



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ECOFISIOLOGÍA  
DE DOS ESPECIES EMPARENTADAS DE ABETOS  
CIRCUNMEDITERRÁNEOS: RASGOS  
ADAPTATIVOS Y COMPENSACIÓN DE  
FACTORES EN *ABIES PINSAPO* Y *ABIES ALBA*  
EN EL CONTEXTO DE EVENTOS DE  
CALENTAMIENTO CLIMÁTICO**

**PRESENTADA POR:  
CELIA SERICHOL ESCOBAR**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. BENJAMÍN VIÑEGLA PÉREZ  
DR. D. JOSÉ A. CARREIRA DE LA FUENTE**

**JAÉN, 7 DE MARZO DE 2014**

**ISBN 978-84-16819-04-1**



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

**Análisis comparativo de la ecofisiología  
de dos especies emparentadas de abetos  
circunmediterráneos: rasgos adaptativos y  
compensación de factores en *Abies pinsapo*  
y *Abies alba* en el contexto de eventos de  
calentamiento climático**

Celia Serichol Escobar

**Tesis Doctoral**

Jaén, febrero de 2014





D. BENJAMÍN VIÑEGLA PÉREZ Y D. JOSÉ ANTONIO CARREIRA DE LA FUENTE, Profesores de Ecología de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Análisis comparativo de la ecofisiología de dos especies emparentadas de abetos circunmediterráneos: rasgos adaptativos y compensación de factores en *Abies pinsapo* y *Abies alba* en el contexto de eventos de calentamiento climático**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección. Y considerando que representa trabajo de Tesis, autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales.

Jaén, febrero de 2014

Fdo. Dr. B. Viñegla Pérez

Fdo. Dr. José A. Carreira de la Fuente



Esta memoria ha sido realizada gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, y al “Contrato de consultoría y asistencia para el seguimiento de las actuaciones de recuperación y conservación del pinsapo en las provincias de Cádiz y Málaga: indicadores de variación de nutrientes” (Contrato UJA-Egmasa NET 313926), financiado por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía



"I believe in aristocracy, though -- if that is the right word, and if a democrat may use it. Not an aristocracy of power, based upon rank and influence, but an aristocracy of the sensitive, the considerate and the plucky. Its members are to be found in all nations and classes, and all through the ages, and there is a secret understanding between them when they meet. They represent the true human tradition, the one permanent victory of our queer race over cruelty and chaos. Thousands of them perish in obscurity, a few are great names. They are sensitive for others as well as themselves, they are considerate without being fussy, their pluck is not swankiness but power to endure, and they can take a joke."

-E.M. Forster, *Two Cheers For Democracy*

“Y de la misma manera que las abejas llevan escrito en la lengua, la boca y el estómago que tienen que producir miel, también nosotros llevamos escrito en los ojos, los oídos, la médula de nuestros huesos, en todos los lóbulos de nuestro cerebro, en todos los sistemas nerviosos de nuestro cuerpo, que hemos sido creados para transformar lo que absorbemos de los frutos de la tierra en una energía particular y de una cualidad única en este planeta. Ningún otro ser, que yo sepa, ha sido diseñado para producir como nosotros ese extraño fluido que llamamos pensamiento, inteligencia, entendimiento, razón, alma, espíritu, potencia cerebral, virtud, bondad, justicia, saber; pues posee mil nombres, aunque sólo tenga una esencia. Todo en nosotros ha sido sacrificado. Nuestros músculos, nuestra salud, la agilidad de nuestros miembros, el equilibrio de nuestras funciones animales, el sosiego de nuestra vida, soportan el esfuerzo cada vez más grande de su preponderancia. Es el estado más valioso y el más difícil al que se pueda elevar la materia. La llama, el calor, la luz, la propia vida y el instinto más sutil que la vida, así como la mayor parte de las fuerzas inasibles que coronaban el mundo antes de nuestra venida palidecieron en contacto con este nuevo efluvio. No sabemos adónde nos conduce, lo que hará de nosotros ni lo que haremos nosotros de él.”

-Maurice Maeterlinck, *La vie des abeilles*



## Agradecimientos

No os lo vais a creer, pero empecé a escribir esto hace años. Y no porque intuyese que iba tardar tanto tiempo en terminar la tesis, no. Creo que lo hice porque temía que el paso del tiempo pudiese matizar, apaciguar o cambiar lo que sentía en ese momento. Tenía que hacerlo antes de olvidarme de toda la gente que ha sido importante para mí durante estos años. Y ahora vuelvo a repasar en mi cabeza las distintas fases de esta tesis, y creo que no se me olvida nadie. Pero si es así, espero que sepáis perdonarme.

Por supuesto, tengo que empezar por mi familia, porque mi madre, mi padre y mi hermana son las personas más importantes de mi vida, y las que más me han apoyado en esta odisea. Porque ha sido una odisea para mí!! Y si soy lo que soy y estoy aquí en este momento es gracias a ellos. Gracias por estar siempre ahí, en cualquier momento, para cualquier cosa, y por quererme tanto tal y como soy. Yo os adoro! Y soy plenamente consciente de la suerte que tengo por poder contar con vosotros. Gracias, mamá, por ser tan maravillosa y tan paciente conmigo, por aguantar mi mal humor y ayudarme con todo esto. La de muestreos que me has ayudado a preparar! Papá, gracias por tu curiosidad por lo que hago, con lo borde y lo impaciente que soy a veces... Y Nieves, gracias por entender tan bien a esta hermana tan particular que te ha *tocao*. Sé que no es fácil. Mi tita, Edu, y Emilio, el *cuñao* más *apañao* del mundo... gracias!! También tengo que darle las gracias a Alejandro, aunque ya no seamos invencibles, por haber estado ahí tanto tiempo, y a Ana, Mari, Alicia, Sergio, Raúl, Jose y Dani, por seguir estando ahí.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, esas personas que se instalan en el paisaje de tu vida, dotándolo de otras dimensiones. En mi caso, esa aportación ha sido para bien (creo) y ha confirmado mi teoría de que las cosas importantes de la vida se mantienen a veces sobre relaciones personales tan interesantes como poco convencionales. Benji, gracias por estar ahí, por tener siempre abierta la puerta del despacho menos feng shui del mundo, por el té, por las risas, y por todos los ratos que hemos estado dándole vueltas al tarro juntos, que son a fin de cuentas los que han hecho posible que esta tesis haya salido adelante. Y Pepe, gracias por haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis. Si me metí en esto es porque una vez tuve un profesor de Ecología un poco más *pallá* que *pacá*, que se entusiasmaba con las clases y que nos transmitía a todos esa sensación de que la Ecología y los pinsapos son lo más súper del mundo. También quiero dar las gracias al resto de profesores del Área y a otros del

Departamento: Pedro, Julio, Roberto, Paco, Francisco, Gema, Mari Carmen, Raquel, Gracia, Joaquín, Reyes, Luis, Jesús, Paco Márquez... con vuestro cariño hacéis que me sienta siempre como en casa. Pedro y Julio, vosotros además me disteis la oportunidad de participar en un artículo, y me habéis apoyado mucho de distintas maneras. Lo que valéis!

Y por dónde empiezo con el resto del mundo mundial??!! Es que os quiero a todos mucho y no sé en qué orden ponerlos...cronológico? Espero que no se me olvide nadie! A ver... Belén y Tere, las joyas de esta universidad, que me recibieron cuando llegué. Si no fuera por ellas, a lo mejor no estaba hoy aquí. Gracias!! Por acogerme tan bien, por enseñarme todo lo que sabíais y sencillamente por ser tan buenas amigas y compañeras. Sois un sol y hacéis que todo resplandezca, y no hace falta que os diga lo muchísimo que os quiero, verdad? Juan Carlos, tú también estabas ahí. Qué de viajes hemos hecho, eh? Qué manera de perfeccionar los muestreos y qué manera de pegar hebra. Muchas gracias por esas excursiones pinsaperas y por todas esas conversaciones interminables que hacían que cada viaje mereciese la pena.

Ahora es tu turno, Pablo, que tú también has estado ahí desde el principio, y por suerte para mí sigo contando contigo, aunque sea fuera de la uni! Gracias por no desanimarte nunca conmigo, y por las millones de veces que me has dicho de desayunar juntos o de tomar una cañita. Y por toda tu ayuda (eres el rey del Excel, de la lupa y del micro, entre otras cosas), pero sobre todo por haberme recordado infinidad de veces a lo largo de estos años que el mundo no se acaba con la tesis y que lo más importante siempre somos nosotros. Guardo tus dibujos como el tesoro que son. Y para ti, Gisela, puro compromiso y voluntad de hierro, la mejor de las suertes también. Te la mereces!

Y claro, está Jesús, esa persona cariñosa y tierna a la que echo tanto de menos. Jesús, superando prejuicios y haciéndome superar los míos. Jesús aguantando mis penas y mis paranoias, permitiéndome conocerle poquito a poco. Jesús convirtiéndose, casi imperceptiblemente, en quien es ahora. Gracias por haber compartido conmigo tantas cenas, tantos pensamientos y tantas cosas. Te puedo asegurar que para mí no has pasado desapercibido.

Compañeros de seminario, gracias a todos! Las más especiales van para Mamen, una verdadera amiga. Sin ti esta tesis sería puro laboratorio... Eres la mejor compañera de fatigas, desinteresada y trabajadora... otro solete!! Gracias por pasar por alto mi parte más neurótica, y por animarme cuando ya no me quedaban fuerzas. Sólo espero haberte ayudado al menos la mitad de lo que me has ayudado tú a mí! También quiero

dar las gracias muy especialmente a Rafa, otro compañero de fatigas con el que me iba al fin del mundo. Si no fuera por los ratos tan buenos que hemos echado...! Gracias a ti mi última etapa en la universidad también fue bien bonita (y eso que estábamos con el maldito IRGA....!!). Gracias también a Gemma, por ese corazón de oro y esa forma de ser tan de verdad. Y a Patricia, con la que tengo esa conexión mental que asusta y con la que he compartido ratos divertidísimos. Y a Raquel y a Jose Manuel, con los que puedo reanudar una conversación pasados varios meses... cómo es posible que el mundo siga tan mal, con la de veces que nos hemos sentado a arreglarlo?! Y a Mari Carmen, con sus viajes y sus cosas...tu apoyo en Suiza fue fundamental! Y a Andrea, con su vitalidad y su forma apasionada de ver la vida. Y a Samer, otro artista al que echo de menos.... Y a Mari Ángeles, Mari Luz, Bea, Fátima G., Fátima A., Emmanuel, Jorge, Vicky, Víctor... todos habéis contribuido a que estos años hayan merecido tanto la pena... gracias!

Finalmente, me gustaría dar las gracias a los doctores Robert D. Guy y Günter Höch, por haberme acogido tan cariñosamente en el Forest Research Centre de la Universidad de British Columbia, en Vancouver (Canadá), y en el Institute of Botany de la Universidad de Basilea (Suiza), respectivamente. Porque durante los meses que pasé con ellos me impresionó profundamente su manera tan sencilla de ser, su rigor en el trabajo y su gran generosidad en distintos aspectos. Y porque creo que no son conscientes de lo que enriquecedoras que han sido esas experiencias para mi, tanto en el terreno profesional como en el personal. Fue maravilloso poder disfrutar del sabor del Botanischer Garten, y de la gente tan estupenda que trabaja allí, especialmente Susana Peláez-Riedl, Sebastian Leuzinger y Christian Körner. Gracias a ellos, los suizos, los austríacos y los alemanes me caen un poquito mejor. Y qué decir de la gente de la Faculty of Forestry, con Shawn Mansfield, Raju y Li-Min a la cabeza! Vancouver también me dio la oportunidad de conocer a Juan Blanco, Gemma Celestino, Mariano Amoroso, Cecilia Valencia, Yolanda Cano, Simón Moreira, Icey Salehi, Ana Macías... Gracias por vuestra hospitalidad y por vuestro cariño: sinceramente, no sé qué habría sido de mí sin vosotros y sin todos esos planes de fin de semana.

Muchísimas gracias a todos por todo. Os llevo conmigo siempre.





# ÍNDICE

<b>I. Introducción.</b>	3
<b>I.1. Aspectos generales del cambio global.</b>	3
<i>I.1.1. El incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>.</i>	4
<i>I.1.2. La alteración del ciclo global del nitrógeno.</i>	6
<i>I.1.3. Los cambios en el uso del territorio y la fragmentación del paisaje.</i>	7
<b>I.2. Las consecuencias del cambio global en los ecosistemas forestales.</b>	9
<i>I.2.1. Influencia de la temperatura, la radiación y el régimen de precipitaciones.</i>	11
<i>I.2.2. Efecto del incremento en los niveles de CO<sub>2</sub> y ozono troposférico.</i>	13
<i>I.2.3. Consecuencias del incremento en la deposición de nitrógeno.</i>	14
<i>I.2.4. Cambios en la distribución de especies. Adaptación y evolución.</i>	15
<i>I.2.5. Respuestas a nivel de ecosistema. Interacciones.</i>	15
<b>I.3. Los ecosistemas forestales templados y mediterráneos ante el cambio global.</b>	16
<b>I.4. Los abetos circunmediterráneos como objeto de estudio: justificación e hipótesis de partida.</b>	20
<i>I.4.1. Los abetos circunmediterráneos. El pinsapo.</i>	20
<i>I.4.2. Antecedentes en el estudio de los pinsapares.</i>	24
<i>I.4.3. El pinsapo como modelo experimental.</i>	27
<i>I.4.4. La caracterización ecofisiológica del pinsapo. Hipótesis de partida.</i>	28
<i>I.4.5. El interés de la comparación con <u>Abies alba</u>.</i>	30
<b>I.5. Estructura y contenido de la tesis.</b>	34
<b>I.6. Objetivos generales.</b>	35

