2: Fysiologie*, W.1-W.14, ST.18-ST.21, FL.
- Roderick, M.L. & Berry, S.L. (2001). Linking wood density with tree growth and environment: a theoretical analysis based on the motion of water. *New Phytologist* (2001) 149 : 473–485.
- Ryan, M., & Yoder, B. (1997). Hydraulic limits to tree height and tree growth. *Bioscience* 47:235–242.
- Staddon P.L. (2004). Carbon isotopes in functional soil ecology. *TRENDS in Ecology and Evolution* , Vol. 19 No.3, 148-154.
- Tension Theory of Sap Ascent., van https://www.boundless.com/biology/plant-form-and-physiology/transport-of-water-and-solutes-in-plants/movement-of-water-and-minerals-in-the-xylem/images/fig-ch30_05_04/.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*, fourth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 764pp. (Reheul, D. (2005). *Plantenkunde 2: Fysiologie*).
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates. (Den Ouden, J., Muys, B., Mohren, F. & Verheyen, K. (2010). *Bosecologie en Bosbeheer*).
- Turgeon R. (2010b). The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiology* 152, 1817–1823. (De Schepper *et al.* (2013). Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany*, 64, 4839 - 4850).
- Tsuzuki, M., Miyachi, S. & Edwards, G.E. (1985). Localization of carbonic anhydrase in mesophyll cells of terrestrial 3-carbon pathway photosynthesis plants in relation to carbon dioxide assimilation. *Plant Cell Physiol* 26: 881–892.

- van der Ent, R.J., Savenije, H.H.G., Schaefli, B. & Steele-Dunne, S.C. (2010). Origin and fate of atmospheric moisture over continents. *Water resources research*, 46, W09525.
- Van der Merwe, N. & Medina, E. (1991). The canopy effect, carbon isotope ratios and food webs in Amazonia. *Journal of Archaeological Science* 18, 249–259.
- Van Ranst, E., Baert, G., Ngongo, M. & Mafuka, P. (2010). Carte pédologique de Yangambi, planchette 2: Yangambi, échelle 1:50.000. Published by UGent, Hogent, UNILU, UNIKIN, ISBN: 9789491114969
- Volokita, M., Kaplan, A. & Reinhold, L. (1981). Evidence for mediated bicarbonate transport in isolated pea (*Pisum sativum* cultivar Dan) mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 67: 1119–1123.
- Volokita, M., Kaplan, A. & Reinhold, L. (1983). Nature of the rate-limiting step in the supply of inorganic carbon for photosynthesis is isolated *Asparagus sprengeri* mesophyll cells. *Plant Physiol* 72: 886–890.
- Wassenaar, L.I. en Koehler, G. (1999). An on-line technique for the determination of the $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{17}\text{O}$ of gaseous and dissolved oxygen. National Water Research Institute, Environment Canada, *Anal. Chem.* 1999, 71, 4965-4978.
- Waterhouse, J., Switsur, V., Barker, A., Carter, A., Hemming, D., Loader, N., Robertson, I. (2004). Northern European trees show a progressively diminishing response to increasing atmospheric carbon dioxide concentrations. *Quat Sci Rev* 23:803–810.
- Worbes, M. (1995). How to measure growth dynamics in tropical trees – a review.
- Wright, S. J. (2005). Tropical forests in a changing environment. *Trends Ecol. Evol.* 20, 553–560.
- Yakir, D. (1992). Variations in the natural abundance of O-18 and deuterium in plant carbohydrates, *Plant Cell Environ*, 15, 1005-1020
- Yamori, W., Noguchi, K., Hanba, Y.T. & Terashima, I. (2006). Effects of Internal Conductance on the Temperature Dependence of the Photosynthetic Rate in Spinach Leaves from Contrasting Growth Temperatures. *Plant Cell Physiol.* 47(8): 1069–1080 (2006).

8. BIJLAGE



Figuur I: Telling van de jaarringen gebeurde met een potlood.



