

MASTER: INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRARIAS Y
DEL MEDIO NATURAL

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Evaluación fenológica de la transpiración
residual en los abetos mediterráneos *Abies
alba Mill.* y *Abies pinsapo Boiss.*

Autor: Gonzalo Barredo de Valenzuela Corral

Dirigido por:

Eustaquio Gil Pelegrín

José Javier Peguero Pina

Universidad de Zaragoza

Escuela Politécnica Superior de Huesca



Huesca, 30 de noviembre de 2012

ÍNDICE DE MATERIAS

<u>1.- INTRODUCCIÓN</u>	<u>5</u>
1.1.- Antecedentes.....	5
1.2.- Presentación de las especies implicadas.....	5
1.3.- Transpiración residual	7
1.4.- Estimación de la transpiración residua y de la resistencia cuticular: fundamentos teóricos	9
<u>2.- OBJETIVOS.....</u>	<u>12</u>
<u>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>13</u>
3.1.- Lugares de estudio.....	13
3.1.1.- Localización.....	13
3.1.2.- Análisis climático	14
3.2.- Metodología	16
3.2.1.- Transpiración residual	16
3.2.2.- Cálculo del área foliar.....	19
3.3.- Análisis estadístico	22
3.3.1.- Transpiración residual	22
<u>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>25</u>
4.1.- Transpiración residual	25
4.1.1.- Comparación de la evolución de la transpiración de ambas especies en condiciones de campo.....	26
4.1.2.- Comparación de la evolución de la transpiración de ambas especies en “ <i>common garden</i> ”.....	28
4.1.3.- Comparación de la evolución de la transpiración de cada especie entre las condiciones de campo y las de “ <i>common garden</i> ”	29
4.1.4.- Discusión	31
4.2.- Cálculo del área foliar	32
<u>5.- CONCLUSIONES</u>	<u>34</u>
<u>6.- PROPUESTAS PARA ESTUDIOS FUTUROS</u>	<u>36</u>
<u>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>37</u>

RESUMEN

Este trabajo forma parte de un estudio a mayor nivel de la fisiología y características ecológicas de las dos especies del género *Abies* que se encuentran en la Comunidad Autónoma de Aragón, el abeto blanco (*A. alba*) y el pinsapo (*A. pinsapo*).

Concretamente en este trabajo se ha querido comparar el funcionamiento interno de cada especie e intentar comprender y analizar las diferentes respuestas de cada una de ellas a los climas tan diferenciados en los que se localizan, teniendo en cuenta su proximidad genética.

Para ello se ha analizado la evolución de la “maduración” de los tejidos foliares de cada especie a lo largo del periodo vegetativo, a través de la transpiración residual. Esta transpiración residual, definida como aquella transpiración que se realiza a través de los sistemas pasivos que completan el aislamiento hídrico del vegetal, en concreto la cutícula y la epidermis foliares, está muy relacionada con el desarrollo de los tejidos al no tener en cuenta el dispositivo de cierre y apertura estomática, mecanismo muy desarrollado en estas especies.

Dicha transpiración se ha estudiado para ambas especies en su hábitat natural de para el *A. alba*, recogiendo las muestras en el barranco de Gamueta localizado en el término Municipal de Ansó (Huesca) y en la Sierra de Santa Cruz, cerca de la localidad de Orcajo (Zaragoza) para el *A. pinsapo* donde existe una masa procedente de regeneración artificial, pero cuya adaptación al nuevo clima ha sido inmejorable, dado el estado de vigor de los individuos así como la regeneración apreciada. Dichos resultados se han comparado con los obtenidos para cada especie en un clima intermedio y evaluar así los posibles mecanismos de adaptación de cada especie.

En definitiva se intenta comprender si las adaptaciones de cada especie a sus diferentes climas son de tipo fenotípico o sin embargo tienen una justificación

más fenotípica con lo que quería decir que poseen una mayor capacidad de adaptación a distintos tipos de climas.

Tras los ensayos propuestos se ha determinado que los mecanismos de adaptación que poseen las dos especies están muy desarrollados ya que se aprecia una adaptación clara de ambas especie a un clima que dista de su óptimo, más acusados en el *A. alba*.

Por otro lado, se ha realizado un experimento para facilitar el cálculo en posteriores estudios del área foliar total de cada brote analizado, ya que se necesita para el cálculo ortodoxo de la transpiración residual. En este sentido, se ha podido comprobar que intentar relacionar la superficie foliar de una acícula con su longitud es un buen camino para simplificar el cálculo de la transpiración residual ya que simplifica en sobremanera dicho cálculo al tener que medir exclusivamente la longitud de la acícula para saber su superficie, parámetro de mucha más sencilla medición.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ANTECEDENTES

El trabajo de fin de máster se inicia en colaboración con la Unidad de Recursos Forestales del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.

Dicha Unidad ha venido realizando diversos estudios ecofisiológicos de las dos especies de abetos mediterráneos presentes en Aragón con el objetivo de analizar las posibles causas de los recientes procesos de decaimiento de las masas de *Abies alba* y definir el potencial de expansión del *Abies pinsapo* en un contexto de cambio global.

Este trabajo propuesto para la finalización del máster surge como una parte de dicho estudio.

1.2.- PRESENTACIÓN DE LAS ESPECIES IMPLICADAS

El concepto de 'Abetos mediterráneos' refiere a un grupo de especies pertenecientes al género *Abies* que ocupan áreas desconectadas a lo largo de toda la cuenca mediterránea (Aussenac 2002). Estos abetos fueron inicialmente clasificados en dos secciones diferentes dentro del género según criterios morfológicos (Farjon y Rushforth 1989), pero estudios genéticos más recientes demostraron que estaban relacionados más directamente, constituyendo un grupo monofilético (Scaltsoyiannes et al. 1999, Suyama et al. 2000, Xiang et al. 2009), en que se incluyen nueve especies y un híbrido natural (Vidal 1991).

Entre ellos, el abeto blanco (*Abies alba* Mill.) es la especie que presenta un hábitat más extenso. Se trata de una especie propia de regiones templadas y frías no áridas del hemisferio boreal. Se extiende por las cordilleras del Centro y Sur de Europa: Alpes, Jura, Cevennes, Vosgos, Cárpatos, Selva Negra, Bohemia, Tatra, Rhodope, Pirineos, Apeninos, Macedonia y Córcega. En el norte de Europa es una especie que habita en zonas llanas. En España se localiza exclusivamente en el área pirenaica, generalmente en la parte superior del piso montano y en la parte

inferior del subalpino, desde Navarra (valle de Irati) hasta Gerona y Barcelona (Macizo del Montseny). En la Comunidad Autónoma de Aragón se localiza por lo tanto en Huesca a lo largo de todos los pirineos, desde los valles más occidentales de Ansó y Hecho hasta el término municipal de Benasque. El límite meridional se localiza en la sierra de Guara, exclusivamente en su cara norte.

Esta especie requiere un clima húmedo, con sequía estival no muy acusada. Es resistente al frío aunque se ve muy perjudicado por las heladas tardías. En los pirineos, la precipitación en las mejores masas suele alcanzar los 1000 mm anuales aunque en zonas de umbría puede vivir con precipitaciones de 750 mm a 800 mm anuales. En cuanto a la temperatura, las medias de enero están comprendidas entre 0 y 5° C y las de agosto suelen ser inferiores a 18° C. Su temperatura mínima umbral es de - 35° C, lo que quiere decir que soporta bien el frío intenso. Sin embargo, al comenzar su ciclo vegetativo relativamente pronto, las heladas tardías en primavera pueden comprometer su supervivencia, por lo que huye de la continentalidad acusada.

Por el contrario, las otras especies de abetos mediterráneos tienen un estatus relictos, viviendo bajo condiciones geográficas y ecológicas muy específicas (Linares 2011). Este es el caso de la otra especie estudiada, el pinsapo (*Abies pinsapo*), localizada exclusivamente en la Cadena caliza de Yebala, en los macizos de Tazot y Magot al norte de Marruecos y en la Cordillera Bética en la Península Ibérica. En nuestro país se localiza principalmente en tres núcleos, dos en la provincia de Cádiz y un tercero en la provincia de Málaga: Sierra de las Nieves (Ronda), Sierra del Pinar (Grazalema) y Sierra Bermeja (Estepona). La superficie total se estima en unas 4000 ha, con más de 3000 ha localizadas en la Sierra de las Nieves. En la Comunidad Autónoma de Aragón, cabe destacar una masa de origen artificial situada en la Sierra de Santa Cruz perteneciente a la Comarca de Daroca cuyo estado de conservación y vigor vegetativo se consideran adecuados.