<b>II. Material y Métodos. Generalidades.</b>	41
<b>II.1. Material experimental.</b>	41
<b>II.2. Condiciones ambientales.</b>	43
<i>II.2.1. Humedad del sustrato y pérdida de agua.</i>	43
<i>II.2.2. Irradiancia incidente.</i>	44
<b>II.3. Variables respuesta.</b>	45
<i>II.3.1. Patrones de reparto de biomasa.</i>	45
<i>II.3.2. Contenido relativo en agua.</i>	46
<i>II.3.3. Contenido foliar y xilemático en carbohidratos no estructurales.</i>	47
<i>II.3.3.1. Toma y preparación de las muestras.</i>	47
<i>II.3.3.2. Análisis.</i>	47
<i>II.3.4. Composición foliar en pigmentos.</i>	49
<i>II.3.4.1. Toma de muestras y preprocesado.</i>	49
<i>II.3.4.2. Extracción de los pigmentos foliares.</i>	50
<i>II.3.4.3. Separación de pigmentos mediante RP-HPLC.</i>	51
<i>II.3.4.4. Purificación de pigmentos y preparación de estándares.</i>	53
<i>II.3.4.5. Cálculo de la concentración en las muestras.</i>	55
<i>II.3.5. Potencial hídrico xilemático.</i>	56
<i>II.3.6. Medidas de intercambio gaseoso.</i>	57
<i>II.3.6.1. Tasas instantáneas de fotosíntesis y conductancia estomática.</i>	57
<i>II.3.6.2. Curvas fotosíntesis vs. irradiancia (curvas P-I).</i>	59
<i>II.3.6.3. Determinación del área foliar.</i>	60
<i>II.3.7. Discriminación de isótopos estables de carbono.</i>	65
<b>III. Respuestas de aclimatación a la luz en <i>A. pinsapo</i> y en <i>A. alba</i>.</b>	69
<b>III.1. Introducción.</b>	69
<i>III.1.1. El ambiente lumínico en ecosistemas forestales mediterráneos.</i>	69

<i>III.1.2. Estructura forestal y disponibilidad de luz en los pinsapares.</i>	70
<i>III.1.3. La aclimatación a la luz como respuesta a cambios en el ambiente lumínico.</i>	71
<b>III.2. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos.</b>	74
<i>III.2.1. Diseño experimental.</i>	74
<i>III.2.2. Variables dependientes.</i>	76
<i>III.2.2.1. Intercambio gaseoso.</i>	77
<i>III.2.2.2. Patrones de distribución de biomasa.</i>	77
<i>III.2.2.3. Composición foliar en pigmentos y discriminación de isótopos estables de carbono.</i>	78
<i>III.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.</i>	79
<b>III.3. Resultados.</b>	81
<i>III.3.1. Variables relacionadas con el intercambio gaseoso.</i>	81
<i>III.3.1.1. Tasas instantáneas de fotosíntesis neta potencial y de conductancia estomática al agua. Eficiencia en el uso del agua y de la luz.</i>	81
<i>III.3.1.2. Curvas fotosíntesis – irradiancia.</i>	85
<i>III.3.2. Variables morfológicas y patrones de asignación de recursos.</i>	92
<i>III.3.3. Composición foliar en pigmentos.</i>	99
<i>III.3.3.1. Equipo pigmentario de <u>A. pinsapo</u>.</i>	99
<i>III.3.3.2. Equipo pigmentario de <u>A. alba</u>.</i>	108
<i>III.3.3.3. Análisis comparativo de los contenidos pigmentarios de ambas especies.</i>	114
<i>III.3.4. Discriminación de isótopos estables de C.</i>	114
<b>III.4. Discusión.</b>	120
<i>III.4.1. Patrones de distribución de biomasa y su relación con la estrategia vital de la especie.</i>	120
<i>III.4.2. La inversión en equipo pigmentario como mecanismo de aclimatación a la luz.</i>	122
<i>III.4.3. La discriminación de isótopos estables de carbono como indicador del estrés por falta de luz.</i>	126

III.4.4. Capacidad de fijación de C y eficiencia potencial en el uso de recursos.	131
<b>III.5. Conclusiones.</b>	<b>135</b>
<b>IV. Estrés hídrico y compromiso asociado al par de recursos agua – luz en <i>Abies pinsapo</i> y <i>Abies alba</i>.</b>	<b>139</b>
<b>IV.1. Introducción.</b>	<b>139</b>
IV.1.1. Marco conceptual.	139
IV.1.2. Antecedentes y justificación del estudio.	141
IV.1.3. Hipótesis.	142
IV.1.4. Objetivos.	144
<b>IV.2. Diseño experimental. Variables dependientes y metodología de muestreo.</b>	<b>145</b>
IV.2.1. Diseño experimental.	145
IV.2.2. Estrategia de muestreo y variables consideradas.	146
IV.2.2.1. Tasas instantáneas de intercambio gaseoso.	147
IV.2.2.2. Humedad del sustrato y pérdida de agua.	148
IV.2.2.3. Contenido relativo en agua y potencial hídrico xilemático.	149
IV.2.2.4. Contenido foliar en carbohidratos no estructurales y discriminación de isótopos estables de carbono.	150
IV.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.	150
<b>IV.3. Resultados.</b>	<b>151</b>
IV.3.1. Disponibilidad de agua y estatus hídrico.	151
IV.3.1.1. Porcentaje de humedad en el sustrato y peso de los individuos.	151
IV.3.1.2. Contenido relativo en agua de las acículas (RWC) y potencial hídrico xilemático.	157
IV.3.2. Tasas instantáneas de intercambio gaseoso.	163
IV.3.2.1. Fotosíntesis neta y conductancia estomática al agua.	163
IV.3.2.2. Eficiencia en el uso del agua y de la luz.	169
IV.3.3. Discriminación de isótopos estables de carbono.	175

<i>IV.3.4. Determinación de carbohidratos no estructurales en tejido foliar.</i>	182
<i>IV.3.4.1. Contenido en carbohidratos no estructurales en tejido foliar maduro.</i>	182
<i>IV.3.4.2. Contenido en carbohidratos no estructurales en tejido foliar “nuevo”.</i>	189
<b>IV.4. Discusión.</b>	197
<i>IV.4.1. Diferencias interespecíficas en respuesta a la combinación de estrés hídrico y déficit energético. Evaluación del trade-off en el par de recursos agua – luz.</i>	197
<i>IV.4.2. La discriminación de isótopos estables de carbono como indicador del estrés por déficit hídrico y energético.</i>	213
<i>IV.4.3. Cambios en la partición del carbono foliar asociados al estrés hídrico y energético.</i>	219
<b>IV.5. Conclusiones.</b>	229
<b>V. Fijación de carbono y control estomático en <i>A. pinsapo</i> y en <i>A. alba</i>.</b>	233
<b>V.1. Introducción.</b>	233
<i>V.1.1. Marco conceptual.</i>	233
<i>V.1.2. Hipótesis de partida.</i>	235
<i>V.1.3. Objetivo del experimento. Objetivos específicos.</i>	236
<b>V.2. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos.</b>	237
<i>V.2.1. Diseño experimental.</i>	237
<i>V.2.1.1. Experimento 1. Curvas “fotoperiodo”.</i>	238
<i>V.2.1.2. Experimento 2. Dosis mediante distintos niveles de irradiancia.</i>	239
<i>V.2.1.3. Experimento 3. Interposición de periodos de oscuridad de duración creciente.</i>	241
<i>V.2.2. Tratamiento estadístico de los datos.</i>	242
<b>V.3. Resultados.</b>	243
<i>V.3.1. Curvas “fotoperiodo”.</i>	243

V.3.1.1. Tasa instantánea de fotosíntesis neta	244
V.3.1.2. Tasa instantánea de conductancia estomática al agua.	245
V.3.1.3. Ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua.	245
V.3.1.4. Análisis global de los parámetros temporales.	251
V.3.1.5. Cantidad de carbono fijado y de agua perdida.	254
V.3.2. Suministro de luz mediante periodos de tiempo caracterizados por distintos niveles de irradiancia.	257
V.3.3. Intercalado de periodos de oscuridad de distinta duración.	268
V.3.3.1. Dinámica temporal de la fotosíntesis y de la conductancia estomática, alcance del estadoestacionario y parámetros temporales.	268
+ Tasa instantánea de fotosíntesis neta.	268
+ Tasa instantánea de conductancia estomática al agua.	269
+ Ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua.	270
V.3.3.2. Cantidad de C fijado y de agua “perdida”. Eficiencia en el uso del agua y de la luz.	273
<b>V.4. Discusión.</b>	280
V.4.1. Fijación de C y control estomático en curvas fotoperiodo.	280
V.4.1.1. Parámetros temporales. Caracterización de la respuesta fotosintética.	282
V.4.1.2. Carbono fijado y eficiencia en el uso del agua.	283
V.4.2. Efecto del suministro de luz mediante distintas irradiancias de incubación.	284
V.4.3. Efectos del intercalado de periodos de oscuridad de distinta duración.	287
<b>V.5. Conclusiones.</b>	293

<b>VI. Influencia de la heterogeneidad ambiental sobre el patrón espacial de regeneración natural de <i>A. pinsapo</i>.</b>	297
<b>VI.1. Introducción.</b>	297
<i>VI.1.1. Procesos de regeneración natural asociados a huecos del dosel forestal: la heterogeneidad espacial como fuerza motriz y moduladora de la regeneración de especies.</i>	297
<i>VI.1.2. Patrones de regeneración natural en bosques de <u>Abies pinsapo</u>.</i>	301
<i>VI.1.3. El análisis espacial como aproximación a los procesos de regeneración natural.</i>	304
<b>VI.2. Localización, diseño experimental y variables de estudio.</b>	305
<i>VI.2.1. Sitio de estudio.</i>	305
<i>VI.2.2. Localización y selección de huecos. Caracterización de las parcelas.</i>	307
<i>VI.2.3. Localización y selección de individuos juveniles de <u>A. pinsapo</u>. Medidas de crecimiento y caracterización ecofisiológica.</i>	312
<i>VI.2.4. Dinámica estacional de variables abióticas: humedad del sustrato y luz incidente.</i>	313
<i>VI.2.5. Análisis espacial de variables abióticas y bióticas. Empleo de SADIE y de ClusterShell.</i>	315
<i>VI.2.6. Asociación espacial entre pares de variables. Variación estacional de la heterogeneidad espacial a pequeña escala. Empleo de N y de Association Extractor.</i>	316
<i>VI.2.7. Contenido xilemático en carbohidratos no estructurales.</i>	317
<i>VI.2.8. Potencial hídrico xilemático.</i>	317
<i>VI.2.9. Medidas de intercambio gaseoso.</i>	318
<i>VI.2.10. Tratamiento gráfico y estadístico de los datos.</i>	319
<i>VI.2.10.1. Análisis espacial de variables ambientales y no ambientales.</i>	319
<i>VI.2.10.2. Tratamiento de las variables ecofisiológicas.</i>	320
<i>VI.2.10.3. Análisis conjunto de variables ambientales y espaciales.</i>	321

<b>VI.3. Resultados.</b>	325
<i>VI.3.1. Esfuerzo de muestreo y caracterización de las parcelas seleccionadas.</i>	325
<i>VI.3.2. Dinámica estacional de la luz incidente y la humedad del sustrato.</i>	329
<i>VI.3.3. Localización espacial de individuos juveniles: patrón espacial, relación con variables abióticas y bióticas (gradientes de agua y luz, cobertura de matorral acompañante). Selección de individuos en distintos microambientes.</i>	336
<i>VI.3.3.1. Relación con la presencia de otras especies y el porcentaje total de cobertura de matorral.</i>	339
<i>VI.3.3.2. Relación con variables abióticas: gradientes ambientales de luz y de humedad disponible en el sustrato.</i>	340
<i>VI.3.3.3. Selección de individuos para seguimiento de variables ecofisiológicas.</i>	341
<i>VI.3.4. Potencial hídrico xilemático.</i>	341
<i>VI.3.5. Medidas instantáneas de intercambio gaseoso.</i>	341
<i>VI.3.5.1. Conductancia estomática al agua.</i>	341
<i>VI.3.5.2. Tasa neta de fijación de C.</i>	343
<i>VI.3.5.3. Concentración intercelular de CO<sub>2</sub>.</i>	343
<i>VI.3.5.4. Ratio fotosíntesis vs. conductancia: eficiencia intrínseca en el uso del agua.</i>	343
<i>VI.3.5.5. Ratio fotosíntesis vs. PAR: eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz.</i>	345
<i>VI.3.6. Determinación de carbohidratos no estructurales en el xilema.</i>	345
<i>VI.3.6.1. Azúcares solubles.</i>	345
<i>VI.3.6.2. Almidón.</i>	346
<i>VI.3.6.3. Carbohidratos no estructurales totales.</i>	346
<i>VI.3.7. Crecimiento primario en ramas.</i>	347
<i>VI.3.8. Ordenación multivariante del comportamiento ecofisiológico de individuos localizados en distintos microambientes.</i>	350

VI.3.9. <i>Análisis de regresión logística y partición de la variación encontrada para la presencia de individuos juveniles de pinsapo.</i>	355
VI.3.10. <i>Análisis de redundancia y partición de la variación hallada para las variables de índole ecofisiológica.</i>	356
<b>VI.4. Discusión.</b>	359
VI.4.1. <i>La importancia de los huecos del dosel forestal para los procesos de regeneración natural del bosque: el papel de la heterogeneidad espacial en la dinámica forestal a distintas escalas.</i>	359
VI.4.2. <i>El análisis espacial como aproximación para el estudio de los procesos de regeneración natural. Caracterización espacial de los gradientes ambientales de recursos.</i>	362
VI.4.3. <i>El patrón espacial de distribución de juveniles censados: la influencia del ambiente lumínico, la disponibilidad de agua y la presencia de matorral.</i>	365
VI.4.4. <i>Diferencias en el desempeño ecofisiológico de individuos localizados en distintos microambientes.</i>	366
VI.4.5. <i>Estado de suministro de C y crecimiento primario en individuos localizados en microambientes distintos.</i>	368
VI.4.6. <i>Aproximación al comportamiento ecofisiológico de individuos localizados en distintos microambientes.</i>	372
VI.4.7. <i>Influencia del medio ambiente abiótico y biótico en la distribución de juveniles de pinsapo: una aproximación mediante análisis de regresión logística.</i>	374
VI.4.8. <i>Influencia del medio ambiente en el desempeño de juveniles de pinsapo en huecos naturales del dosel forestal.</i>	375
<b>VI.5. Conclusiones.</b>	379

<b>VII. Discusión general.</b>	383
<b>VII.1. La ecofisiología del pinsapo y el interés de su comparación con <i>A. alba</i>.</b>	383
<b>VII.2. La luz como factor ambiental determinante de la autoecología de ambas especies.</b>	384
<b>VII.3. Estrategia de uso de los recursos y tolerancia al estrés.</b>	385
<b>VII.4. Consideraciones ecológicas para la gestión de los pinsapares ante potenciales amenazas en el marco del Cambio Global: importancia de la heterogeneidad ambiental a microescala para la dinámica natural de regeneración del pinsapar.</b>	388
<b>VIII. Conclusiones generales.</b>	395
<b>IX. Referencias bibliográficas.</b>	399