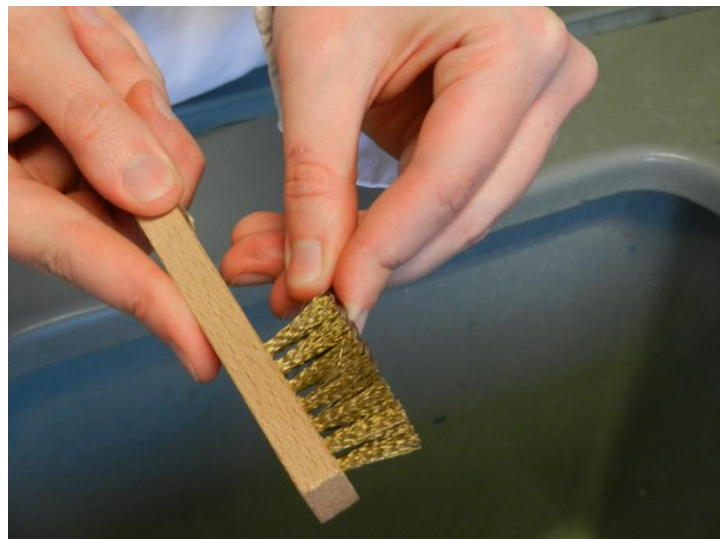
Figuur II: Vervolgens kon per jaarring geboord of gebeiteld worden, maar voldoende ver van de potloodnotities om contaminatie te vermijden.



Figuur III: Enkele beelden van het boorwerk.



Figuur IV: Elk staal werd bewaard in een genummerde capsule.



Figuur V: Na staalname van een jaarring, werd de boor telkens gewassen met een staalborstel en ethanol.



Figuur VI: Het resultaat na enkele stalen te hebben verzameld.

Tabel I: Geschatte jaarlijkse waarden van $\delta^{13}\text{C}$ en atmosferische CO_2 met de correctiefactor (Δ) nodig om de $\delta^{13}\text{C}$ waarden van de jaarringen te kunnen compenseren voor de pre-industriële standaardwaarde van -6.4% . De data zijn geïnterpoleerd door gebruik te maken van de data bekomen via Antarctische ijskernen voor atmosferisch $\delta^{13}\text{C}$ (Francey *et al.*, 1999). De geschatte waarden voor de atmosferische CO_2 concentratie (ppm) zijn afkomstig van Robertson *et al.* (2001). (McCarroll *et al.*, 2004)