Por lo tanto, esta especie vive en climas submediterráneos de montaña húmeda, con gran exigencia hídrica en comparación con el abeto blanco. Recibe un mínimo de 700 mm de precipitación anuales, alcanzando un máximo de 2000 mm en la Sierra del Pinar en Grazalema. Busca las zonas frescas para aguantar la falta de precipitaciones en verano, que generalmente superan los 100 mm, alcanzando 150 mm en Grazalema. En las zonas donde habita esta especie las lluvias no están muy bien repartidas ya que el mayor montante se da en otoño y en primavera, a veces torrencialmente. En cuanto a las temperaturas, la media anual oscila entre los 12 y 15° C, durante el periodo vegetativo es de unos 20° C, y en los meses más fríos entre los 3 y los 5° C. Las máximas absolutas son de unos 36° C y las mínimas de de -8 a -10° C, las heladas son poco numerosas durante 1 o 2 meses al año.

Por lo tanto, los datos expuestos anteriormente indican que se trata de dos especies que están muy relacionadas genéticamente pero que habitan en condiciones climáticas muy distintas. *A. pinsapo* es una especie que tiene que soportar un clima mediterráneo con un verano seco de junio a septiembre (Fernández-Cancio et al., 2007), debiendo enfrentarse a un período de estrés hídrico cuando la precipitación alcanza un mínimo y la evaporación alcanza un máximo. En contraste, *A. alba* está acostumbrado a veranos no muy secos y con una humedad relativa muy superior.

Estas diferencias han motivado la realización de este estudio, que parte de la idea de intentar evaluar la respuesta de cada una de esta dos especies a los diferentes climas asociados a cada una de ellas, mediante su adaptación fenológica y/o fenotípica.

1.3.- TRANSPIRACIÓN RESIDUAL

La génesis de sistemas reguladores de la pérdida de agua hacia el exterior de la planta se considera como un elemento clave en el paso de los vegetales hacia la vida terrestre, asegurando que puedan desarrollarse en la vertical sin la dependencia del aporte inmediato de agua desde las partes sumergidas.

Tales sistemas marcan el "camino" hídrico desde el interior de las células de la hoja de un cormófito típico hacia la atmósfera, en un proceso complejo denominado **transpiración**. Este proceso ha sido interpretado de un modo análogo al funcionamiento de un circuito eléctrico, considerando una fuerza motriz (el gradiente de potencial hídrico entre los puntos antes mencionados) y un sistema de "resistencias" al flujo de agua.

De todas estas resistencias, es la impuesta por el complejo estomático la más estudiada y conocida. Se comporta de un modo variable, estando sometida a regulación por el vegetal en función de su estado fisiológico y de la información transmitida por el ambiente. (Kaufmann 1975, Cowan 1972, Leverenz et al. 1982). En situaciones de sequía edáfica prolongada, los estomas permanecen cerrados, reduciéndose la transpiración de un modo drástico (Tranquillini 1976).

Las especies de abetos mediterráneos se caracterizan por una alta sensibilidad de los estomas a descensos en la humedad relativa del aire (Guehl et al. 1991), lo que supone que estas especies puedan estar gran parte del verano con los estomas cerrados para minimizar las pérdidas de agua bajo condiciones de gran demanda atmosférica. Por lo tanto, bajo estas condiciones, la transpiración residual puede jugar un papel clave en el funcionamiento de estas especies, una vez que los estomas están completamente cerrados.

Por lo tanto, para este estudio no se ha pretendido calcular la pérdida de agua que puede controlar el vegetal (flujo estomático), sabiendo además, como ha quedado expuesto anteriormente, que dichos mecanismos de regulación del flujo hídrico funcionan perfectamente en ambas especies, sino que se ha querido calcular aquella transpiración que el vegetal no puede controlar. Es decir, aquellas pérdidas de agua a través de los sistemas pasivos que completan el aislamiento hídrico del vegetal, por lo que ha sido llamada "**transpiración residual**" en algunas ocasiones (Grace 1989). Tales sistemas están constituidos por el conjunto epidérmico

(epidermis y cutícula) y la capa límite, zona próxima a la hoja donde la dinámica del aire responde a un régimen de flujo laminar.

Sin embargo, en este estudio no se analiza la evolución a lo largo del tiempo de la **transpiración residual** para evaluar el adecuado desarrollo de la epidermis y la cutícula como aislante frente a las pérdidas de agua, sino para acercarnos a un análisis fenológico de ambas especies y relacionar así una evolución de la resistencia residual con un concepto de "**maduración**". En este sentido, se emplea la resistencia residual como un elemento más en la comprensión del desarrollo fenológico de cada especie. Por lo tanto, se evaluarán si las diferencias en el clima de ambas especies, principalmente en los meses más calurosos, pueden implicar un diferente comportamiento en cuanto al desarrollo de mecanismos para evitar las pérdidas de agua.

1.4.- ESTIMACIÓN DE LA TRANSPIRACIÓN RESIDUA Y DE LA RESISTENCIA CUTICULAR: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La medida más simple de las tasas de pérdida de agua tras el cierre estomático se realiza mediante el registro del cambio en peso de hojas o brotes escíncidos (Kaul & Kramer 1965, Slavik 1974). Cuando tales pérdidas de peso son constantes en el tiempo se considera que todos los estomas permanecen cerrados, habiéndose alcanzado la **transpiración residual** (Hygen 1953). Este procedimiento manifiesta claros problemas de estandarización, lo que dificulta la comparación de resultados.

Un paso adelante lo constituyen los estudios donde se buscan procedimientos que permitan comparar los valores obtenidos en distintas especies y en distintos momentos (Sowell et al. 1982). En este sentido, el empleo de túneles experimentales, donde se controlan las condiciones de viento, temperatura, iluminación y humedad relativa (Baig & Tranquillini 1980) parecen ser una solución muy próxima al

óptimo. En su defecto, las "cámaras de humedad" (Slatyer 1958) permiten generar ambientes constantes, al menos en términos de humedad y temperatura.

A partir de las pérdidas de peso, y aceptando estas como manifestación del flujo de agua, se puede llegar a calcular la resistencia cuticular (en $s.m^{-1}$) para las condiciones del experimento a partir de la expresión (Schönherr 1976a):

$$r_{cut} = (DC_v \cdot 1 E) - r_{cl}$$

donde DC_v es el gradiente de humedad absoluta entre el apoplasto y la atmósfera que rodea la hoja; E es la pérdida de peso y r_{cl} es la resistencia de la capa límite (en las mismas unidades que la cuticular). El valor de la resistencia de la capa límite se calcula a partir de su espesor estimado y del coeficiente de difusión del vapor de agua en el aire.

Sin embargo los grandes avances en el conocimiento de la fisiología cuticular se han producido a partir del desarrollo de procedimientos que permitieran su aislamiento, en aquellas cutículas donde esto es posible, mediante métodos de ataque químico (Holloway & Baker 1968) o de digestión enzimática (Orgell 1955, Baker & Rocopiou 1975, Schönherr 1974), que producen pocas o nulas alteraciones estructurales o funcionales (Hoch 1975, Schönherr et al. 1979). Sin embargo, dichos estudios desarrollados mediante estas técnicas son aplicables estrictamente a la cutícula, aceptándola como unidad funcional. No resuelven el problema de aquellas situaciones donde todo el complejo epidérmico parece estar implicado en el proceso, por cuanto los sistemas de aislamiento, químicos o

enzimáticos, se basan, en la acción sobre la banda de pectina o sobre el esqueleto celulósico de la pared. Por tanto, pretender aislar de este modo epidermis funcionales parece casi imposible.

Esto ha obligado al cálculo de la resistencia residual, a partir de la estimación del flujo de agua por pérdida de peso en hojas escindidas, aceptando el gradiente de humedad absoluta como fuerza motriz del proceso (Slatyer 1967, Kramer 1983). Para ello, se han tenido que calcular la pérdida de peso de cada muestra por unidad de tiempo y el área foliar de cada brote para poder expresar la pérdida de peso por superficie.

Sin embargo para este estudio, no ha sido posible determinar de una manera fiable la superficie total foliar de cada brote, con lo que la evolución de la pérdida de peso debida a la transpiración residual se ha relacionado con el peso propio de la muestra. De esta manera, sin ser ortodoxa, se podrá evaluar la “maduración” de una manera semejante ya que se presupone que el peso de la muestra y su superficie están muy relacionados. En cualquier caso, en este estudio se inicia el camino para realizar el cálculo del área foliar, con el objetivo de encontrar alguna relación ente variables que pudiese simplificar su cálculo.

2.- OBJETIVOS

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

- Establecer las posibles diferencias en el ritmo de maduración de los brotes de *Abies alba* y *A. pinsapo* en términos de la transpiración residual.
- Comparar este ritmo evolutivo en condiciones naturales y en coexistencia (*Common Garden*).
- Discutir las posibles diferencias en términos ecológicos dadas las marcadas diferencias en el hábitat de ambas especies.
- Intentar establecer alguna relación entre el área foliar y alguna de las variables morfológicas más fácilmente medibles.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- LUGARES DE ESTUDIO

3.1.1.- Localización

Dado el ámbito de este estudio se ha considerado imprescindible que las poblaciones de abetos estudiadas se encuentren en la Comunidad Autónoma de Aragón.