## **I. Introducción**



## I. Introducción.

*En este primer capítulo de introducción al trabajo recogido en esta memoria, se realiza un breve recorrido por los elementos que conforman lo que conocemos como “cambio global”, así como por los distintos tipos de impactos que se prevé que el mismo tenga sobre la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas forestales. Posteriormente, se abordan de forma específica las diferencias existentes entre los bosques templados y los mediterráneos, en lo que respecta a su distribución geográfica y al posible papel que puedan desempeñar ambos tipos de ecosistemas en el contexto del cambio global. Estas diferencias entre ambos tipos de bosques, y por ende entre las especies que forman parte de unos y otros, constituyen el telón de fondo sobre el que comparar, desde el punto de vista de su comportamiento ecofisiológico, dos especies de abetos circunmediterráneos filogenéticamente emparentados, *Abies pinsapo* y *A. alba*, con evidentes diferencias en lo que respecta a su autoecología y a la distribución de sus poblaciones. Finalmente, se exponen de forma somera las dos aproximaciones seguidas para la investigación de estas diferencias, mediante los experimentos de laboratorio que constituyen el primer bloque de esta memoria, y el trabajo de campo que constituye el segundo y último bloque.*

### I.1. Aspectos generales del cambio global.

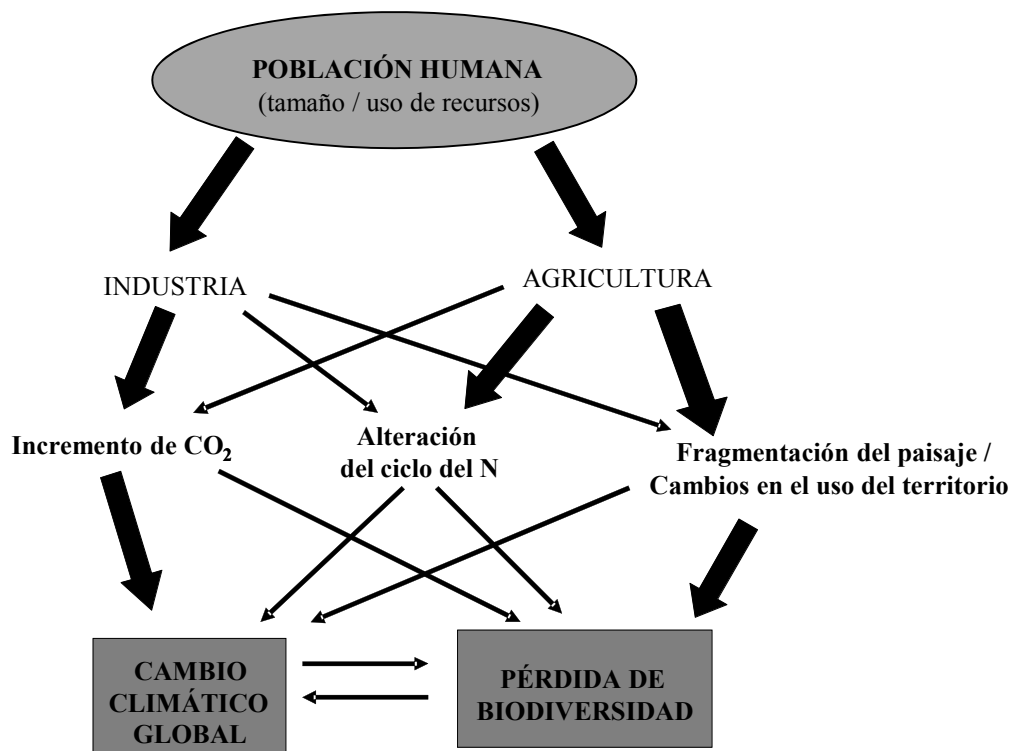
El cambio global puede definirse como el conjunto de cambios ambientales que, influenciados por la actividad humana, alteran la estructura y función de nuestro planeta como sistema (Vitousek, 1994). En este término se incluyen distintas actividades que, aunque ejercidas localmente, tienen efectos que trascienden el ámbito local o regional para afectar al funcionamiento global del sistema Tierra (Duarte *et al.* 2006).

La investigación ha permitido distinguir diferentes componentes del cambio global, como el incremento en la concentración atmosférica de dióxido de carbono, la alteración del ciclo del nitrógeno, los cambios en el uso del suelo, la distribución planetaria de compuestos orgánicos sintéticos, como los CFCs y los PCBs, la alteración de otros ciclos biogeoquímicos elementales, el excesivo consumo de recursos por parte de la población humana, la invasión de especies exóticas, etc. Tradicionalmente se han enfatizado tres de estos componentes del cambio global, por estar bien documentados, tener sobre ellos la certeza de que efectivamente están teniendo lugar, por estar sus causas más próximas

claramente definidas, y por mostrar relaciones causales directas con el cambio climático global y la pérdida de biodiversidad: el incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>, la alteración en el ciclo global del nitrógeno y los cambios en el uso del territorio y la fragmentación del paisaje (Vitousek, 1994). Estos tres pilares básicos, cuyos efectos se manifiestan a distintas escalas espaciales y temporales, interaccionan con la actividad humana y entre sí mediante un complejo sistema de relaciones recíprocas (**Figura I.1**).

### *I.1.1. El incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>.*

Entre los principales componentes del cambio global, el incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>, responsable junto con otros agentes del incremento de temperatura a escala global, ocupa un lugar especial; en primer lugar, porque se manifiesta, sin restricción espacial de ningún tipo, hasta en el último rincón del planeta, y en segundo lugar, porque afecta directamente a la fotosíntesis, el proceso vital más elemental (Körner, 2003).



**Figura I.1.** La relación existente entre la población y las principales actividades humanas, los componentes del cambio global mejor documentados y sus efectos sobre el clima y la biodiversidad. El grosor de las flechas es proporcional a la gravedad del cambio. Tomado de Vitousek (1994).

A diferencia de otros compuestos químicos liberados a la atmósfera a partir de distintas actividades humanas, y que podrían ser clasificados como contaminantes, el CO<sub>2</sub> ha constituido el recurso básico para la vida desde que la fotosíntesis eucariótica ha existido, posiblemente desde hace más de 2.5 millones de años (Tolbert, 1994; Knoll, 2004; Giordano *et al.* 2005), de ahí que el súbito y rápido incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> juegue un papel excepcional.

A partir de los registros efectuados en el observatorio de Mauna Loa, en Hawái, y de los análisis realizados en burbujas de aire atrapadas en cilindros de hielo obtenidos en la Antártida y Groenlandia, se ha constatado que estamos siendo testigos de un hecho inusual en la historia reciente de la Tierra, que coincide claramente con la rápida proliferación de nuestra especie y nuestra expansión en el uso de recursos. Mientras que en los últimos 400000 años, la concentración de CO<sub>2</sub> no ha excedido de 290 ppm (Petit *et al.* 1999), la concentración registrada hoy día es un 30% superior a la existente antes de la Revolución Industrial y el doble de la hallada hace 18000 años, durante la última glaciación (Neftel *et al.* 1988). Mediante el empleo de técnicas basadas en la abundancia natural de isótopos de carbono, se ha confirmado que la principal fuente de este CO<sub>2</sub> es la quema masiva de combustibles fósiles, seguida del proceso de deforestación (Vitousek, 1994).

Una concentración creciente de CO<sub>2</sub> en la atmósfera no sólo tiene consecuencias notables para el clima del planeta, considerando que se trata de un gas de efecto invernadero, sino que genera, además, efectos directos en los sistemas biológicos (Vitousek, 1994). Las tasas fotosintéticas de muchas especies vegetales, especialmente las de tipo C3, se ven incrementadas en respuesta al incremento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, y la respuesta diferencial que puedan mostrar las especies ante este cambio puede generar cambios en la composición de las comunidades vegetales. Incluso se han descrito efectos en los ecosistemas acuáticos derivados del incremento de la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>: al incrementarse en consecuencia la presión parcial de CO<sub>2</sub> en el agua del mar, se reduce el grado de sobresaturación de la aragonita, la forma de carbonato cálcico que constituye el principal componente de los arrecifes de coral (Smith y Buddemeier, 1992). Así, con los incrementos pronosticados de CO<sub>2</sub>, la precipitación de este mineral podría disminuir significativamente, lo que debilitaría los esqueletos coralinos y haría que los arrecifes coralinos se volviesen más vulnerables a tormentas y otras perturbaciones. Las consecuencias de estos cambios para el funcionamiento de estos ecosistemas, de los más diversos del planeta, se desconocen aún.

### *1.1.2. La alteración del ciclo global del nitrógeno.*

El nitrógeno es un elemento clave que controla la composición específica, la diversidad, la dinámica y el funcionamiento de muchos ecosistemas terrestres y acuáticos. La mayor parte de las especies vegetales originales de estos ecosistemas están adaptadas y funcionan óptimamente en suelos o soluciones con bajas concentraciones de nitrógeno disponible. El crecimiento y la dinámica de las poblaciones de herbívoros, e incluso en última instancia, de sus depredadores, están también afectadas por el nitrógeno (Vitousek *et al.* 1997).

El ciclo del nitrógeno consiste en un *pool* grande, bien mezclado, de  $N_2$  en la atmósfera; pequeñas cantidades de este elemento en forma de compuestos con C, H y O, que circula entre plantas, animales, sedimentos, suelo y “disoluciones”; y un conjunto relativamente pequeño de transferencias entre estos reservorios, en gran medida mediadas por seres vivos (Schlesinger, 1991).

La agricultura, la quema de combustibles fósiles y otras actividades humanas han alterado este ciclo global sustancialmente, generalmente incrementando tanto la disponibilidad como la movilidad de éste sobre extensas regiones del planeta (Vitousek *et al.* 1997). Así, la fijación industrial de nitrógeno mediante fertilizantes enriquecidos en este elemento, y la extensión de los cultivos de leguminosas, que fijan este elemento desde la atmósfera, actuando simultáneamente y a distintas tasas, ha provocado que hoy día la fijación de nitrógeno debida a la actividad humana supere a la que se produce por causas naturales (Vitousek, 1994; Vitousek *et al.* 1997). Por otro lado, la actividad humana moviliza grandes cantidades de este elemento químico desde reservorios a largo plazo, mediante la quema de biomasa y combustibles fósiles, el desecado de zonas húmedas, y cambios en el uso del suelo y desmontes (Matson *et al.* 1987; Crutzen y Andreae, 1990; Vitousek y Matson, 1993). Tanto el nitrógeno recién fijado como el movilizado pueden ser transportados en solución o a través de la atmósfera, lo que implica que, aunque la mayor parte de las alteraciones de este ciclo tengan lugar de forma localizada, su influencia se extiende regionalmente e incluso globalmente (Vitousek *et al.* 1997).

El incremento en la fijación y movilización de nitrógeno se asocia con un incremento en la emisión, transporte, reacción y deposición de gases traza que contienen este elemento, como el amoníaco ( $NH_3$ ), el óxido nitroso ( $N_2O$ ) y el óxido nítrico (NO) (Vitousek *et al.* 1997). El óxido nitroso es un potente gas de efecto invernadero, capaz de absorber la radiación infrarroja para longitudes de onda no cubiertas por otros gases, por lo que contribuye en un pequeño porcentaje al calentamiento global (Albritton *et al.* 1994)

Además, y a pesar de ser un gas inerte en la troposfera, en la estratosfera sus moléculas son destruidas por fotólisis o al reaccionar con átomos de oxígeno excitados, catalizando la destrucción de ozono estratosférico (Crutzen y Ehhalt, 1977). Por su parte, el óxido nítrico afecta a la concentración del principal agente oxidante en la atmósfera, el radical hidroxilo (OH) (Logan, 1985), y contribuye a la formación fotoquímica de ozono troposférico, considerado el contaminante atmosférico gaseoso más importante por sus efectos sobre la salud humana y la productividad de las plantas (Reich y Amundson, 1980; Chameides *et al.* 1994). Además, el producto final de su oxidación, el ácido nítrico, es el principal componente de la lluvia ácida (Vitousek *et al.* 1997). Finalmente, el amoníaco es el principal agente neutralizador de ácidos en la atmósfera, donde influye en el pH de las nubes, los aerosoles y la lluvia y altera otros aspectos de la química atmosférica (Schlesinger y Hartley, 1992).

Además de estos efectos en la atmósfera, el incremento en la fijación y movilización de nitrógeno tiene notables consecuencias sobre los ecosistemas terrestres. Por un lado, y dado que las tasas de producción y acumulación de biomasa en los ecosistemas están limitadas por este elemento (Tamm, 1991; Vitousek y Howarth, 1991), particularmente en ecosistemas templados y boreales, el incremento en su deposición, aparejado al incremento en la concentración atmosférica de gases nitrogenados, contribuye a incrementar la cantidad de carbono fijada y almacenada en los ecosistemas forestales (e.g. Rasmussen *et al.* 1993, Aber *et al.* 1995). Si la deposición de nitrógeno es crónica y sobrepasa ciertos umbrales, el efecto “fertilizador” inicial da paso, con el tiempo, al decaimiento de la masa forestal, mediante el proceso conocido como “síndrome de saturación de nitrógeno” (Ågren y Bosatta, 1988; Aber *et al.* 1989; Aber, 1992).

Respecto a los ecosistemas acuáticos, el lavado de nitrógeno hacia ellos puede reducir la calidad del agua (Turner y Rabelais, 1991), iniciar un proceso de acidificación de ecosistemas acuáticos (Vitousek *et al.* 1997) e incluso contribuir a la eutrofización, en ecosistemas acuáticos de agua dulce con suficiente fósforo (Schindler *et al.* 1985), todo ello con las consiguientes consecuencias para estos ecosistemas.

### *1.1.3. Los cambios en el uso del territorio y la fragmentación del paisaje.*

El tercero de los componentes del cambio global sobre los que se tiene mayor certeza está constituido por los efectos derivados de los cambios en el uso del territorio y la fragmentación del paisaje. Éste ha sido, durante décadas, el principal componente del

cambio global en cuanto a sus efectos sobre los sistemas ecológicos (Vitousek, 1992; National Research Council, 1993).