Year	$\delta^{13}\text{C}$	Δ	CO_2	Year	$\delta^{13}\text{C}$	Δ	CO_2	Year	$\delta^{13}\text{C}$	Δ	CO_2
1850	-6.41	0.01	285.2	1901	-6.64	0.24	297.0	1952	-6.86	0.46	312.8
1851	-6.42	0.02	285.3	1902	-6.64	0.24	297.3	1953	-6.87	0.47	313.2
1852	-6.42	0.02	285.4	1903	-6.65	0.25	297.6	1954	-6.87	0.47	313.6
1853	-6.43	0.03	285.5	1904	-6.65	0.25	297.9	1955	-6.88	0.48	314.1
1854	-6.43	0.03	285.6	1905	-6.66	0.26	298.2	1956	-6.88	0.48	314.6
1855	-6.43	0.03	285.7	1906	-6.66	0.26	298.5	1957	-6.89	0.49	315.1
1856	-6.44	0.04	285.8	1907	-6.66	0.26	298.9	1958	-6.89	0.49	315.7
1857	-6.44	0.04	285.9	1908	-6.67	0.27	299.2	1959	-6.90	0.50	315.8
1858	-6.45	0.05	286.0	1909	-6.67	0.27	299.6	1960	-6.90	0.50	316.8
1859	-6.45	0.05	286.2	1910	-6.68	0.28	299.9	1961	-6.90	0.50	317.5
1860	-6.46	0.06	286.3	1911	-6.68	0.28	300.2	1962	-6.92	0.52	318.3
1861	-6.46	0.06	286.5	1912	-6.69	0.29	300.5	1963	-6.95	0.55	318.8
1862	-6.47	0.07	286.6	1913	-6.69	0.29	300.9	1964	-6.98	0.58	319.4
1863	-6.47	0.07	286.8	1914	-6.70	0.30	301.2	1965	-7.01	0.61	319.9
1864	-6.47	0.07	287.0	1915	-6.70	0.30	301.5	1966	-7.03	0.63	321.2
1865	-6.48	0.08	287.2	1916	-6.70	0.30	301.8	1967	-7.06	0.66	322.0
1866	-6.48	0.08	287.4	1917	-6.71	0.31	302.2	1968	-7.09	0.69	322.9
1867	-6.49	0.09	287.6	1918	-6.71	0.31	302.5	1969	-7.12	0.72	324.5
1868	-6.49	0.09	287.8	1919	-6.72	0.32	302.9	1970	-7.15	0.75	325.5
1869	-6.50	0.10	288.0	1920	-6.72	0.32	303.2	1971	-7.17	0.77	326.2
1870	-6.50	0.10	288.2	1921	-6.73	0.33	303.5	1972	-7.20	0.80	327.3
1871	-6.51	0.11	288.4	1922	-6.73	0.33	303.9	1973	-7.23	0.83	329.5
1872	-6.51	0.11	288.7	1923	-6.74	0.34	304.2	1974	-7.26	0.86	330.1
1873	-6.51	0.11	288.9	1924	-6.74	0.34	304.6	1975	-7.29	0.89	331.0
1874	-6.52	0.12	289.1	1925	-6.74	0.34	304.9	1976	-7.32	0.92	332.0
1875	-6.52	0.12	289.4	1926	-6.75	0.35	305.2	1977	-7.34	0.94	333.7
1876	-6.53	0.13	289.7	1927	-6.75	0.35	305.6	1978	-7.37	0.97	335.3
1877	-6.53	0.13	289.9	1928	-6.76	0.36	305.9	1979	-7.40	1.00	336.7
1878	-6.54	0.14	290.2	1929	-6.76	0.36	306.2	1980	-7.43	1.03	338.5
1879	-6.54	0.14	290.5	1930	-6.77	0.37	306.5	1981	-7.46	1.06	339.8
1880	-6.55	0.15	290.8	1931	-6.77	0.37	306.8	1982	-7.48	1.08	341.0
1881	-6.55	0.15	291.1	1932	-6.78	0.38	307.1	1983	-7.51	1.11	342.6
1882	-6.55	0.15	291.4	1933	-6.78	0.38	307.4	1984	-7.54	1.14	344.3
1883	-6.56	0.16	291.7	1934	-6.78	0.38	307.7	1985	-7.57	1.17	345.7
1884	-6.56	0.16	292.0	1935	-6.79	0.39	308.0	1986	-7.60	1.20	347.0
1885	-6.57	0.17	292.3	1936	-6.79	0.39	308.3	1987	-7.62	1.22	348.8
1886	-6.57	0.17	292.6	1937	-6.80	0.40	308.5	1988	-7.65	1.25	351.3
1887	-6.58	0.18	292.9	1938	-6.80	0.40	308.8	1989	-7.68	1.28	352.8
1888	-6.58	0.18	293.1	1939	-6.81	0.41	309.1	1990	-7.71	1.31	354.0
1889	-6.58	0.18	293.4	1940	-6.81	0.41	309.3	1991	-7.74	1.34	355.5
1890	-6.59	0.19	293.7	1941	-6.82	0.42	309.5	1992	-7.77	1.37	356.3
1891	-6.59	0.19	294.0	1942	-6.82	0.42	309.8	1993	-7.79	1.39	357.0
1892	-6.60	0.20	294.3	1943	-6.82	0.42	310.0	1994	-7.82	1.42	358.9
1893	-6.60	0.20	294.6	1944	-6.83	0.43	310.2	1995	-7.85	1.45	360.9
1894	-6.61	0.21	294.9	1945	-6.83	0.43	310.5	1996	-7.88	1.48	362.7
1895	-6.61	0.21	295.2	1946	-6.84	0.44	310.8	1997	-7.91	1.51	363.8
1896	-6.62	0.22	295.5	1947	-6.84	0.44	311.0	1998	-7.93	1.53	365.5
1897	-6.62	0.22	295.8	1948	-6.85	0.45	311.3	1999	-7.96	1.56	367.0
1898	-6.62	0.22	296.1	1949	-6.85	0.45	311.7	2000	-7.99	1.59	368.5
1899	-6.63	0.23	296.4	1950	-6.86	0.46	312.0	2001	-8.02	1.62	370.0
1900	-6.63	0.23	296.7	1951	-6.86	0.46	312.4	2002	-8.05	1.65	371.5
								2003	-8.07	1.67	373.0