La primera población estudiada compuesta por ejemplares de abeto blanco (*Abies alba*) se encuentra en el barranco de Gamueta localizado en el término municipal de Ansó (Huesca), formando parte del Parque Natural de los valles Occidentales. Se trata de un pequeño barranco dirección Este-Oeste, en cuya umbría se localiza el abetar. Se trata de una localización de fácil acceso excepto en los meses centrales del invierno por las nieves. Para el tránsito y las recogidas de muestras se pidió permiso al Director del Servicio Provincial de medio Ambiente de Huesca, responsable de su gestión.

La segunda población objeto de estudio es una masa de pinsapos (*A. pinsapo*) procedente de plantación, situada en la cara norte de la Sierra de Santa Cruz, próxima a la localidad de Orcajo (Zaragoza), en la Comarca de Daroca. Se trata de una masa de origen artificial que fue repoblada en el año 1913 mezclada con otras especies arbóreas como el pino laricio (*Pinus nigra* subsp *salzmannii*), pino resinero (*P. pinaster*) y pino carrasco (*P. halepensis*), en el monte de Utilidad Pública denominado Fuentes del Villar. En esta localización, el pinsapo se ha adaptado extraordinariamente bien, hecho demostrado por el buen estado de los individuos y la excelente regeneración en dicha zona, por lo tanto se trata de una asilvestrada, es decir adaptada a las condiciones climáticas y de resto de valores de la estación. Este hecho ha sido lo que ha motivado la inclusión de esta población y esta especie en este estudio.

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, se han comparado los resultados obtenidos con individuos aislados de ambas especies, en condiciones de coexistencia (*Common Garden*), procedentes de regeneración artificial. Los individuos escogidos, de ambas especies, están localizados en el término municipal de Jaca, a 7 Km al oeste de su capital. En concreto se localizan en las instalaciones del Instituto de Formación Agroambiental de Jaca (Huesca) situado en el valle del río Aragón entre las localidades de Jaca y Santa Cilia de Jaca. Se ha escogido dicho lugar ya que el clima de la zona se considera un clima intermedio al de cada especie, pudiendo, de esta manera, evaluar las adaptaciones de cada especie a este nuevo clima.

3.1.2.- Análisis climático

Los datos meteorológicos correspondientes al clima de las poblaciones de Orcajo y Gamueta se han tomado de la Agencia Estatal de Meteorología. Sin embargo, los correspondientes a los individuos en condiciones climáticas intermedias situados en el Instituto de Formación Agroambiental, se han tomado de la propia estación que posee el centro.

Unas de las características que se ha querido analizar ha sido la aridez de cada clima. Se ha considerado que este parámetro relacionado en gran medida con el potencial hídrico de cada ambiente y la humedad relativa del aire, características relacionadas directamente con la transpiración residual, objeto de cálculo de este estudio.

Por lo tanto para contrastar los valores intermedios de la zona elegida, se han comparado, además de la temperatura y la precipitación, índices calculados para cuantificar la aridez de cada zona de estudio.

Para cuantificar la aridez, se calcularon el índice de aridez de Martonne ($P/(T+10)$), donde P es la precipitación anual en mm y T es la temperatura media anual de en ° C) y el índice de Gaussen (los números de meses en que $P < 2T$, donde P es la precipitación mensual en mm y T es la temperatura media mensual en ° C).

A continuación se expone una tabla resumen con los datos relevantes para el estudio del clima de cada zona:

Tabla 1: Características climáticas de los lugares de estudio

CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DE LOS LUGARES DE ESTUDIO			
ESPECIES	<i>A. alba</i>	<i>A. pinsapo</i>	<i>A.alba y A. pinsapo</i>
LOCALIZACIÓN	Gamueta	Orcajo	Jaca
LATITUD: (N)	42° 52''	41° 05'	42° 34'
LONGITUD (O)	0° 47''	1° 30'	0° 32' 58''
Altitud (m s.n.m.)	1350	1150	818
TMA/TMest (°C)	7.3/16.0 0	10.8/19.1	8,2/17,8
TAP/TSP (mm)	1562/229	452/92	813/74
IAMARTONNE	90	22	45
ÍNDICE DE GAUSSEN	0	2	0

Como se puede comprobar a la vista de los datos expuestos, tanto con los datos de precipitación y temperatura, como con el valor de los índices calculados, el clima correspondiente a la zona de “*Common garden*” tiene valores intermedios, con lo que se cumplen los condicionantes de su elección.

3.2.- METODOLOGIA

Por lo tanto en este estudio, se han realizado dos experimentos que se pueden considerar independientes; el primero, la medida de la pérdida de peso de agua correspondiente a la transpiración residual por unidad de tiempo y unidad de peso de la muestra y, el segundo, la medida del área foliar de acículas de *A. alba* y *A. pinsapo*.

El objetivo del primero es analizar la evolución y maduración a lo largo del periodo vegetativo de los tejidos foliares, epidermis y cutícula, a través de la transpiración residual. El objetivo del segundo es relacionar el área foliar con otro parámetro de más fácil medición, y de esta manera poder calcular dicha superficie de una manera más sencilla y rápida en próximos experimentos.

Para cada uno de estos experimentos se han tomado muestras independientes y se ha utilizado metodologías diferentes, de modo que en este apartado se tratarán por separado.

3.2.1.- Transpiración residual

Para la realización de este experimento se han tomado muestras de brotes de las dos especies descritas y en las tres localizaciones presentadas, a lo largo de toda su maduración, desde inicio del verano del 2012 hasta final de otoño de ese año a intervalos de cinco semanas aproximadamente, siguiendo la metodología descrita en Anfodillo et al., (2002). En concreto, las muestras se han recogido desde el 1 de junio del 2012 hasta el 17 de noviembre de 2012. Así, se han cogido 4 muestras para cada especie y localización a lo largo de los meses de junio, julio agosto, septiembre y noviembre. Se han cogido 4 muestras de *A. alba* de la población de Gamueta (Aa GAM), 4 muestras de *A. pinsapo* de la población de Orcajo (Ap ORC), y 4 muestras de ambas especies pertenecientes a ejemplares aislados procedentes de regeneración artificial en el Instituto de Formación Agroambiental de Jaca (Aa ESC y Ap ESC),

haciendo un total de 16 muestras.

A continuación se presenta una tabla relacionando las fechas de recogidas de cada muestra en función de la especie y la población de origen:

Tabla 2: Fechas de recogida muestras

FECHAS DE RECOGIDA MUESTRAS			
ESCUELA		GAMUETA	ORCAJO
Aa	Ap	Aa	Ap
03/07/2012			
		13/07/2012	
28/07/2012			
		15/08/2012	
08/09/2012			
		18/10/2012	
27/10/2012			
			09/11/2012
		17/11/2012	

En cada población y para cada especie se tomaron braquiblastos enteros a partir de brotes pertenecientes a ejemplares distintos, considerados como submuestras independientes. Dichos braquiblastos se rehidrataron mediante inmersión de la parte cortada del tallo en agua destilada durante 24 horas a 4° o C (Hadley & Smith 1986 ,Sowell et al. 1982), cubriéndolos con papel secante húmedo y se mantuvieron en esas condiciones en el interior de una bolsa de plástico que fue sellada al contenedor mediante una goma.

Una vez conseguida la rehidratación, se cortaron 10 brotes terminales del año de cada muestra, de una longitud aproximada de 2 centímetros, formando las 10 submuestras de cada muestra. Dicho corte se realizó con un cúter con la muestra sumergida en agua destilada para minimizar las pérdidas de agua. A continuación, se sellaron los cortes con pegamento de secado rápido para evitar posibles pérdidas posteriores de agua durante la realización de las medidas.

Los 10 brotes de cada muestra, una vez hidratados y sellados, se introdujeron en una cámara, donde se realizó el experimento. En dicha cámara se dispuso una cama de gel de sílice en la base (Schonherr & Lenzian 1981) a modo de desecador, dado a que este gel capta toda la humedad ambiente. Se cubrió la parte superior con una cubierta de plástico en la cual se insertó un pequeño motor eléctrico con un ventilador con el objetivo de extraer del interior la humedad perdida por los brotes y mantener así un ritmo de desecación constante en función de las condiciones exteriores. Este sistema empleado en la medida del flujo de agua asegura una constancia en la humedad relativa a lo largo del proceso, eliminando la influencia del viento, por realizarse éste en ambiente confinado (Sowell et al. 1982). La temperatura, sin posibilidades de regulación, ha sido recogida a lo largo del proceso. Este parámetro se mantuvo constante en cada experimento (con oscilaciones máximas de 0.5 o 1° C) pero no así a lo largo de la estación, donde se recogieron diferencias de 7 o 8° C entre las medidas de Junio y las de Noviembre.