Sin embargo, y a pesar de su importancia, la cuantificación de los cambios en el uso del suelo como un fenómeno global no ha estado exenta de dificultades, considerando que los cambios en el uso del territorio, al contrario que el incremento global del CO<sub>2</sub> o de la temperatura, tienen lugar de forma heterogénea a lo largo y ancho del planeta, y su importancia global deriva precisamente de la suma de muchos cambios locales ocurriendo simultáneamente en lugares diferentes (Vitousek, 1994). Cambios en la intensidad de uso del suelo, en el área total deforestada, en el tamaño o en la disposición espacial de los claros del bosque, en la intensidad del aclareo, o en el incremento del efecto borde derivado de un incremento en la fragmentación del territorio y el paisaje... son sólo algunos aspectos a través de los que se expresa este componente del cambio global.

Con el paso del tiempo han ido apareciendo herramientas técnicas para abordar el problema de su estudio (como por ejemplo, el análisis de imágenes obtenidas por satélite para cuantificar la deforestación en una zona concreta), y más comúnmente, métodos para estudiar las interacciones entre los cambios en el uso del suelo y las condiciones climáticas: estudios históricos y paleoecológicos, estudios de campo y en invernadero, y fundamentalmente modelos por ordenador -globales, regionales o a escala de paisaje-, a los cuales es posible incorporar la complejidad de los sistemas climáticos (temperatura global, precipitación, radiación solar) y la respuesta de las comunidades vegetales a la influencia de las actividades humanas (Dale, 1997).

Los efectos ecológicos de las alteraciones en el uso del suelo y la fragmentación del paisaje incluyen cambios en la biodiversidad, la disponibilidad de hábitats, la degradación y erosión del suelo, la productividad, la riqueza en recursos y la calidad del agua (Dale, 1997). En los sistemas terrestres, cuando el tipo de cobertura de un territorio es modificado o sustituido por otro diferente, éste puede no ser capaz de albergar especies propias de la zona, disminuyendo así la biodiversidad. Así, la deforestación, la principal causa de alteración y pérdida de hábitats, sigue siendo la principal amenaza para la conservación de esta biodiversidad (Wilson, 1988). Además, ciertas prácticas de manejo del territorio que pueden causar erosión, o la exportación de nutrientes del suelo hacia otras zonas, originan cambios en la cantidad y calidad del suelo. Otras, como la fertilización o la irrigación, pueden alterar la productividad natural de un sistema. En este sentido, se ha constatado que, frente al uso sostenible que los indígenas de distintas partes del mundo hacen del territorio y los recursos que éste contiene (Anderson, 1990), los

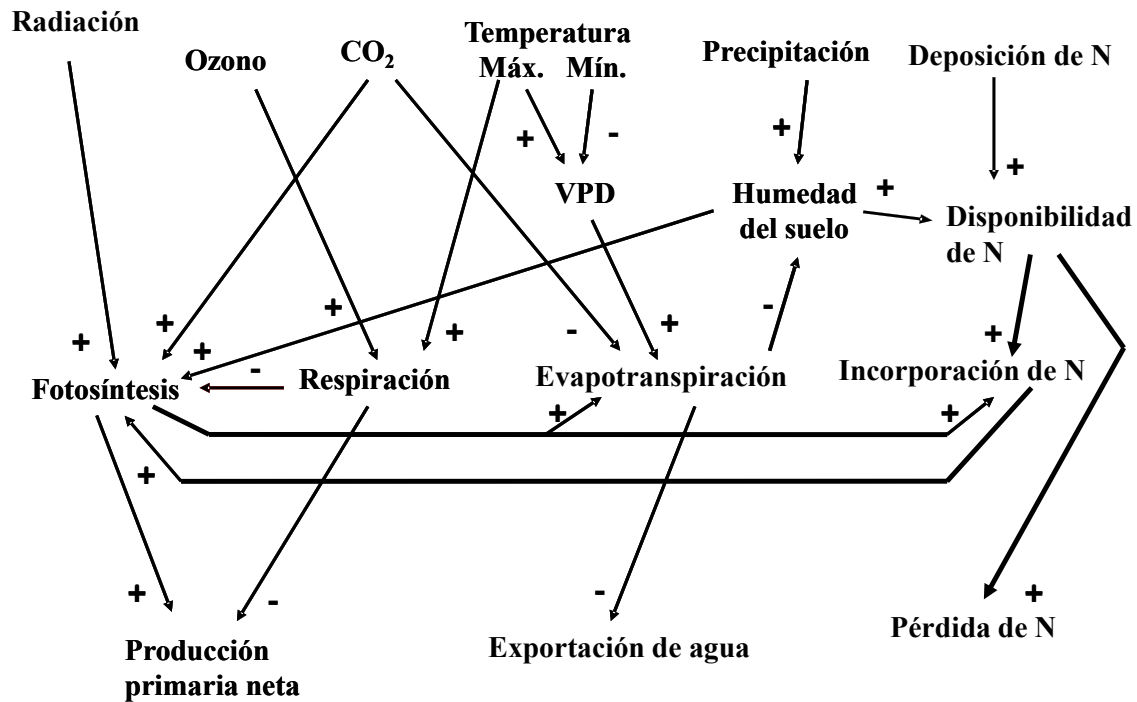
países desarrollados no promueven usos del territorio capaces de aprovechar estos recursos, y han contribuido a la desaparición de especies con alto potencial para su uso como alimentos, la obtención de fibra o la creación de nuevos fármacos (Wilson, 1988).

La fragmentación del paisaje puede asimismo reducir la diversidad de especies (Fahrig y Paloheimo, 1988), ya que puede generar la degradación o pérdida del hábitat, cambios en procesos clave como la dispersión de semillas, o la introducción de otros nuevos, como la competencia con especies exóticas. La gravedad del cambio radica no sólo en la intensidad de la causa que lo genera, sino también en los requerimientos de hábitat de cada especie y su capacidad para alcanzar fragmentos de ese hábitat a escala de paisaje (Dale, 1997).

También el equilibrio de los ecosistemas de agua dulce se encuentra estrechamente ligado a cambios en el clima y el uso del suelo. Cualquier alteración de la cuenca hidrográfica, y el uso y modificación de recursos acuáticos por parte del hombre constituyen una importante causa de estrés en estos sistemas, y deben considerarse junto con los posibles efectos derivados del cambio climático en la gestión de estos sistemas (Carpenter *et al.* 1992).

## **I.2. Las consecuencias del cambio global en los ecosistemas forestales.**

El cambio global implica la rápida y simultánea alteración de factores ambientales claves en el control de la dinámica de los ecosistemas forestales (Aber *et al.* 2001). Esto se debe, en primer lugar, a que cualquier cambio en el ambiente físico y químico de un organismo genera sobre éste efectos fisiológicos, directos e indirectos, y a que, en la actualidad, la actividad humana está alterando de forma cuantificable “rasgos” ambientales determinantes para las comunidades de organismos, como la precipitación, la temperatura o las concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono, ozono y nitrógeno (Aber *et al.* 2001). Estos cambios y los efectos fisiológicos derivados de ellos interaccionan afectando el ciclado del carbono, el nitrógeno y el agua entre los organismos vegetales y el suelo (**Figura I.2**). La respuesta de un individuo en particular inicia así la cascada de procesos ecológicos que, al considerar la comunidad en su conjunto, se manifiesta como cambios en las propiedades del sistema. Algunos de estos cambios en el sistema pueden, en sentido inverso, ejercer su influencia sobre el clima y el uso del territorio (Hansen *et al.* 2001).



**Figura I.2.** Interacciones entre factores ambientales clave sometidos a cambios debidos a las actividades humanas, y los principales procesos determinantes de la dinámica del agua, el carbono y el nitrógeno en los ecosistemas forestales. (+) indica un incremento, y (-) una supresión, del proceso receptor. Tomado de Aber *et al.* (2001).

Para comprender los efectos del cambio global sobre los ecosistemas forestales, es necesario analizar la influencia que sus principales componentes – alteraciones globales de los ciclos del carbono y del nitrógeno, cambios en el uso del territorio y fragmentación del paisaje – tienen sobre estos sistemas, y estudiar las consecuencias que cambios en estos componentes tendrían sobre ellos. Todo ello sin olvidar que el efecto del cambio global no sólo será la suma de los cambios mediados por los distintos componentes, sino también las posibles interacciones y sinergias entre los distintos procesos que se vean modificados.

Así, considerando la tasa actual a la que se manifiestan tanto la fragmentación del paisaje como los cambios en el uso del territorio, en el futuro se espera la pérdida definitiva (o reducción significativa) de cuantiosos hábitats, así como la desaparición de numerosas especies, inevitablemente ligada a estos fenómenos. Por el contrario, las alteraciones de los ciclos globales de elementos como el carbono y el nitrógeno, y en general la modificación de la química atmosférica por distintas causas, se asocian tradicionalmente con el cambio climático. Si bien las predicciones a que han llegado distintos grupos de expertos y comités científicos difieren en ciertos aspectos, relacionados sobre todo con la celeridad del cambio y la gravedad del mismo, todos coinciden en que la novedad de los cambios esperados para este siglo radica en la velocidad a la que se

incrementará la temperatura (Flenley, 1998). En general, las predicciones coinciden en un incremento en la temperatura global y en las concentraciones atmosféricas de CO<sub>2</sub> y de ozono, así como en los niveles de deposición de nitrógeno y de radiación. El cambio climático supondrá, además, cambios inciertos en los patrones regionales de precipitaciones y temperaturas, la humedad del aire, la cobertura de nieve, y la frecuencia y severidad de incendios, tormentas y eventos extremos (Le Houérou, 1996; Michener *et al.* 1997), con las lógicas consecuencias de estos procesos sobre los distintos ecosistemas forestales que se vean afectados.

### *1.2.1. Influencia de la temperatura, la radiación y el régimen de precipitaciones.*

La temperatura determina la fenología de cada especie, controlando procesos como la floración, la dormancia de las yemas y la maduración de conos, y afectando en última instancia a la producción y calidad de las semillas y frutos (Kozlowski y Pallardy, 1997). Además, cambios en la temperatura del aire durante el otoño y la primavera pueden afectar la tolerancia a las heladas de las acículas de los árboles (Guak *et al.* 1998).

La temperatura también afecta a la fase luminosa de la fotosíntesis mediante la alteración del contenido en pigmentos, la tasa de saturación de la fotosíntesis, la eficiencia fotoquímica del fotosistema II y los procesos de fotoinhibición. En latitudes templadas, el efecto neto de una temperatura más cálida sería positivo (Saxe *et al.* 2001), incrementándose la tasa neta de fijación de carbono. En general, unas temperaturas más cálidas incrementarían las tasas de prácticamente cualquier proceso químico y bioquímico, tanto en el suelo (descomposición de materia orgánica, mineralización y ciclado de nutrientes) como en los distintos individuos, hasta el punto de desintegración de las enzimas correspondientes (Saxe *et al.* 2001).

La temperatura media de la Tierra depende, en gran medida, del flujo de radiación solar que recibe, que constituye al mismo tiempo el motor de distintos fenómenos atmosféricos, al aportar la energía necesaria para que éstos se produzcan. Debido a que ese aporte de energía apenas varía en el tiempo, no se considera que este factor contribuya notablemente a la variabilidad climática a corto plazo (Crowley y North, 1988). Sin embargo, las variaciones en el campo magnético solar y, por tanto, en las emisiones de viento solar (con influencia sobre los rayos cósmicos que llegan a la Tierra), influyen notablemente en distintos componentes del clima (diversas oscilaciones oceánicas, como la Oscilación Decadal del Pacífico (*Pacific Decadal Oscillation*, o PDO), la Oscilación

Multidecadal del Atlántico (AMO), el Índice de Oscilación del Sur (SOI), los eventos de El Niño y La Niña (ENSO o *El Niño - Southern Oscillation*), las corrientes en chorro polares, la Oscilación Cuasi-Bianual (QBO) de los vientos zonales en la estratosfera tropical, etc.). Además, la interacción de la alta atmósfera terrestre con las partículas provenientes del sol generan reacciones químicas que modifican la composición del aire y de las nubes, y algunas hipótesis sostienen que esta interacción juega un papel fundamental en la formación de núcleos de condensación y la frecuencia en la formación de nubes, con notables consecuencias sobre el clima de nuestro planeta (Svensmark y Friis-Christensen, 1997; Svensmark, 2007). En este sentido, lo más reseñable de que se produzcan cambios en la formación de nubes no es sólo que puedan modificarse los patrones regionales de precipitaciones y temperatura, sino que también habrá una influencia directa en la cantidad de radiación solar recibida en distintos puntos de la superficie del planeta.

Por su parte, la destrucción de la capa de ozono estratosférico, si bien se ha visto desacelerada en los últimos años, incrementa la exposición a altos niveles de radiación ultravioleta (fundamentalmente, la de tipo UV-B; Caldwell *et al.* 1989; Stapleton, 1992), lo que facilita el desarrollo de procesos de fotoinhibición y de otras consecuencias notables sobre los organismos vegetales (daños en el ADN, en el fotosistema II y en la Rubisco; reducción de la capacidad fotosintética, la regeneración de RuBP y el rendimiento cuántico; reducción del contenido en pigmentos fotosintéticos, alteración de la función estomática y de la morfología del dosel, e indirectamente, retardo en la asimilación fotosintética de carbono y limitación de la productividad vegetal; e.g. Stapleton (1992) o Teramura y Sullivan (1994)). Finalmente, a una escala espacial mayor, cualquier cambio en el uso del suelo que pueda alterar sensiblemente la cubierta vegetal de un determinado territorio (deforestación, desbrozado, desmontes, roturación e introducción de cultivos, etc.), va a tener consecuencias inmediatas sobre la cantidad de radiación incidente, y por ende, sobre los ecosistemas forestales que se vean afectados.

Respecto al régimen de precipitaciones, las predicciones sobre el cambio climático apuntan hacia un aumento de la duración e intensidad de las sequías durante el siglo XXI, asociadas con un régimen más irregular de las precipitaciones, y con temperaturas más extremas y por lo general más cálidas. La heterogeneidad espacial de estas variables es elevada, especialmente en lo referente al régimen de precipitaciones, por lo que resulta difícil hacer predicciones para áreas concretas (Valladares *et al.* 2005). Para la región mediterránea, por ejemplo, se han pronosticado cambios espacialmente complejos en los

patrones regionales de precipitación, así como una reducción en la frecuencia de lluvias sobre determinadas áreas que exacerbaría la sequía estival característica (IPCC 2007). En cualquier territorio, estos cambios tendrán lógicas consecuencias sobre la distribución y funcionamiento de los ecosistemas forestales (extinciones locales, cambios en la dominancia, composición y distribución de especies...).

La sequía limita el crecimiento y la supervivencia vegetal, especialmente en ecosistemas limitados por agua como los mediterráneos (Sabaté *et al.* 2002), en los que la sequía estival constituye una de las principales causa de mortalidad (Kozłowski, 1968; Mooney, 1983; Dunne y Parker, 1999; Castro *et al.* 2005) y es el factor que pone fin a la estación de crecimiento, frente a la temperatura en otros ecosistemas forestales (Woodward, 1987). La sequía, además, afecta negativamente a la reproducción y altera la fenología de distintas especies, actuando de filtro selectivo de éstas según su tolerancia al estrés hídrico (Valladares *et al.* 2005).

### *1.2.2. Efecto del incremento en los niveles de CO<sub>2</sub> y ozono troposférico.*

La exposición experimental de árboles a niveles elevados de CO<sub>2</sub> ha mostrado cambios significativos en la fenología, el crecimiento y en distintos procesos fisiológicos (Aber *et al.* 2001). El efecto más consistente es el incremento en la tasa de carboxilación del aparato fotosintético y una reducción de la fotorrespiración (Long *et al.* 1996), lo que conlleva un incremento en la tasa de fotosíntesis neta y en el crecimiento, al menos a corto plazo (Eamus y Jarvis, 1989; Bazzaz, 1990; Long *et al.* 1996; Mohren *et al.* 1999; Kozłowski y Pallardy, 1997). Sin embargo, sólo en contadas ocasiones se ha encontrado un incremento en el crecimiento como respuesta directa a niveles de CO<sub>2</sub> altos prolongados (e.g. Jacoby y D'Arrigo, 1997; DeLucia *et al.* 1999). Algunos estudios a largo plazo sugieren fenómenos de limitación de las tasas fotosintéticas con el tiempo (una reducción en la ganancia de carbono debido a la limitación por otro nutriente o a la inhibición por la presencia de producto final) (Long *et al.* 1996; Lambers *et al.* 1998; Rey y Jarvis, 1998), atribuible quizás, a la acumulación de reservas fotosintéticas (Bazzaz 1990). Los cambios morfológicos que experimentan los árboles en este tipo de experimentos también podrían explicar la respuesta hallada (Norby *et al.* 1992, Pritchard *et al.* 1998, Tjoelker *et al.* 1998).

En atmósferas enriquecidas en CO<sub>2</sub> se han hallado, asimismo, un incremento en la eficiencia en el uso del agua y una significativa reducción del estrés hídrico. Aunque

existe cierta incertidumbre respecto a si tiene lugar, además, una disminución en la conductancia estomática (Long *et al.* 1996; Will y Teskey, 1997, Curtis y Wang, 1998; Saxe *et al.* 1998), la eficiencia en el uso del agua se incrementa, con o sin cambios en aquélla, dado que el incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> permite una mayor fijación de carbono con una pérdida de agua invariable.

Niveles altos de CO<sub>2</sub> atmosférico pueden tener también efectos indirectos, como la disminución en la concentración de nitrógeno y el incremento en carbohidratos no estructurales y metabolitos secundarios, que pueden alterar la resistencia del individuo a las plagas y a la herbivoría, e influenciar las tasas de descomposición de la hojarasca y el ciclado de nutrientes (Landolt y Pfenninger, 1997; Roth *et al.* 1997; Cotrufo *et al.* 1998, Scherzer *et al.* 1998; Williams *et al.* 1998).

Por su parte, el ozono es un potente oxidante que daña las membranas celulares y requiere que el individuo gaste parte de sus reservas de energía en la reparación de los tejidos dañados (Aber *et al.* 2001). Un incremento en la concentración de ozono produce, por tanto, una depresión en la tasa de fotosíntesis neta y en las reservas de energía del individuo.

### *1.2.3. Consecuencias del incremento en la deposición de nitrógeno.*

El nitrógeno es el elemento que limita frecuentemente la producción primaria en ecosistemas terrestres (Tamm, 1991; Vitousek y Howarth, 1991), por lo que un leve aumento en su disponibilidad tiene un efecto “fertilizador”, produciéndose un incremento en el crecimiento (e.g. Rasmussen *et al.* 1993, Aber *et al.* 1995). Posteriormente se ha comprobado que este efecto sólo se manifiesta inicialmente: el potencial de retención del nitrógeno añadido, a través del incremento en la producción y el almacenamiento de materia orgánica, es limitado, y los efectos de una deposición crónica de nitrógeno por encima de umbrales naturales origina el conjunto de síntomas que denominamos “síndrome de saturación de nitrógeno” (Ågren y Bosatta, 1988; Aber *et al.* 1989, Aber, 1992). Distintos trabajos de investigación han relacionado la excesiva adición de este elemento con un incremento en la movilidad del nitrato, la pérdida de nutrientes catiónicos, el incremento en la acidez del agua y el suelo (McNulty y Aber, 1993; Boxman *et al.* 1995; Emmett *et al.* 1995) y desequilibrios nutricionales en árboles, junto con reducciones en la fotosíntesis neta, la eficiencia fotosintética en el uso de este elemento

químico y el crecimiento, e incluso con un incremento de la mortalidad en árboles (Shortle y Smith, 1988; Schulze, 1989; Aber *et al.* 1995; Cronan y Grigal 1995).

#### *1.2.4. Cambios en la distribución de especies. Adaptación y evolución.*

La distribución de una especie en particular refleja su respuesta a distintos factores climáticos y edáficos, y a interacciones bióticas, como la herbivoría o la competencia (Hansen *et al.* 2001). Las tasas de nacimiento, crecimiento, dispersión y mortalidad, que definen la distribución y abundancia de una población, están influenciadas por factores ambientales entre los que se cuenta el propio clima, el cual altera la disponibilidad de recursos, la fecundidad y la supervivencia (Hansen y Rotella, 1999).

Mientras que la tolerancia a la temperatura de una especie en particular determina los límites norte y sur de su rango de distribución (e.g. Brooks *et al.* 1998), otros factores como el estrés hídrico o las interacciones con especies competidoras juegan asimismo un papel crucial en la distribución de la especie (Loehle y LeBlanc, 1996; Loehle, 1998). Incluso la exposición a eventos extremos tiene también una influencia potencial sobre el crecimiento y la supervivencia de algunas especies (Bassow *et al.* 1994).

La natalidad, la mortalidad y otras tasas poblacionales también se ven afectadas por los cambios en el uso del suelo: la reducción en la disponibilidad de hábitat (si la actividad humana modifica la cantidad y/o calidad de éste) puede reducir la diversidad genética, y por ende, la habilidad de una especie para desarrollar adaptaciones a nuevos ambientes (Gilpin, 1987). Cambios en la configuración espacial de los distintos hábitats (por cambios en el uso del territorio o fragmentación del paisaje) favorecen la reducción de la conectividad entre los distintos parches resultantes, lo que podría constreñir la habilidad de muchas especies para “moverse” a través del territorio en respuesta al cambio climático. (Primack y Miao, 1992; Iverson *et al.* 1999).

#### *1.2.5. Respuestas a nivel de ecosistema. Interacciones.*

Las comunidades no responderán al cambio global como unidades intactas, a causa de la respuesta diferencial de las distintas especies que las forman; su composición cambiará en respuesta a un complejo conjunto de factores, incluyendo los efectos directos del clima, la dispersión diferencial de las especies y los efectos indirectos asociados a cambios en el régimen de perturbación, el uso del suelo e interacciones interespecíficas (Peters 1992).

Esta alteración de la riqueza específica de un territorio, por éstas o por otras causas, puede influir a su vez en el funcionamiento del ecosistema. Por ejemplo, los ecosistemas con mayor riqueza en especies nativas son a veces las más resilientes a la perturbación (Frank y McNaughton, 1991; Wardle *et al.* 2000).

La alteración del ciclo global del nitrógeno, asimismo, origina consecuencias en procesos ecológicos a nivel de población y de comunidad. Distintos experimentos de fertilización han demostrado que, en aquellos ecosistemas en los que el nitrógeno limita la producción, la adición de este nutriente favorece la dominancia de una o unas pocas especies (especies no eficientes en su uso, como la gran mayoría), de manera que aunque la producción primaria se incremente, la diversidad de especies disminuye sensiblemente (Tilman, 1987; Berendse y Elberse, 1990; Huenneke *et al.* 1990). Incluso puede llegar a disminuir la diversidad entre comunidades, porque la deposición de nitrógeno incrementa su disponibilidad en lugares antes estériles, favoreciendo así la expansión de especies que demandan este elemento en mayor medida (Vitousek y Matson, 1993).

En respuesta a niveles altos de CO<sub>2</sub>, la conductancia del dosel se reduce, limitando así la entrada de ozono a través de los estomas, y los subsiguientes efectos de este contaminante. El estrés hídrico tiene un efecto similar, reduciendo la conductancia estomática. Por otro lado, si la deposición de nitrógeno incrementa la concentración foliar en este nutriente, y por ende se estimulan tanto la fotosíntesis como la conductancia estomática, entonces el efecto positivo del incremento en la fotosíntesis se vería parcialmente eclipsado por el incremento en la entrada de ozono. Y las reducciones en la producción causadas por el ozono podrían acelerar el inicio de la saturación de nitrógeno y la subsiguiente acidificación de suelos y arroyos.

### **I.3. Los ecosistemas forestales templados y mediterráneos ante el cambio global.**

Los bosques templados se distribuyen entre los 30 y los 55° de latitud, si bien se concentran principalmente entre los 40 y los 50°, en zonas donde las temperaturas no son extremas y la precipitación varía entre los 650 y los 3000 mm anuales. En Asia, se localizan principalmente en Japón, el este de China, Corea y el este de Siberia. En Europa, se extienden desde Escandinavia hasta el norte de la Península Ibérica, y desde las Islas Británicas hasta Europa oriental. En Norteamérica, los bosques templados caducifolios se extienden desde la costa atlántica hasta las grandes planicies, mientras que en la costa pacífica predominan los bosques de coníferas, que se extienden desde el norte de

California hasta el sur de Alaska. En el hemisferio sur, hay bosques templados en el sur de Chile, en Nueva Zelanda y en el Sur de Australia.

Se trata por lo general de bosques densos y profundos en los que, si bien la diversidad de especies presentes es menor que la hallada en bosques tropicales, ésta es bastante elevada, especialmente en el caso de bosques caducifolios. Los bosques de coníferas, por el contrario, suelen encontrarse dominados por unas pocas especies. La productividad en estos bosques es también muy elevada, y la biomasa puede ser tan grande como la hallada en bosques tropicales, incluso superior. Se asientan frecuentemente en suelos fértiles, neutros o ligeramente ácidos, ricos en materia orgánica y en nutrientes inorgánicos, especialmente en el caso de bosques caducifolios. Los bosques de coníferas pueden también desarrollarse en suelos más pobres y ácidos, y en ellos el movimiento de nutrientes entre el suelo y la vegetación tiende a ser menor y más conservativo.

Los bosques templados caducifolios se distribuyen principalmente por zonas con clima continental húmedo en las que, si bien las precipitaciones se distribuyen uniformemente a lo largo del año, la temperatura media oscila sensiblemente entre estaciones, por lo que la estación de crecimiento se encuentra limitada generalmente por la bajada de las temperaturas. Los bosques templados de coníferas, por el contrario, se hallan a menudo en zonas con un clima de fuerte influencia marítima. Las temperaturas son moderadas, con escasas oscilaciones, y las precipitaciones frecuentes y abundantes, incluso en verano, lo que permite que la estación de crecimiento sea mucho más larga.

Los bosques mediterráneos constituyen parte de un bioma mucho más fragmentado y disperso, distribuido entre la costa oeste norteamericana, desde California hasta el norte de Méjico, la zona central de Chile, la cuenca mediterránea, Sudáfrica y el suroeste de Australia, entre los 30° y los 40° de latitud aproximadamente. Se encuentran sometidos al clima típicamente mediterráneo, caracterizado por niveles promedio de irradiancia elevados, una notable amplitud térmica entre estaciones, y un patrón anual de precipitaciones frecuentemente impredecible, aunque siempre con la disponibilidad de agua en el suelo restringida a las estaciones más frías. Existe una prolongada y severa sequía estival, que marca el fin de la estación de crecimiento, fruto de la coincidencia temporal entre los máximos valores registrados de irradiancia y evapotranspiración y el mínimo anual de precipitaciones. Estos bosques se encuentran frecuentemente en su límite hídrico, con tasas de evapotranspiración anual próximas al total de precipitaciones (Peñuelas 2001, Valladares *et al.* 2005), por lo que la disponibilidad hídrica está considerada como el principal factor que afecta la actividad de las plantas en ecosistemas

mediterráneos (Blondel y Aronson, 1999). Se trata por tanto de ambientes espacial y temporalmente heterogéneos respecto a factores clave como la luz y la disponibilidad de agua en el sustrato, y las especies vegetales presentes en ellos muestran frecuentemente adaptaciones y estrategias encaminadas al buen desenvolvimiento de sus individuos en estas condiciones (Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000).

Tradicionalmente, en la investigación relativa al cambio global, se ha puesto especial énfasis en los efectos de éste sobre los bosques templados, dado que se trata de sistemas altamente antropizados y de gran importancia ecológica y económica, considerando no sólo la gran extensión que suponen sino también la importancia de su gestión, encaminada principalmente hacia la producción de madera y papel. Los bosques mediterráneos no han recibido la misma atención, a pesar de que, de acuerdo con lo señalado por Palahí *et al.* (2008) *i*, constituyen un patrimonio natural único y juegan un papel clave para las comunidades rurales y urbanas de esta región, proporcionando tanto valiosos productos como servicios no comercializables de gran importancia; *ii*, son muy vulnerables a diversos factores: incendios forestales, sobreexplotación, degradación y pérdida de suelo, desertificación...; *iii*, constituyen un importante foco de biodiversidad a nivel global; *iv*, su conservación y gestión influye en la disponibilidad de suelo y de recursos hídricos básicos para las comunidades humanas ligadas a ellos; y *v*, su futuro se encuentra seriamente amenazado, ya que el cambio global, incluyendo el cambio en la química atmosférica y sus efectos en el clima, los cambios en el uso del suelo, y los cambios socio-económicos ligados a ellos, tendrá una influencia particularmente fuerte en aquellas áreas y sistemas que tradicionalmente operen bajo limitaciones ambientales severas, como es el caso de la fuerte sequía estival para los ecosistemas forestales mediterráneos (Körner *et al.* 2005).