Cada brote de cada muestra se pesó a intervalos regulares de aproximadamente 3 horas con una balanza de precisión analítica de 10^{-4} gramos. El intervalo de la toma de los pesos de cada brote se prolongado hasta que la tasa de transpiración se ha mantenido a lo largo del tiempo, considerando este valor de la tasa correspondiente al proceso de transpiración residual. Dichos intervalos de toma de pesos se ha prolongado entre 40 y 50 horas, dependiendo de cada muestra.

La tasa de transpiración se calcula como el cociente entre la pérdida de peso y el tiempo, dividido por el área foliar expuesta (Burghardt y Riederer, 2003). Sin embargo, debido a que el material vegetal iba a ser destinado posteriormente a la realización de diversos análisis relacionados con la composición de las ceras de cutícula y su evolución a lo largo de la maduración de los tejidos, se prefirió no destruir más material para el cálculo independiente del área foliar. Por lo

tanto, en nuestro caso, la tasa de transpiración se ha calculado mediante el cociente entre la pérdida de peso por unidad de tiempo dividido por gramo de muestra, con lo que las unidades son $\text{g. H}_2\text{O} \times \text{g muestra}^{-1} \times \text{hora}^{-1}$, parámetro que como ya se ha comentado anteriormente, no supone una grave distorsión en cuanto al análisis de la maduración de los tejidos.

3.2.2.- Cálculo del área foliar

En este estudio se ha intentado relacionar el área foliar de las acículas de cada brote de los abetos seleccionados, con otro parámetro de medición más sencillo para facilitar su cálculo en futuros ensayos.

En primer lugar se pensó en intentar encontrar una relación mediante una curva de regresión entre el área foliar total de un brote por cada centímetro de longitud del mismo con la longitud de la acícula más larga presente en el brote, para así tener que medir sólo esa longitud para calcular el área total. Una vez iniciados los ensayos y análisis estadísticos correspondientes nos dimos cuenta que para obtener una relación representativa de esta manera, sería necesario medir un número excesivo de muestras y por lo tanto, calcular el área de demasiadas acículas, teniendo en cuenta además que se deberían de realizar distintos ensayos para cada especie, cada localización y para cada época.

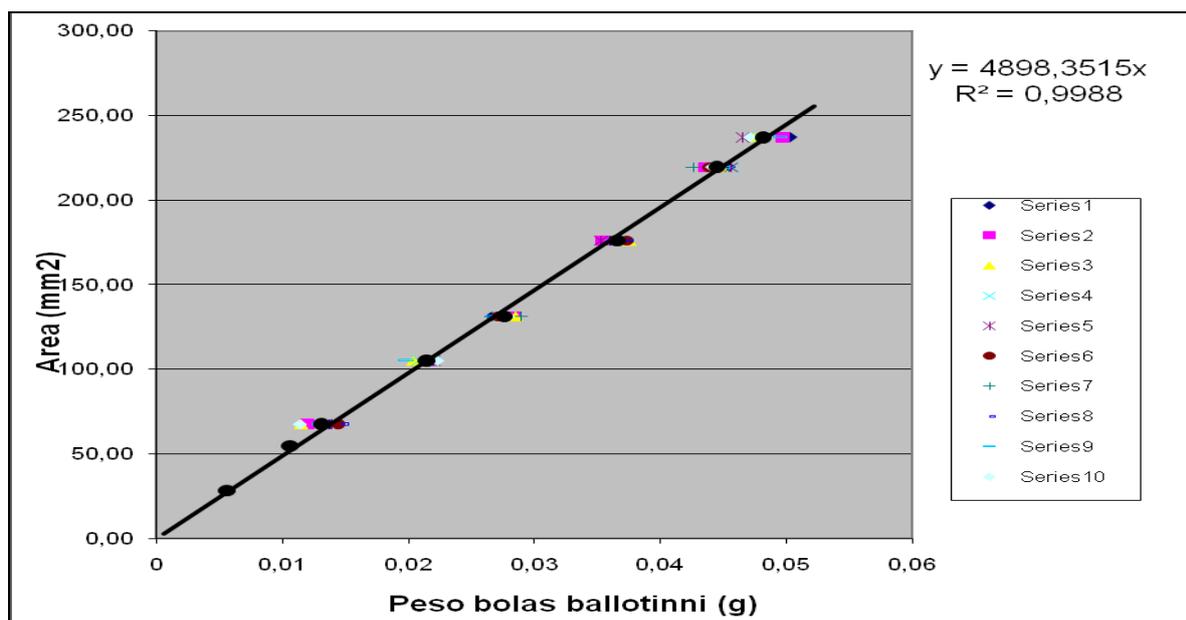
Por lo tanto, lo que se ha realizado en este estudio es un ensayo mucho menos ambicioso y, a modo de prueba, se ha determinado la relación que existe entre la longitud de cada acícula para cada especie una vez ya madurado el tejido de los brotes (durante el mes de noviembre). De esta manera, se ha podido evaluar la posibilidad de intentar expresar esta relación para cada especie, localización y época en ensayos futuros.

La superficie foliar se ha calculado mediante el método de Thompson y Leyton (1970), basado en el incremento de peso motivado por la formación de una

monocapa de esferas de vidrio (0,1 mm de diámetro), denominadas esferas de Ballotini en toda la periferia de la acícula, tras una calibración mediante elementos de área conocida. Para realizar esta calibración se han pesado la esferas de Ballotini impregnadas gracias a un adhesivo en spray en cilindros del mismo diámetro pero de distintas longitudes.

Tras dicha calibración, se ha encontrado una relación, a través de una regresión lineal, que se presenta a continuación:

Gráfico 1: Regresión área foliar/peso bolas Ballotinni



Para el cálculo de la superficie foliar de cada acícula se han impregnado igualmente las acículas con el mismo adhesivo, insertándolas en una aguja, tarando el conjunto (acícula, pinzas, aguja y adhesivo) y posteriormente sumergiendo el conjunto por completo en un recipiente con las esferas de Ballotini, quedándose adheridas una sola capa en la superficie exterior de cada acícula. Con el peso de la totalidad de las esferas adheridas se ha utilizado la ecuación de regresión determinada anteriormente y se ha calculado la superficie de cada acícula. Para dicho experimento se han medido unas 115 acículas de *A. alba* con unas longitudes entre 7 y 24 mm y, 106 acículas de *A. pinsapo* con unas longitudes entre 3 y 15 mm.

Una vez hecho esto, se ha intentado obtener una ecuación de regresión que relacionase la longitud de cada acícula y su área foliar.

3.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.3.1.- Transpiración residual

La tasa de transpiración correspondiente con la fracción residual se ha expresado como el promedio de todos los valores de la tasa final, una vez estabilizada, exceptuando aquellas muestras que se ha alejado de una manera sensible al resto, seguramente debido a un fallo en el proceso saturación o sellado de la herida provocada. Concretamente esto ha sucedido con la submuestra 5 de los individuos localizados en Jaca el 3 de julio y con la submuestra 4 correspondiente a la población de *A. alba* de Gamueta recogida el 17 de noviembre.

Tanto el promedio como el error estándar de cada punto calculado, este último, como el cociente entre la desviación estándar y la raíz cuadrada del número de casos, se han estimado con la ayuda de la hoja cálculo Excel. Sin embargo, la representación gráfica se ha realizado gracias al programa

3.3.2.- Relación area foliar/longitud acícula

En primer lugar, se ha realizado un calibrado previo según exigía el método empleado. Dicho calibrado ha consistido en realizar unas pruebas previas para relacionar el peso total de las bolas de Ballotinnni con la superficie correspondiente. Dicha relación tenía que ser muy fiable, ya que de ella se obtenían el resto de los datos. Tanto la fórmula de regresión que los relaciona como su representación gráfica se han obtenido con la hoja de cálculo *Excel*. Dicho cálculos se han expuesto en el apartado material y métodos ya que no representan ningún resultado sino simplemente son la forma de llegar a estos.

No obstante, se necesitaba un buen ajuste con lo que se estableció valor mínimo del coeficiente de determinación múltiple R^2 de 0,98. Se ha preferido escoger esta variable en lugar de coeficiente de correlación múltiple R , ya que este establece una medida del grado de asociación lineal entre la variable respuesta y la recta

de regresión estimada. Sin embargo, el coeficiente R^2 se puede interpretar como el porcentaje de variabilidad de Y explicada o debida a la recta de regresión, lo que se considera más explicativo.

Afortunadamente, la regresión encontrada ha tenido un gran ajuste con un R^2 muy superior al establecido como mínimo ($R^2=0,9988$)

Una vez realizado el calibrado, se ha procedido a medir las distintas superficies de cada hoja y se han relacionado con la variable longitud de acícula.

Para relacionar el área foliar de cada acícula con su longitud se ha realizado una regresión lineal con la ayuda del programa de software libre R. En concreto, tanto para el cálculo de la función de ajuste como para la representación gráfica se ha empleado el paquete Rcommander.

Se han realizado dos regresiones lineales relacionando la longitud de acícula con su área foliar, la primera con acículas de *A. alba* y la segunda con acícula de *A. pinsapo*

Los datos obtenidos por el R son los siguientes:

Tabla 3: Regresión Long Acic/área Fol para *A. alba*

```
Call:
lm(formula = LONG.ACÍC ~ ÁREA.FOL, data = Datos)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-5.2592 -1.5066  0.1559  1.6621  4.6574

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  3.829871   0.595513   6.431   3e-09 ***
ÁREA.FOL     0.170286   0.008558  19.899 <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.097 on 115 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.7749, Adjusted R-squared:  0.773
F-statistic:  396 on 1 and 115 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

Tabla 4: Regresión Long Acic/área Fol para *A. pinsapo*

```

Call:
lm(formula = LONG.ACÍC ~ ÁREA.FOL, data = Datos)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-3.4325 -0.9521 -0.0527  0.9255  3.1399

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  2.348725   0.307751   7.632 1.06e-11 ***
ÁREA.FOL     0.155501   0.006849  22.703 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 1.375 on 106 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8294, Adjusted R-squared:  0.8278
F-statistic: 515.4 on 1 and 106 DF,  p-value: < 2.2e-16

```

Deducimos que las ecuaciones de cada recta ajustada para cada especie son:

1. Para el *A. alba*:

$$\text{LONG.ACIC} = 3,829 + 0,1703 \cdot \text{ÁREA FOLIAR}$$

2. Para el *A. pinsapo*:

$$\text{LONG.ACIC} = 2,349 + 0,1756 \cdot \text{ÁREA FOLIAR}$$

Donde la longitud de acícula está expresada en mm y el área foliar en mm².

De estos resultados obtenemos los valores de los coeficientes de determinación múltiple ajustado R² que son de 0.773 para el *A. alba* y 0,828 para el *A. pinsapo* y que los dos coeficientes son significativos.

Por lo tanto se observa que existe una relación clara entre los dos parámetros aunque el ajuste no es del todo óptimo.

No se ha intentado realizar una regresión multinomial ya que el R² da un peor ajuste que el normal con lo que indica que la relación a una curva no está mejor relacionada.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los experimentos realizados en este estudio se realizará por separado, de manera análoga a la descripción de la metodología empleada en el apartado de material y métodos.

Por lo tanto se van a analizar en primer lugar los resultados obtenidos en el cálculo de la transpiración residual y en segundo lugar los resultados obtenidos en las medidas del área foliar de las acículas.

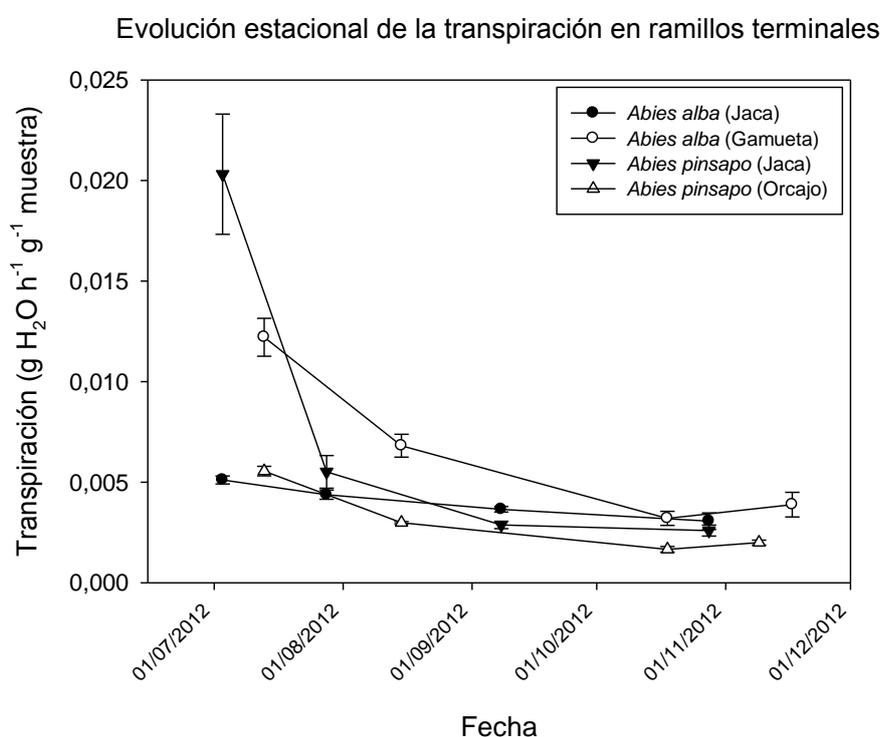
4.1.- TRANSPIRACIÓN RESIDUAL

La transpiración residual se ha medido a lo largo del periodo de maduración de los brotes en ambas especies para ver si la evolución de este parámetro a lo largo del periodo vegetativo se corresponde con las necesidades de cada especie en función de las distintas características de cada estación.

Además, se han comparado los resultados con los mismos análisis realizados en individuos aislados de ambas especies en condiciones no naturales, para verificar si dicha evolución fenológica se corresponde a una respuesta a las características de la estación de ambas poblaciones naturales o si por el contrario, se corresponde a características intrínsecas de cada especie determinadas genéticamente.

La gráfica confeccionada con todos los resultados obtenidos es la siguiente:

Gráfico 2



Para analizarla se realizará un estudio comparativo, en primer lugar entre la relación de ambas curvas de cada especie que existe tanto en campo como en “*common garden*”, para acabar con un estudio comparativo de las curvas obtenidas en las dos localizaciones de cada especie.

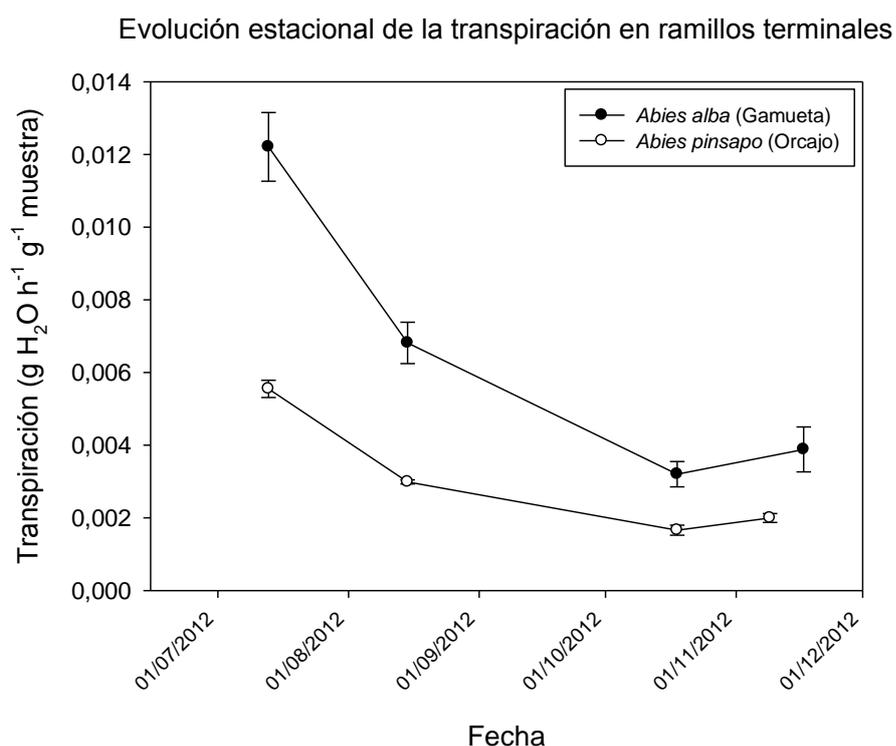
4.1.1.- Comparación de la evolución de la transpiración de ambas especies en condiciones de campo

Según los datos obtenidos, a principios del verano *A. alba* tiene una transpiración residual mucho mayor que *A. pinsapo*. Sin embargo, estas diferencias se van haciendo cada vez más pequeñas hasta llegar a valores semejantes en la maduración, aunque la transpiración de *A. alba* se mantiene en todo momento más alta que la de *A. pinsapo*.

Hay que señalar que *A. pinsapo* alcanza valores definitivos correspondientes a un

tejido completamente maduro a principios del mes de septiembre, mientras que en *A. alba* esta maduración no se produce hasta mediados del mes de octubre. La completa maduración de los tejidos que forman la acícula se verifica a través de la obtención sucesiva de valores muy similares en las tasas de transpiración.

Gráfico 3