Se espera que, en el futuro, los ecosistemas forestales puedan contribuir a la desaceleración del cambio climático, dado que el incremento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>, al potenciar la carboxilación fotosintética y reducir la fotorrespiración (Long *et al.* 1996), incrementa la tasa de fotosíntesis neta; es decir, tiene un efecto fertilizador que permite un sustancial incremento en las tasas de fijación de carbono y de crecimiento (Eamus y Jarvis, 1989; Bazzaz, 1990; Long *et al.* 1996; Mohren *et al.* 1999; Kozłowski y Pallardy, 1997). Incluso, en ecosistemas limitados por el agua, este incremento podría compensar el cierre estomático inducido por la sequía sin reducirse notablemente las tasas de producción (Ceulemans *et al.* 1999). Además, el incremento global de las temperaturas alargaría la estación de crecimiento en bosques templados y

fríos (Aber *et al.* 2001). A nivel de ecosistema, el estímulo en la producción primaria, convierte a estos sistemas en sumideros de carbono, cuyo secuestro a gran escala permitiría, mediante un proceso de retroalimentación, controlar los niveles de incremento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, ralentizando así este incremento, y contribuyendo a reducir los efectos del mismo en el futuro (Lambers *et al.* 1998). Pero, en general, se desconoce la sostenibilidad a largo plazo de este conjunto de interacciones (Bazzaz, 1990; Norby *et al.* 1992; Wullschleger *et al.* 1997), hallándose evidencias que ponen de manifiesto la aparición de fenómenos de *down-regulation* de la fotosíntesis con el paso del tiempo, atribuibles quizás a la limitación por otro nutriente o a la inhibición por acumulación de fotosintatos (Long *et al.* 1996, Lambers *et al.* 1998, Rey y Jarvis, 1998; Bazzaz, 1990; Aber *et al.* 2001).

Por otro lado, el cambio climático lleva aparejado importantes alteraciones en los patrones regionales y estacionales de precipitación, y un incremento en la temperatura media (IPCC, 2007) que contribuiría notablemente a incrementar el déficit de vapor de agua, y por ende la cantidad de agua que se perdería a través de los estomas. Esto comprometería, a nivel individual, la capacidad de fijación de C y la supervivencia a largo plazo, al tiempo que podría entredicho la capacidad de los ecosistemas forestales para desacelerar el calentamiento global.

Además, se prevén cambios en los rangos de distribución de las especies, que pueden alterar no sólo la composición sino también el funcionamiento de los ecosistemas forestales de distintas latitudes, y es posible, asimismo, que tengan lugar modificaciones importantes de la extensión de estos sistemas debido al cambio climático, los cambios en el uso del suelo, la fragmentación del paisaje y otras actividades humanas. Por todo ello, intentar predecir el papel que pueden desempeñar los ecosistemas forestales ante el cambio global es cuanto menos delicado, y es necesario que la investigación ecológica a nivel global priorice el estudio del comportamiento de especies forestales, tanto de bosques templados como de mediterráneos, en relación con los distintos aspectos del cambio global.

En este sentido, la extensión y productividad de los bosques templados los convierte en sistemas clave para el balance de carbono a nivel global, y conocer la forma en que estos sistemas y las especies que los constituyen van a responder al cambio global puede ser determinante para conocer el porvenir del resto de ecosistemas. En contraposición, el interés del estudio de los bosques mediterráneos en el contexto de cambio global radica en que las distintas proyecciones de cambio climático apuntan que

este tipo de ecosistemas pueden hallarse entre los más afectados (Sala *et al.* 2000), al pronosticarse temperaturas más altas y un incremento en la evapotranspiración potencial (IPCC, 2007), así como cambios en los patrones estacionales de precipitaciones, que agravarán el estrés hídrico estival que caracteriza estos ecosistemas (Giorgi *et al.* 2004; Giorgi, 2006; Beniston *et al.* 2007). En particular, en la Europa meridional se prevé que el cambio climático empeore las condiciones climáticas ya existentes (temperaturas altas y sequías) en una región ya vulnerable a la variabilidad climática, y que disminuya la disponibilidad hídrica, lo que produciría un incremento de la aridez a corto plazo. Así, y aunque los cambios proyectados en los patrones de precipitación son espacialmente complejos (e.g. Sumner *et al.* 2003; Sanchez *et al.* 2004; Vicente-Serrano *et al.* 2004), la reducción pronosticada en la frecuencia de precipitaciones en algunas regiones (e.g. Cheddadi *et al.* 2001) exacerbarán las condiciones de sequía características, como ya se ha observado en el Mediterráneo oriental (Körner *et al.* 2005).

Desde esta perspectiva, los bosques mediterráneos, que además operan siempre bajo condiciones ambientales restrictivas, son “empujados” al límite de su propia tolerancia bioclimática y autoecológica, siendo por ello de los primeros en dejar sentir los efectos del cambio global (Körner *et al.* 2005). De hecho, estos ecosistemas se consideran de los más vulnerables frente al cambio global, asumiéndose que experimentarán los impactos ecológicos más severos, incluida la extinción de especies (IPCC, 2007).

#### **I.4. Los abetos circunmediterráneos como objeto de estudio: justificación e hipótesis de partida.**

##### *I.4.1. Los abetos circunmediterráneos. El pinsapo.*

El Cuaternario, que comprende los últimos 2.6 millones de años, ha estado caracterizado por la alternancia de periodos fríos (las Glaciaciones Würm, Riss, Mindel, Gunz, Donau y Briggen), con otros más cálidos, los periodos interglaciales, en los que las condiciones han sido similares o incluso más cálidas que las actuales (Willis y Niklas, 2004). Durante los periodos fríos, que supusieron aproximadamente el 80% de este periodo, muchas regiones situadas a latitudes medias y altas se volvieron inhabitables para la mayoría de las especies animales y vegetales, debido a la presencia de grandes casquetes de hielo y la extensión del *permafrost*, y a la existencia de unas temperaturas entre 10 y 25 °C más frías que las

actuales. A menor latitud, la aridez y unas temperaturas entre 2 y 5 °C más bajas también tuvieron un efecto significativo sobre las distintas comunidades (Willis y Niklas, 2004).

En el hemisferio Norte, durante estos periodos fríos, los rangos geográficos de muchas especies propias de regiones templadas se encontraban restringidos a uno o unos pocos refugios situados en el sur, en forma de poblaciones pequeñas y más o menos aisladas, mientras que las poblaciones situadas más al norte pudieron simplemente desaparecer sin dejar descendientes (Taberlet y Cheddadi, 2002), al no soportar el cambio en las condiciones ecológicas que llevaba aparejado este proceso. Durante el siguiente periodo “cálido”, cada especie expandía su rango principalmente hacia el norte, en busca de espacio disponible, según su capacidad de dispersión y sus requerimientos ecológicos (Taberlet y Cheddadi, 2002). Este modelo de expansión – contracción está bien documentado por registros de polen hallados en Europa y Norteamérica (Taberlet y Cheddadi, 2002).

En Europa, los refugios glaciales se localizaron probablemente alrededor de la cuenca mediterránea, en zonas montañosas de Próximo Oriente y de las penínsulas Ibérica, italiana y de los Balcanes, donde la variada topografía ofrece todo un rango de microclimas que proporcionaron hábitats adecuados tanto en los periodos fríos como en los más cálidos (Bennett *et al.* 1991; Taberlet y Cheddadi, 2002; Tzedakis *et al.* 2002, Carrión, 2003). Por ello, se considera que estos refugios habrían sido de gran importancia para la supervivencia a largo plazo de distintas especies (Bennett *et al.* 1991; Taberlet y Cheddadi, 2002, Willis y Niklas, 2004). Con la llegada de un nuevo periodo interglaciar, estas poblaciones localizadas en el sur constituyeron el punto de partida para la posterior colonización de regiones septentrionales mediante los citados procesos de migración a larga distancia y gran escala (Brewer *et al.* 2002; Taberlet y Cheddadi, 2002; Carrión, 2003).

Se cree que estos refugios glaciales, además de haber sido importantes para la persistencia en el tiempo de distintas especies, han podido jugar un papel clave desde el punto de vista evolutivo (Willis y Niklas, 2004), ya que durante los periodos glaciales, las reducidas poblaciones que sobrevivieron aisladas en estos hábitats pudieron haberse diferenciado mediante procesos de selección y deriva genética. Esta microalopatría se repetiría en cada periodo frío, intercalándose con la expansión del rango geográfico en periodos más cálidos, dándose así unas condiciones que podrían promover procesos de divergencia y especiación, en aquellos casos en los que las poblaciones permaneciesen efectivamente aisladas a lo largo de varios ciclos (Tzedakis *et al.* 2002). En este sentido,

es necesario matizar que, si bien se tiene la certeza de que este aislamiento fue completo en las zonas situadas más al sur (Tzedakis *et al.* 2002), sí que se duda de si estos periodos de aislamiento fueron lo suficientemente largos como para permitir o promover procesos de especiación, especialmente en el caso de especies arborescentes (Willis y Niklas, 2004). En cualquier caso, y aunque es posible que estos procesos de especiación fuesen tan probables como procesos de estasis y extinción de especies (Willis y Niklas, 2004), puesto que constituyen potenciales respuestas a la pérdida y fragmentación del hábitat, la rica diversidad de especies que caracteriza la flora de estos antaño refugios glaciales, en parte debido a su localización geográfica y su historia geológica, también refleja la habilidad de las especies del Terciario para sobrevivir a la extrema variabilidad climática característica del Cuaternario (Tzedakis *et al.* 2002). Así, la amortiguación de los posibles efectos ecológicos en estos refugios no sólo redujo la tasa de extinción de especies sino que además permitió la aparición de otras nuevas (Tzedakis *et al.* 2002).

Estos procesos de extinción local, migración de especies, aislamiento geográfico, diferenciación genética y especiación, reexpansión del rango geográfico, mezcla y redistribución de especies explican la actual ocurrencia y distribución de los abetales circunmediterráneos (ver Scaltsoyiannes *et al.* 1999 para una explicación detallada de los mismos). Así, se ha planteado la hipótesis de que la mayor parte de estas especies tienen una historia común desde el punto de vista evolutivo, al haberse originado a partir de un ancestro común de distribución amplia (Liu, 1971; Meyen, 1987; Palamarev, 1989; Scaltsoyiannes *et al.* 1999). Este ancestro común, de cuya presencia se tiene registro ya a inicios del Mioceno, posiblemente experimentó un proceso de radiación adaptativa como respuesta al amplio rango de gradientes ecológicos que halló en distintos procesos de migración, aislamiento y reexpansión de su rango geográfico. La persistencia en el tiempo de poblaciones aisladas, en cordilleras montañosas distribuidas alrededor de la cuenca mediterránea, originó con el paso del tiempo las diez especies distintas de abetos que se reconocen en la actualidad (**Figura I.3**).

Entre todas ellas, el pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.) constituye una especie endémica cuyos únicos bosques de cierta extensión se sitúan en la Sierra de las Nieves de Ronda, en Sierra Bermeja de Estepona (ambas en Málaga) y en la Sierra del Pinar de Grazalema (Cádiz), aunque pueden encontrarse pinsapos más o menos aislados o formando pequeños bosquetes en los términos municipales de Ronda, Parauta, Istán, Monda, Ojén, Tolox, Yunquera, Estepona, Casarabonela y Cortes, todos ellos en la provincia de Málaga (Blanca *et al.* 1999).



**Figura I.3.** Los bruscos cambios de temperatura ligados a la última glaciación y la transición hacia el Holoceno explican movimientos migratorios generalizados que, trayéndonos especies más propias de latitudes templadas, han dejado tras de sí poblaciones de abetos acantonadas en sistemas montañosos de la cuenca mediterránea. De los dos grupos identificados, el de *Abies pinsapo* (Sección *Piceaster*) está constituido por cinco especies: 1. *A. pinsapo* Boiss. (sur de España); 2. *A. marocana* Trabut (región de Talassemtane, Rif occidental, Marruecos); 3. *A. tazaotana* Côzar ex Huguet del Villar (Monte Tazaot, Rif occidental, Marruecos); 4. *A. numidica* Carrière (Montes Bador y Tababort, Argelia); y 5. *A. cilicica* (Antoine & Kotschy) Carrière (sur de Turquía y norte de Siria). El grupo de *Abies alba* (Sección *Abies*) está constituido por siete especies: 6. *A. nordmanniana* (Steven) Spach. (Cáucaso y noreste de Turquía); 7. *A. bornmuelleriana* Mattf. (Montes Pónticos, Turquía); 8. *A. equi-trojani* Boiss. (noroeste de Turquía); 9. *A. cephalonica* J.W. Loudon (Grecia); 10. *A. × borisii-regis* Mattf. (Península Balcánica); 11. *A. nebrodensis* (Loyac.) Mattei (Sicilia); y 12. *A. alba* Miller (sur de Europa).