A la vista de estos datos, se puede interpretar que *A. pinsapo* tiene una estrategia de maduración temprana de los tejidos foliares en condiciones de campo, lo que le posibilita evitar grandes pérdidas de agua en los meses más cálidos del año, pudiendo soportar mejor las bajas humedades relativas típicas del periodo estival correspondiente a la estación del pinsapo.

Sin embargo, *A. alba* no es tan eficaz minimizando las pérdidas pasivas de agua por transpiración, sobre todo si comparamos el periodo estival. Esto puede ser debido a que no necesita minimizar las pérdidas de agua tanto como el *A. pinsapo*, dadas las condiciones climáticas típicas de la especie (vive en sitios donde el

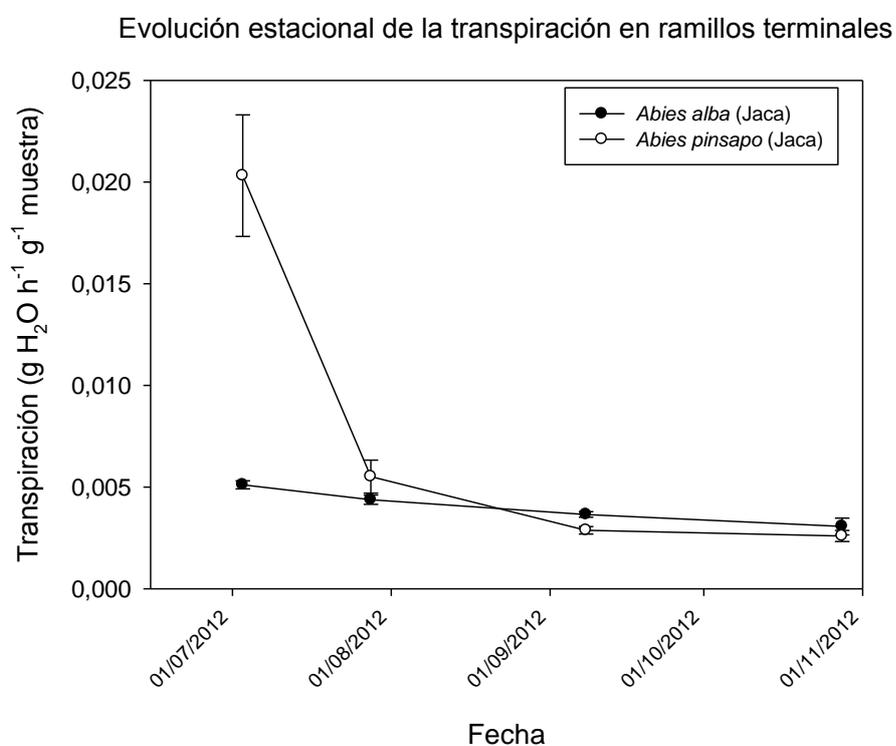
déficit de presión de vapor con la atmosfera es muy pequeño) (PEGUERO-PINA et al. 2011).

4.1.2.- Comparación de la evolución de la transpiración de ambas especies en “common garden”

Se puede apreciar claramente que la relación entre la evolución de la transpiración de ambas especies, en condiciones de “common garden” no tiene el mismo comportamiento que en condiciones de campo.

En este caso, las gráficas al principio del periodo vegetativo están invertidas, siendo superior la transpiración del pinsapo que la del abeto. Sin embargo, a medida que avanza la estación, vemos como la transpiración residual de *A. pinsapo* disminuye muy rápidamente hasta situarse por debajo de los valores de *A. alba* a mediados del mes de julio, de manera análoga a las condiciones en campo y con valores prácticamente iguales para ambas especies.

Gráfico 4

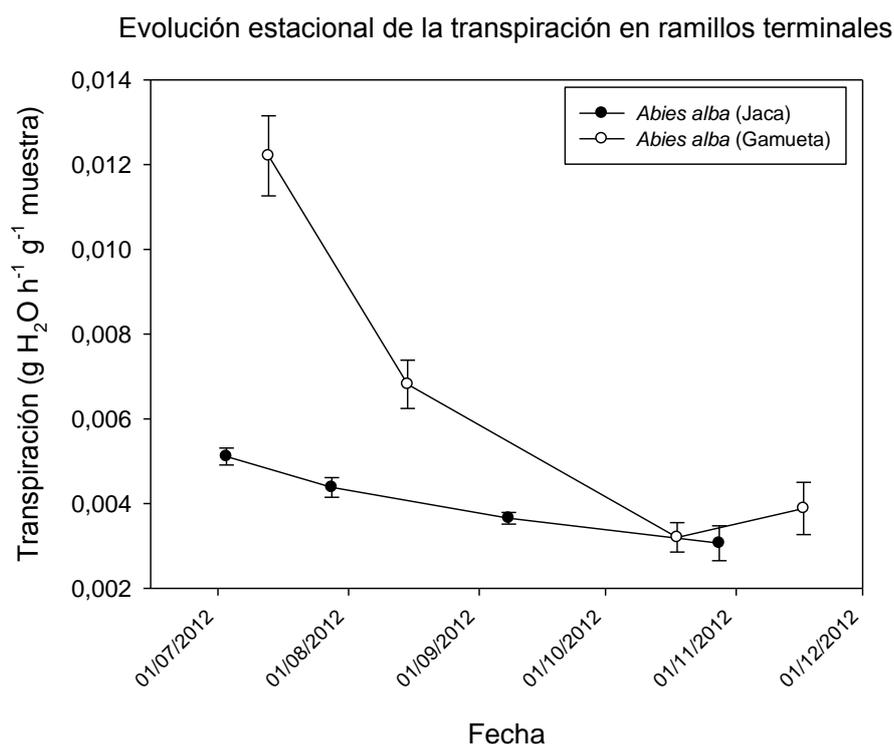


En este caso se puede interpretar una maduración más rápida de los tejidos foliares de *A. alba*, ya que desde principios del mes de julio, su tasa de transpiración es menor a la del *A. pinsapo*.

4.1.3.- Comparación de la evolución de la transpiración de cada especie entre las condiciones de campo y las de “*common garden*”

Si comparamos las curvas en las dos localizaciones para el *A. alba*, podemos apreciar una maduración mucho más temprana en las condiciones de “*common garden*” que en las de campo. Aún así, los valores finales correspondiente a la transpiración residual, siguen siendo muy parecidos, con valores muy similares a las condiciones naturales.

Gráfico 5



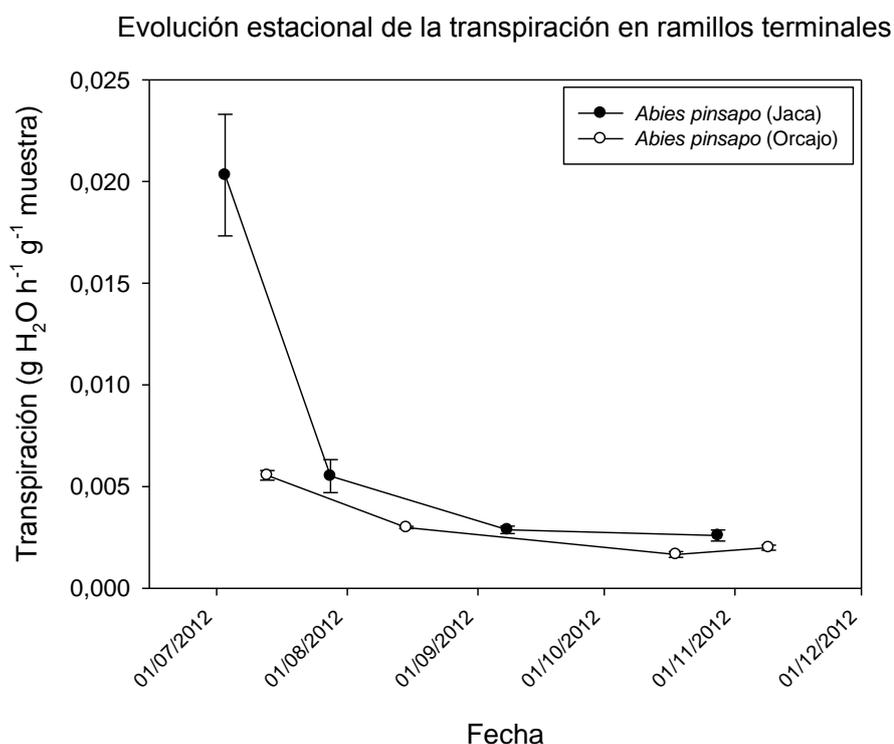
La impermeabilización temprana de la cutícula del abeto le permite minimizar las pérdidas de agua, que serán mayores en Jaca que en Gamueta por la existencia de un mayor déficit de presión de vapor en Jaca.

Por lo tanto, aunque los valores finales son similares a las condiciones de campo, *A. alba* presenta unos valores de transpiración al principio del verano muy inferiores (menos de la mitad) a los de campo, lo que parece indicar una adaptación fenológica a las condiciones más estresantes existentes en Jaca.

Es oportuno decir también que la diferencia entre ambos ritmos de maduración de cada individuo de *A. alba* es bastante acusada con lo que a priori parece una especie muy plástica en cuanto a su adaptación a las condiciones climáticas.

En cuanto al *A. pinsapo* en Jaca, al principio del periodo vegetativo transpira en mayor medida que en Orcajo, llegando a multiplicar ese valor casi por 4. Cabe destacar que la transpiración en ambas localizaciones es prácticamente la misma desde mediados del mes de agosto hasta la maduración final. Es decir, al igual que en el abeto, los valores finales de la transpiración, una vez que la acícula está completamente desarrollada, se mantienen muy semejantes entre las condiciones de campo y las del *common garden*.

Gráfico 6



Esta maduración más tardía en la escuela puede deberse por lo tanto también a una adaptación a las condiciones climáticas menos severas de Jaca, respecto a Orcajo.

Por último, es interesante señalar que las diferencias entre ambos ritmos de maduración son muy similares, exceptuando el inicio. Sería interesante el cálculo de la transpiración para los individuos de *A. pinsapo* de Orcajo en una época anterior para comprobar si los valores iniciales son también parecidos o bien si parten de situaciones iniciales distintas.

4.1.4.- Discusión

Se aprecia por lo tanto una considerable diferencia entre el ritmo de la maduración en condiciones naturales y en la escuela, tanto para el *A. alba* como para el *A. pinsapo* ya que la maduración se realiza antes en las estaciones con el clima con mayor índice de sequía y altas temperaturas desde el inicio del periodo estival, con lo que se puede interpretar que la maduración es más temprana allí donde más lo necesita.