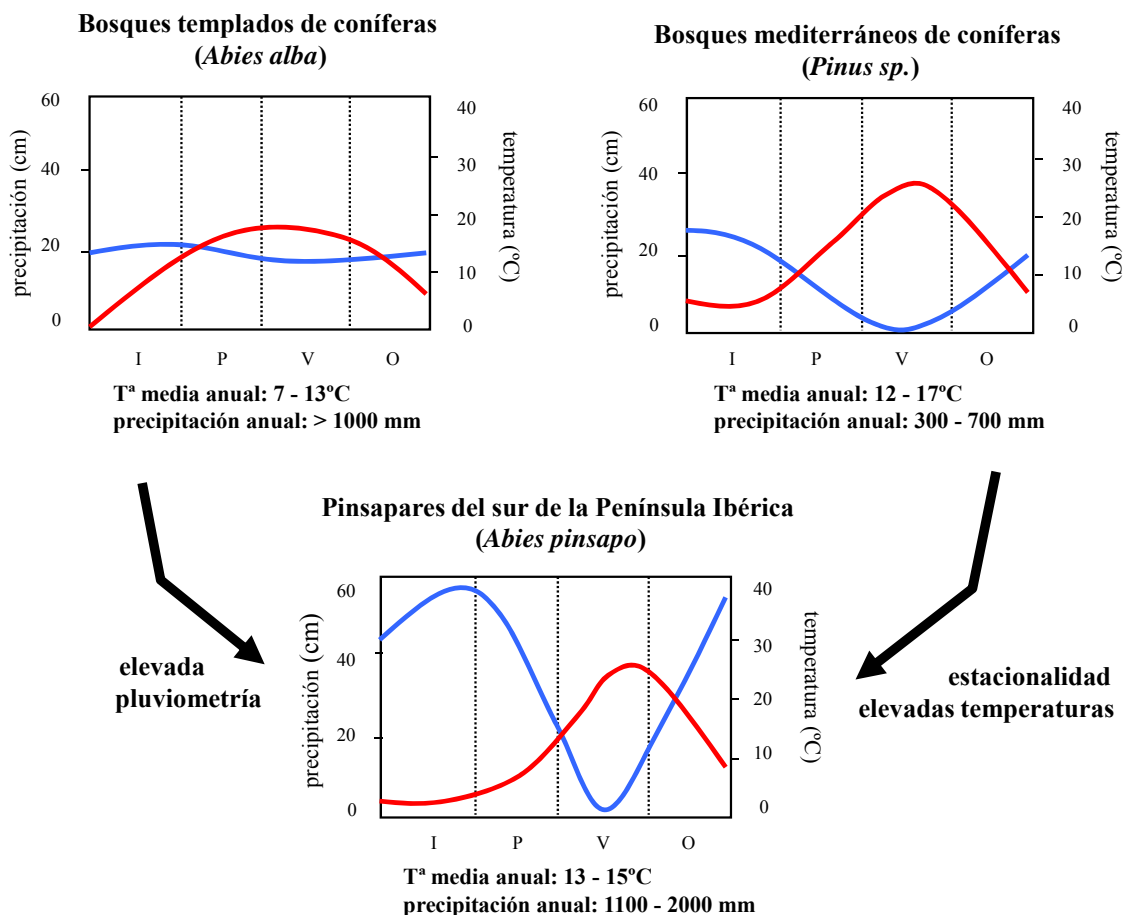
Los bosques que forma, los “pinsapares”, están por lo general constituidos por poblaciones pequeñas y de escasa extensión, y se distribuyen en laderas umbrías de orientación norte y fuerte pendiente, entre los 1000 y los 1800 m.s.n.m. Aunque dependen considerablemente de elevadas precipitaciones de origen orográfico, acusan una notable sequía estival, asociada al clima mediterráneo, año tras año. Estos pinsapares constituyen relictos de bosques templados que en la actualidad se encuentran plenamente inmersos en un clima típicamente mediterráneo, sometidos a las constricciones climáticas y ecológicas impuestas por éste, y se han mantenido en su actual localización los últimos 10000 años, al menos. Por ello, cabe pensar que presiones selectivas inherentes al propio proceso

evolutivo han debido promover en el pinsapo, y en otras especies en similares circunstancias, caracteres xero-heliófilos que les hayan permitido desenvolverse en estas condiciones, marcando así de forma indeleble las diferencias existentes entre estas especies y el resto de las que se distribuyen alrededor de la cuenca mediterránea.

Los pinsapares del suroeste de la península Ibérica son considerados bosques de tipo mixto, con características estructurales y funcionales a medio camino entre los bosques templados y los bosques típicamente mediterráneos (**Figura I.4**). Por lo general, se trata de bosques puros o claramente dominados por individuos adultos de la especie, cuya fisonomía recuerda a los bosques templados y boreales (por ejemplo, los que *Abies alba* forma en el este y centro de Europa) (**Figuras I.5 y I.6**); y su funcionamiento presenta propiedades generales típicas de bosques templados. Así, la producción de hojarasca y raíces finas, la disponibilidad de nutrientes, o la mineralización, presentan promedios anuales dentro del rango propio de bosques templados, y la propia producción primaria se encuentra típicamente, además, limitada por nitrógeno (Liétor, 2002; Linares y Carreira, 2006). No obstante, en la dinámica estacional de las variables antes mencionadas se ha encontrado una mayor variabilidad que en abetales típicos, y su patrón temporal es típicamente mediterráneo, con dos periodos de reposo y dos favorables. Esta estacionalidad mediterránea en un bosque templado de coníferas provoca desacoples temporales entre los procesos de suministro y retención biótica de nutrientes, y hace de estos bosques sistemas anormalmente abiertos (Liétor, 2002; Linares y Carreira, 2006). Por todo lo anterior, el pinsapar no se considera un bosque templado puro, pero tampoco el típico bosque de coníferas mediterráneo, resultando inadecuado extrapolar lo que se conoce sobre ambos tipos de bosques hacia el funcionamiento de los pinsapares.

#### *1.4.2. Antecedentes en el estudio de los pinsapares.*

A pesar del interés que ofrecen el pinsapo y los pinsapares *per se* (su indudable valor biogeográfico y paisajístico, el carácter endémico de la especie dominante, la riqueza específica de su composición florística, etc.) (Linares, 2004), las investigaciones en torno a esta especie siguen siendo escasas, y no cubren algunos de sus aspectos más interesantes.

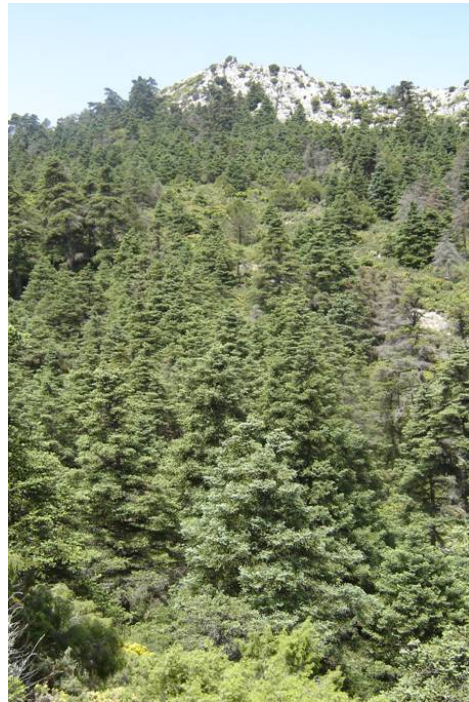


**Figura I.4.** Valores característicos de precipitación y temperatura en distintos tipos de bosques. El pinsapar como ecosistema forestal presenta características mixtas entre los bosques típicamente templados y los bosques de coníferas mediterráneos, sometidos a una fuerte estacionalidad en el patrón climático.

Los primeros estudios que abordaron esta especie trataron de conocer aspectos relacionados con su biología y se centraron en el pinsapar de la Sierra del Pinar (Cádiz): la biología del pinsapo (Arista 1993a), su fenología y la anatomía de su fase reproductiva (Arista y Talavera, 1994), el porcentaje de germinación y la viabilidad de sus semillas (Arista, 1993b), la supervivencia de plántulas (Arista, 1994), la expresión genética en el pinsapo (Arista y Talavera, 1997), etc. Otros estudios han sido de carácter silvícola (Catalina, 1994; Cobos, 1994; Hita, 1997) o se han enfocado de una forma muy general, por ejemplo, la relación de la flora que integra los pinsapares de Ronda (Pérez Latorre *et al.* 1998), o la descripción de los pinsapares andaluces de Ruiz de la Torre (1994). Algunos otros han tratado temas mucho más específicos como el estudio de la nutrición mineral del pinsapo a través de la composición en macronutrientes en suelo y acículas (Paneque y Corral, 1982), la descripción de las razas y variedades de la especie (Soto, 1998), o la estructura y relaciones alométricas en pinsapares (Liétor y Carreira, 2001).



**Figura I.5.** Ejemplar típico de adulto aislado, con porte cónico.



**Figura I.6.** Los pinsapares se asemejan a los bosques templados de coníferas.

Otras investigaciones han tocado aspectos biogeoquímicos del funcionamiento del pinsapar, abordando las relaciones suelo-planta y el estatus nutricional de los pinsapares (Carreira *et al.* 2003) o los patrones de disponibilidad y limitación por nutrientes que los rigen desde un punto de vista funcional (Liétor, 2002). En concreto, Liétor (2002) hizo una descripción de los perfiles de los tipos de suelos más abundantes en el pinsapar, caracterizó la estructura del dosel forestal y determinó la fase sucesional en la que se encuentran, describió las tasas de descomposición de la hojarasca en el suelo y los patrones tanto espaciales como temporales de disponibilidad de nutrientes (fundamentalmente, nitrógeno y fósforo) en el suelo y, en definitiva, trazó un esbozo del flujo de energía y de los ciclos de los principales nutrientes en estos sistemas.

Con posterioridad, se han intentado cubrir algunos aspectos que estaban relacionados, más que con la descripción general del funcionamiento del sistema, con la relación entre éste y los procesos de deposición crónica de nitrógeno. Así, ya Liétor (2002) puso de manifiesto algunos indicios de saturación por nitrógeno, y fue Salido (2003, 2007) quien los confirmó, evaluando tanto las entradas de nitrógeno al sistema en forma de precipitación ácida como las salidas del mismo (escorrentía y lixiviados), y quien puso de manifiesto la relación entre el gradiente geográfico de deposición y el incipiente proceso de saturación.

Por último, Linares (2008) se aproximó al pinsapar por medio de estudios de demografía y de la caracterización de los patrones espaciales de mortalidad, analizando la evolución histórica de la superficie ocupada por el pinsapar en Yunquera (Málaga), su dinámica y la caracterización ecofisiológica de sus individuos, para correlacionar esta información con el régimen termo-pluviométrico registrado durante décadas y los procesos de cambio global que se producen en la actualidad. Por su parte, Blanes (2010) propuso alternativas de manejo de síntomas de saturación de nitrógeno en pinsapares mediante fertilización compensatoria con fósforo, y contribuyó a explicar la elevada susceptibilidad de estos ecosistemas frente a la deposición crónica de nitrógeno.

#### *1.4.3. El pinsapo como modelo experimental.*

Los pinsapares del suroeste de la Península Ibérica constituyen un modelo experimental idóneo para comprobar algunos de los procesos y teorías ecológicas más controvertidos e importantes de los últimos años.

Por un lado, es de destacar que la Teoría Biogeoquímica General ha sido básicamente desarrollada a partir de investigaciones realizadas en bosques templados del norte de Europa y América. Los pinsapares, aunque aparentemente similares a los bosques de latitudes templadas en su fisonomía, se encuentran modulados en algunas de sus facetas biogeoquímicas por la estacionalidad mediterránea de su área de distribución (Liétor 2002). En concreto, es probable que, por las peculiaridades de los pinsapares, en éstos se hayan verificado cambios en los patrones de circulación biogeoquímica de nutrientes (Salido, 2003). Es por ello que, en general, el estudio de los flujos de energía y nutrientes en los pinsapares podría contribuir de forma significativa a probar la consistencia de la Teoría Biogeoquímica actual.

Por otro lado, se ha comprobado que las masas de pinsapar se encuentran a lo largo de un gradiente geográfico de contaminación atmosférica (Salido, 2003), como consecuencia de la proximidad de un foco contaminador de la magnitud del Campo de Gibraltar y la dirección predominante de los vientos en la zona. Además, las sierras costeras sobre las que se distribuyen estas masas boscosas constituyen una de las primeras barreras físicas para los frentes húmedos procedentes del Atlántico, que descargan la mayor parte del agua sobre los pinsapares, explicando este hecho la alta precipitación anual de la zona y las condiciones microclimáticas que permiten la localización de esta especie en una latitud tan meridional.

La concurrencia de ambas circunstancias explica el proceso de deposición crónica de nitrógeno a que están sometidos estos bosques, y dado que el síndrome de saturación por nitrógeno se ha descrito formalmente como el conjunto de mecanismos de respuesta de los ecosistemas forestales a esas entradas crónicas (Aber *et al.* 1989), es de esperar que en el futuro se verifique una aceleración de los procesos de saturación en estas masas boscosas. Además, este proceso de saturación por nitrógeno fue descrito a partir de investigaciones realizadas nuevamente en bosques templados, y los principales proyectos dedicados a la investigación actual en este campo se llevan a cabo en bosques templados, por lo que el hecho de estudiar la dinámica de este proceso en el pinsapar puede contribuir no sólo a testar la consistencia de la descripción que se ha hecho del síndrome, sino a conocer la respuesta que ante el mismo cabe esperar en bosques distintos a los típicamente templados.

Finalmente, y recordando que estos bosques están sometidos a un clima mediterráneo típico, los pinsapares podrían constituir un modelo experimental idóneo para conocer cuál será la respuesta de los bosques templados a medida que avancen los procesos del cambio climático global. Así, es posible que los anteriormente mencionados cambios en los patrones de circulación biogeoquímica de nutrientes sean similares, al menos cualitativamente, a la respuesta que cabe esperar en bosques templados de coníferas bajo condiciones acentuadas de incremento de temperatura y estrés hídrico.

#### *1.4.4. La caracterización ecofisiológica del pinsapo. Hipótesis de partida.*

La ecofisiología es una ciencia experimental que estudia las especies vegetales a la luz de la influencia que los factores abióticos y bióticos ejercen sobre ellas (Lambers *et al.* 1998; Pearcy *et al.* 1989). Así, su objetivo es tratar de describir los mecanismos fisiológicos que subyacen a los procesos ecológicos que observamos, y comprender el papel que éstos desempeñan en la vida y el desenvolvimiento de las poblaciones y las especies vegetales en sus hábitats (Larcher, 1995). Los ecofisiólogos, por tanto, tratan de conocer los factores ecológicos que controlan el crecimiento, la reproducción, la supervivencia, y la abundancia y la distribución geográfica de las especies vegetales, en tanto que todos estos procesos se ven afectados por las interacciones que estas especies establecen con su ambiente físico, químico y biótico. Estos patrones y mecanismos ecofisiológicos pueden ayudarnos a comprender la importancia funcional de ciertos rasgos presentes en las

especies vegetales, así como su significado desde un punto de vista evolutivo (Lambers *et al.* 1998).