Esto se ha podido comprobar, teniendo en cuenta las condiciones climáticas intermedias de Jaca entre Orcajo y Gamueta, y constatando que la maduración de *A. alba* es más rápida en Jaca (clima con mayor déficit hídrico) y que la maduración del *A. pinsapo* está más adelantada en Orcajo (también clima con mayor déficit hídrico).

Sin embargo, los valores finales de transpiración residual son prácticamente idénticos en ambas especies, incluso para cada localización con lo que se puede interpretar que las diferencias encontradas entre las dos especies en condiciones de campo no parecen estar determinadas genéticamente.

Por lo tanto, se puede concluir que las diferencias entre los distintos ritmos de maduración de los tejidos foliares en ambas especies vienen dados en

función de las distintas características del clima en donde se desarrolla cada individuo de cada especie muestreado, con lo que parece estar claro que se trata de una adaptación fenológica de cada individuo en función del clima al que está expuesto.

4.2.- CÁLCULO DEL ÁREA FOLIAR

Como ya se ha comentado anteriormente, en este estudio se ha explorado el camino para intentar relacionar el área total de cada brote con otra dimensión de dicho brote de más fácil medición.

En un principio se ha intentado relacionar el área total foliar de todo el brote con la longitud de la acícula más larga de cada brote. Una vez realizado unos primeros ensayos, y tras el análisis estadístico, se vio que los ajustes eran relativamente muy pobres con lo que conseguir una relación ajustada necesitaría de un número de muestras muy elevado.

Por lo tanto, en este estudio se ha intentado relacionar simplemente el área foliar de las acículas, independientemente de la época y de la localización para ver si se trata de una buena forma de relacionar el área foliar con un parámetro más sencillo.

La representación gráfica de ambas regresiones anteriormente explicadas son las siguientes:

Gráfico 7

Regresión ÁREA FOLIAR ACÍC/LONG ACIAC en *A. alba*

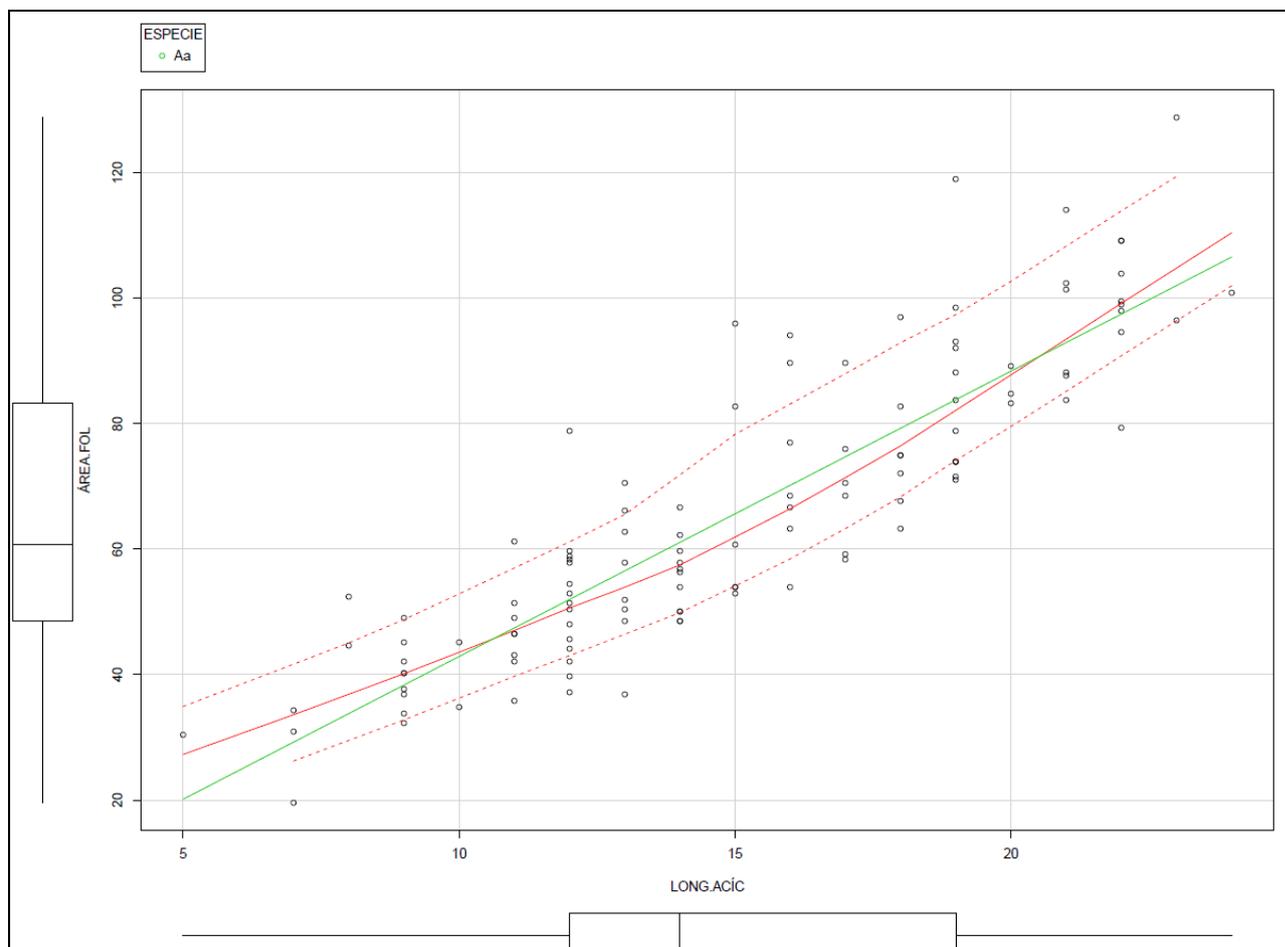
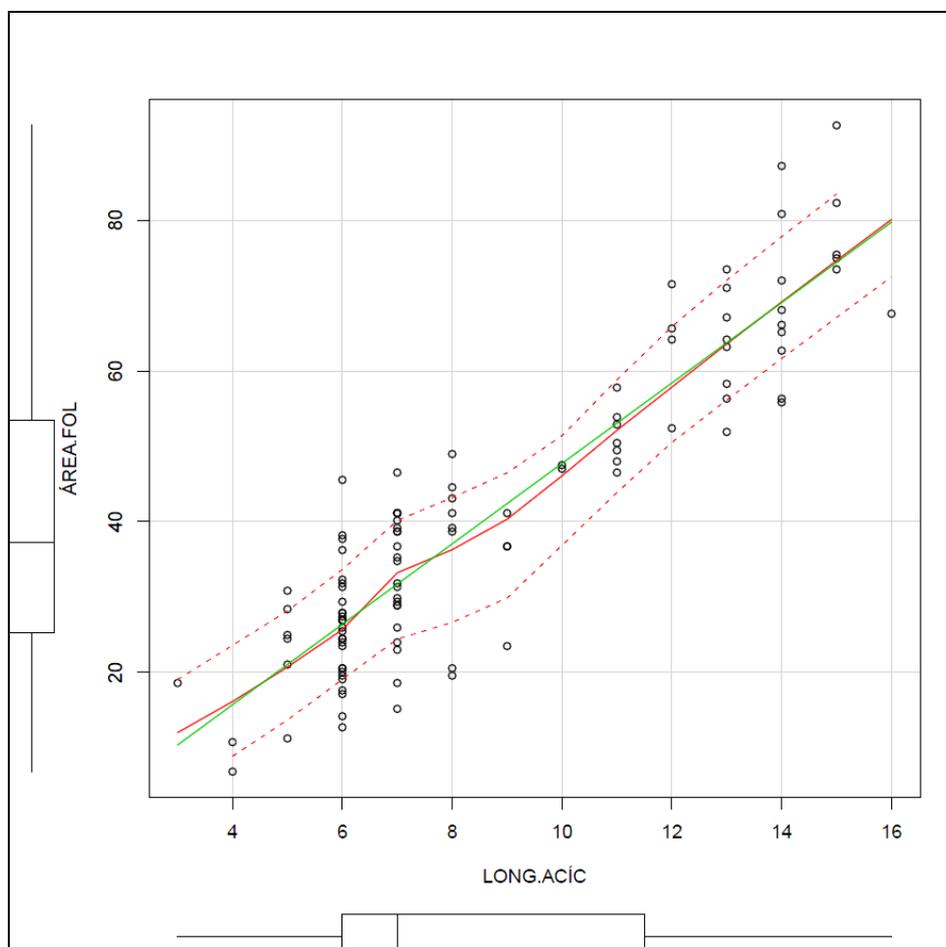


Gráfico 8

Regresión ÁREA FOLIAR ACÍC/LONG ACIAC en *A. alba*

Como ya se ha comentado en el apartado del análisis estadístico, y valorando los valores de ajuste ya comentados se puede intuir, que la búsqueda de una relación de este tipo en futuros ensayos puede estar bien encaminada.

5.- CONCLUSIONES

A continuación se expresan las conclusiones extraídas del análisis de los resultados del apartado anterior:

1.- Estas dos especies tienen un cierto grado de plasticidad fenotípica en la impermeabilización de la cutícula en respuesta al clima, reflejada principalmente en el ritmo de maduración de la misma (distinta fenología).

2.- La plasticidad detectada en los individuos de *A. alba*, al contrario de lo inicialmente esperado, es mucho mayor que en los ejemplares de *A. pinsapo*.

3.- Parece existir una gran relación entre la longitud de la acícula y su área foliar, con lo que cabría esperar encontrar buenas funciones de regresión para obtener de una manera fiable la superficie de cada acícula en función de su longitud y evitarse así el cálculo de la superficie para cada hoja.

6.- PROPUESTAS PARA ESTUDIOS FUTUROS

1. Analizar la transpiración del *A. pinsapo* de Orcajo en épocas más tempranas para verificar si la situación de partida es similar con los individuos estudiados en Jaca, y por lo tanto apoyar la teoría de la adaptación fenológica y no fenotípica.
2. Sería interesante comparar los resultados en función al área foliar de cada especie y para cada época. Para ello se está realizando una calibración de longitud de acícula vs. área foliar para cada especie y para cada época, intentando encontrar una ecuación de regresión que permita relacionar el área foliar con la longitud de acícula, parámetro con una fórmula de cálculo mucho más sencilla y rápida.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Anfodillo, T., Pasqua di Bisceglie, D., Urso, T. 2002. Minimum cuticular conductance and cuticle features of *Picea abies* and *Pinus cembra* needles along an altitudinal gradient in the Dolomites (NE Italian Alps). *Tree Physiology* 22, 479-487.
- Aussenac, G. 2002. Ecology and ecophysiology of circum-Mediterranean firs in the context of climate change. *Ann. For. Sci.* 59:823–832
- Baig, M. N., AND W. Tranquillini. 1980. The effects of wind and temperature on cuticular transpiration of *Picea abies* and *Pinus cembra* and their significance in desiccation damage at the alpine treeline. *Oecologia* 47:252-256.
- Baker, E. A., and J. procopiou. 1975. The cuticles of *Citrus* species. Composition of the intracuticular lipids of leaves and fruits. *J. Sci. Agric.* 26:1347-1352.
- Burghardt, M., Riederer, M. 2003. Ecophysiological relevance of cuticular transpiration of deciduous and evergreen plants in relation to stomatal closure and leaf water potential. *Journal of Experimental Botany.* 54, 1941-1949.
- Cowan, L. R. 1972. Oscillation in stomatal conductance and plant functioning associated with stomatal conductance. I. Observations and a model. *Planta* 106:185-219.
- Farjon, A. and K.D. Rushforth. 1989. A classification of *Abies* Miller (Pinaceae). *Notes R Bot. Garden Edinburgh* 46:59–79.
- Fernández-Cancio, A., R. Navarro-Cerillo, R. Fernández-Fernández, P. Gil-Hernández, E. Manrique-Menéndez and C. Calzado-Martínez. 2007. Climate classification of *Abies pinsapo* Boiss. Forests in southern Spain. *Inv. Agr. Sist. Rec. For.* 16:222–229.
- Grace, J, SJ Allen, and C Wilson. 1989. Climate and meristem temperatures of plant communities near the tree-line. *Oecologia* 79: 198-204.
- Guehl, J.M., Aussenac, G., Bouachrine, J., Zimmermann, R., Pennes, J.M., Ferhi, A., Grieu, P., 1991. Sensitivity of leaf gas exchange to atmospheric drought, soil drought, and water use efficiency in some Mediterranean *Abies* species. *Can. J. Forest Res.* 21, 1507–1515.
- Hadley, J. L., and W. K, Smith. 1986. Wind effects on needles of timberline conifers: seasonal influence on mortality. *Ecology* 67 (1): 12-19.

Holloway, P. J., Ande. A. Baker. 1968. Isolation of plant cuticles with Zinc Chloride - Hydrochloric acid solution. *Plant Physiol.* 43: 1878-1879.

Hygen, G. 1953. Studies in plant transpiration Physiol. Plant. 6: 106-133.

Kaufmann, M. R. 1975. Leaf water stress in Engelmann spruce: Influence of the root and shoot environments. *Plant Physiol.* 56: 841-844.

Kaufmann, M. R. 1976. Stomatal response of Engelmann spruce to humidity, light and water stress *Plant Physiol.* 57 : 898-901.

Kaul, O. N., and P. J. Kramer. 1965. Comparative drought resistance of two woody species. *Indian For.* 91 : 462-469.

Kramer, P. J. 1983. *Water Relations of Plants.* San Diego: Academic Press.

Leverenz, J., J. D. Deans, E. D. Ford, P. G. Jarvis, R. Milne, and D. Whitehead.

1982. Systematic spatial variation of stomatal conductance in a Sitka spruce plantation..*Appl. Eco.* 19 : 835-851.

Linares, J.C., A. Delgado-Huertas, J.J. Camarero, J. Merino and J.A. Carreira. 2009. Competition and drought limit the response of water use efficiency to rising atmospheric carbon dioxide in the Mediterranean fir *Abies pinsapo*. *Oecologia* 161:611–624

Marchand, P.J. 1975. Winter plant-water relations with special reference to alpine treeline. PhD, New Hampshire.

Marchand, P.J., and B.F. Chabot. 1978. Winter water relations of tree-line plant species on Mt. Washington, New Hampshire. *Are. Alp. Res.* 10 (1): 105-116.

Nobel, P. S. 1983. *Biophysical Plant Physiology and Ecology.* New York: Freeman. Orgell 1955

Peguero-Pina et al. 2011, Hydraulic traits are associated with the distribution range of two closely related Mediterranean firs, *Abies alba* Mill. and *Abies pinsapo* Boiss. *Tree Physiology*

Scaltsoyiannes, A., M. Tsaktsira and A.D. Drouzas. 1999. Allozyme differentiation in the

Mediterranean firs (*Abies*, Pinaceae). A first comparative study with phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 216:289–307.S

Schönenberger, W. 1978. Ökologie der natürlichen Verjüngung von Fichte und Bergföhre in Lawinenzügen der nördlichen Voralpen. *Mitt. Eidg. Anst.f.d.forstl.Versuchsw.* 54: 3.

Schönenberger, W. 1981. Die Wuchsformen der Baume an der alpinem Waldgrenze. *Eidg. Anst. forstl. Versuchswes.* 132

Slatyer, R. O. 1958. The measurement of diffusion pressure deficit in plants by a method of vapour equilibration. *Australian Journal of Biol. Sciences* 11: 349-365.

Slatyer, R. O. 1976. Water deficits in timberline trees in the Snowy Mountains of south-eastern Australia. *Oecologia* 24: 357-366.

Slavik, B. 1974. *Methods of Studying Plant Water Relations*. Berlin: Springer-Verlag.

Svenningsson, M. 1988. Epi- and intracuticular lipids and cuticular transpiration rates of primary leaves of eight barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Physiol. Plant.* 73: 512-

Thompson, F.B., and L. Leyton. 1970. Method for measuring the leaf surface area of complex shoots. *Nature* 229 (february 19): 572.

Tranquillini, W. 1976. Water relations and alpine timberline. In *Water and plant life. Ecol. Studies* 19. Edited by O. L. Lange, L. Kappen and E. D. Schulze. 473-491. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.

Wardle, P. 1968. Engelmann spruce (*Picea engelmannii* engel) at its upper limits on the Front Range, Colorado. *Ecology* 49 (3):483-495.

Zazo, J.M. 1998. Caracteres culturales y otras características de interés de algunas coníferas forestales españolas. E.U.I.T. Forestal de Madrid (edición propia)