Con objeto de abordar la caracterización ecofisiológica del pinsapar, se han llevado a cabo recientemente trabajos de investigación que han tratado de elucidar el papel que juegan dos factores ecológicos clave en este ecosistema, -el agua y la luz-, en el comportamiento ecofisiológico del pinsapo, mediante estudios de campo en poblaciones naturales (Linares, 2008). Salvo esta excepción, la caracterización ecofisiológica del pinsapo no se ha abordado en profundidad aún, pero sería de gran interés para completar el panorama de conocimientos que se tiene sobre esta especie. Esta aproximación podría contribuir decisivamente a explicar la presencia y persistencia de poblaciones de pinsapo y de otras especies de abetos circunmediterráneos en sus actuales emplazamientos, independientemente de los procesos ecológicos y evolutivos que los “llevaron” allí.

Así, más allá de los cambios climáticos y paleoecológicos que tuvieron lugar en el pasado, y que se postulan como determinantes a la hora de explicar la presencia y distribución de todas las especies de abetos circunmediterráneos, únicamente la ecofisiología puede ayudarnos a conocer qué estrategias han seguido o cuáles han sido los rasgos que la evolución, a lo largo de miles de años, ha ido seleccionando para estas especies; conocer, en definitiva, cómo éstas, en la mayor parte de los casos, resisten con poblaciones pequeñas, acantonadas, aisladas geográfica y demográficamente, mientras la historia ecológica y evolutiva de la cuenca mediterránea sigue su curso. En otras palabras, el estudio de la ecofisiología de la especie permitiría comprender cómo estas especies, *a priori* “templadas”, pueden vivir en un clima típicamente mediterráneo, con las severas constricciones ecológicas impuestas por éste: dado que sus poblaciones experimentaron en el pasado un evento de cambio climático de magnitud considerable – la progresiva aridificación de la cuenca mediterránea a lo largo de un gradiente de dirección sureste-noroeste, y la instalación en esta región del régimen de temperaturas y precipitaciones típicamente mediterráneo (Suc, 1984) –, cabe pensar que parte de las adaptaciones o rasgos seleccionados en éstas han de estar directamente relacionados con ese cambio en las condiciones ambientales que tuvo lugar en el pasado. Considerando lo anteriormente expuesto, es inmediato asumir que las poblaciones de *Abies pinsapo*, como especie endémica y relictas, se encuentran casi con toda probabilidad en el límite latitudinal y altitudinal de su rango de tolerancia ecofisiológica, y que son por tanto especialmente sensibles incluso a pequeñas variaciones de las condiciones ambientales. Esto hace pensar

que se trata de ecosistemas especialmente vulnerables, en los que se manifestarán con prontitud los efectos del cambio climático (Génova-Fuster, 2007).

Abordar el estudio de la ecofisiología de la especie ayudaría a saber si el proceso de especiación de estos abetos tuvo lugar a la escala temporal y geográfica que se asume (Scaltsoyiannes *et al.* 1999), y si la fuerza motriz que en parte dirigió este proceso fue la selección de los rasgos adaptativos que presentan las especies típicamente mediterráneas, y que en general tienen por objeto capacitar a los individuos para enfrentarse a un ambiente heterogéneo, espacial y temporalmente, respecto a dos factores ecológicos clave: la luz incidente y la cantidad de agua disponible en el sustrato (Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000, Valladares *et al.* 2004a, 2004b).

Por otro lado, estudiar las consecuencias que estos cambios han tenido en las poblaciones mencionadas, y conocer la forma en que éstas han respondido, en términos de cuáles han sido las estrategias seleccionadas o qué rasgos se han ido potenciando, no sólo puede proporcionarnos información útil a la hora de prever cuál podría ser la respuesta de la especie ante nuevos escenarios (Hampe y Petit, 2005; Thompson, 2005; Svenning y Skov, 2005): el pinsapo, en definitiva, constituye un modelo experimental para predecir los efectos del cambio climático sobre bosques templados propiamente dichos, por lo que el estudio de su ecofisiología no sólo completaría decisivamente el conocimiento de esta especie y de su historia evolutiva, sino que podría constituir, en el marco de la investigación ecológica relativa al cambio global, una herramienta para predecir el futuro que cabe esperar, a medio-largo plazo, para los bosques típicamente templados en un escenario de calentamiento y cambio global, junto con las investigaciones relativas a flujos de energía y nutrientes mencionados con anterioridad, al sugerir la capacidad de respuesta que es posible encontrar en especies forestales ante eventos de cambio climático, y los efectos potenciales del cambio global sobre los bosques templados.

#### 1.4.5. El interés de la comparación con Abies alba.

*Abies alba* Mill. es la otra especie de abeto circunmediterráneo que se encuentra presente en la Península Ibérica de forma natural (López y Amaral, 1986). Se trata de la especie de abeto más ampliamente extendida en Europa (**Figuras I.3 y I.4**), presente en un amplio rango de condiciones ecológicas (Konnert y Bergmann, 1995). Forma extensos bosques en numerosos sistemas montañosos europeos, desde los Cárpatos orientales hasta los Pirineos, y desde los Beskides en Polonia hasta las montañas del norte de Grecia, siempre

con preferencia por la banda altitudinal inferior de estas cordilleras, donde encuentra unas condiciones climáticas frescas, con escasa amplitud térmica y una precipitación anual relativamente alta (Robakowski *et al.* 2004). Aunque en ocasiones forma bosques monoespecíficos, a menudo forma parte de ricos bosques mixtos junto a *Picea abies* Karst., *Fagus sylvatica* L., *Acer pseudoplatanus* L. y otras especies forestales (Robakowski *et al.* 2004).

Tanto *Abies alba* como *Abies pinsapo* son especies integrantes del grupo de vegetación “neo-mediterránea”, cuyo origen tuvo lugar en los procesos de inmigración y especiación que acontecieron tras el establecimiento en la región de lo que hoy denominamos “clima mediterráneo” (Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000). Así, se ha postulado que ambas especies proceden además de un ancestro común de distribución amplia (Meyen, 1987; Palamarev, 1989, Scaltsoyiannes *et al.* 1999), que encontró refugio en las cordilleras montañosas que circundan la cuenca mediterránea (Bennett *et al.* 1991; Tzedakis *et al.* 2002; Willis y Niklas, 2004), al igual que otras muchas especies forestales euroasiáticas y holárticas habrían sobrevivido durante las distintas glaciaciones gracias al hallazgo de refugios mediterráneos, desde donde recolonizaron el continente cuando las temperaturas volvieron a subir, hace aproximadamente 15000-10000 años (Huntley y Birkes, 1989). En el caso que nos ocupa, a partir del antecesor común de distribución amplia, sucesivas migraciones y fragmentaciones en núcleos cada vez más pequeños y aislados favorecerían la diversificación y zonación de estos abetos ancestrales (Farjon y Rushforth 1989).

Respecto a *Abies alba*, se han identificado cinco refugios “mediterráneos” (localizaciones concretas con condiciones microambientales favorables, ver e.g. Bennett *et al.* (1991), Willis (1996) o Willis y Whittaker (2000)): Pirineos, en España; la región de Calabria, en el sur de Italia; la región central de Italia; la región centro-este de Francia; y la región del sur y el sureste de la península de Los Balcanes (Konnert y Bergmann, 1995). A partir de los tres últimos mencionados, se inició la expansión de la especie hasta su actual distribución, por España, Francia, Alemania, Suiza, Italia, Austria, República Checa, Polonia, Eslovaquia, Hungría, Ucrania, Rumanía, Bulgaria, Turquía, Grecia, Macedonia, Albania, Serbia, Montenegro, Bosnia, Croacia y Eslovenia (Konnert y Bergmann, 1995; IUCN, 2011). En todo caso, cualquiera de estas localizaciones presenta un carácter más templado que aquéllas en las que aparece *A pinsapo*, con una fuerte estacionalidad de tipo “mediterráneo”.

El límite sudoeste de su distribución se encuentra en los Pirineos y en cadenas montañosas próximas, al sur de éstos (Jalas *et al.* 1999), donde la especie se encuentra frecuentemente por encima de los 1200 m.s.n.m, en zonas de gran productividad como fondos de valle, o en laderas con orientación N-NW sobre suelos relativamente profundos (Vigo y Ninot, 1987). En los Pirineos, dentro de lo que se considera el área de distribución principal de la especie, bajo condiciones méxicas, *Abies alba* forma bosques subalpinos en transición hacia bosques monoespecíficos de especies de hoja caduca, en suelos desarrollados sobre esquistos y otras rocas silíceas (Conesa i Mor, 1997). En las localizaciones más occidentales, forma bosques nemorales mixtos con *Fagus sylvatica* L. (Blanco *et al.* 1997; Vigo y Ninot, 1987). El límite ecológico de la especie lo constituyen los abetales que se encuentran en la cara sur de Pirineos y en Pre-Pirineos (Peguero-Pina *et al.* 2007), donde aparece junto a *Pinus sylvestris* y *Buxus sempervirens* en sustratos calcáreos y bajo condiciones más xéricas (Conesa i Mor, 1997).

En lo que respecta a la ecofisiología y autoecología de la especie, *Abies alba* es una de las especies forestales europeas más tolerantes a la sombra que se conocen (Robakowski *et al.* 2003): es capaz de regenerarse de forma natural incluso bajo dosel cerrado, donde la irradiancia puede ser entre un 80 y un 95% inferior a los niveles ambientales registrados sobre el dosel, y sus individuos son capaces de persistir en esas condiciones entre 10 y 20 años (Robakowski *et al.* 2004). Por otro lado, y al igual que el pinsapo, esta especie se distribuye en zonas que pueden sufrir una severa sequía estival, pero que reciben abundantes precipitaciones durante el otoño y la primavera (Aussenac, 2002). Ello se debe a que ambas especies presentan un elevado consumo de recursos hídricos, por lo que tienden a localizarse principalmente en bioclimas húmedos e incluso muy húmedos, caracterizados por una precipitación anual de 1000 mm o superior (Aussenac, 2002). Además, y al igual que el resto de especies de abetos circunmediterráneos, salvo *A. numidica*, ocupan zonas geográficas con rangos de temperatura anual relativamente amplios, en comparación con los de otras especies forestales (Aussenac, 2002). En el caso de *Abies alba*, esto explica que el cálculo del índice de aridez (De Martonne, 1926) para el rango de distribución natural de la especie, a partir de datos climáticos recopilados por distintos autores, presenten una notable variación entre distintas localizaciones (Aussenac, 2002), lo que significa que, en su amplísimo ámbito natural de distribución, la especie encuentra muy distintas combinaciones de temperatura promedio y precipitación total anual. Esto, unido al hecho de que sus poblaciones alberguen una variabilidad genética mayor que la de otras especies

forestales europeas (Konnert y Bergmann, 1995; Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000) sugiere que, en la configuración de la especie, han debido promoverse rasgos que le confieran un carácter más moderado, “templado” en el sentido más literal de la expresión, capaz de hacer frente a una variación amplia de las condiciones ambientales. De hecho, el grupo de abetos del que *A. alba* forma parte, distribuido por la zona norte y nor-occidental de la cuenca mediterránea, donde la aridificación del clima progresó más lentamente y alcanzó menor intensidad, se caracteriza por presentar adaptaciones encaminadas hacia una mayor eficiencia en la captación de luz, en la capacidad de regeneración, e incluso en una mayor plasticidad en el crecimiento (Aussenac, 2002; Linares y Carreira, 2006.).

Sin embargo, la exigua distribución del pinsapo y lo puntual de sus localizaciones justifican que el cálculo del índice de aridez arroje un rango de variación mucho menor que en el caso de *A. alba*, indicando que la especie no se encuentra sometida en su actual distribución a un gradiente notable en las condiciones de temperatura y disponibilidad hídrica, al menos a grandes escalas temporales. Esto, unido al hecho de que sus poblaciones se encuentren plenamente inmersas en el típico clima mediterráneo, sugiere que en el desarrollo de la especie debió jugar un papel fundamental la tendencia al descenso de la precipitación estival que culminó en el patrón estacional mediterráneo, a finales del Terciario (Suc, 1984), en el sentido de que ha debido orientar inevitablemente la configuración de la especie hacia una cierta especialización, con valor adaptativo, a estas condiciones ambientales. De hecho, las presiones selectivas que operaron sobre el grupo de *A. pinsapo*, aislado de forma temprana, derivaron en estrategias adaptativas de cara a la persistencia, que son características ecofisiológicas comunes a las tres especies actuales del grupo: longevidad, crecimiento primario lento y de tipo preformado, frugalidad e indiferencia edáfica, corto periodo de crecimiento pero largos ciclos internos, y resistencia al frío y a la sequía (Linares y Carreira, 2006). Esta última característica parece indicar que los mencionados procesos de especiación han debido seleccionar y potenciar rasgos de tipo xeroheliófilo que confieran a estas especies un carácter más “mediterráneo”, dotándolas así de una mayor capacidad para afrontar las estresantes condiciones ambientales que caracterizan la época estival en el ámbito en el que se distribuyen.

Por todo lo anterior, nuestra hipótesis de partida, a la hora de comparar desde una perspectiva ecofisiológica estas dos especies, plantea que ambas van a mostrar comportamientos distintos cuando la disponibilidad hídrica o luminosa difiera de las condiciones óptimas para el desarrollo de una especie de abeto. Así, si consideramos las

condiciones, por lo general más cálidas, en las que se encuentran las poblaciones de *A. alba*, más propias de especies “templadas”, y las condiciones en que se hallan las poblaciones de pinsapo (similares a las que soportan las especies “típicamente mediterráneas”, especialmente estresantes durante la época estival), la comparación entre ambas especies en términos de su capacidad para aclimatarse a distintas condiciones de luminosidad y disponibilidad hídrica, permitirá testar la hipótesis que sostiene que la especialización en ambientes favorables (como aparentemente presenta *A. alba* en su conjunto) incrementa la plasticidad, mientras que la especialización en ambientes menos favorables (como los que *a priori* encuentra *A. pinsapo* en su rango de distribución) disminuiría esta plasticidad (Lortie y Aarssen, 1996). Así, de *A. alba*, presente por lo general en condiciones más idóneas, cabría esperar un comportamiento más plástico, lo que además iría en línea con hallazgos previos que sugieren que la plasticidad fenotípica está positivamente relacionada con una distribución ecológica más amplia (Valladares *et al.* 2000), como la que presenta esta especie. En comparación, de *A. pinsapo*, presente únicamente en un estrecho rango de distribución, y sometido *a priori* a condiciones menos favorables, cabría esperar un comportamiento menos plástico y una estrategia vital más conservadora. Así, algunos estudios han mostrado que encinas y coscojas, especies típicamente mediterráneas, son poco plásticas ante cambios en la luz, como parte de una estrategia general muy conservadora que les permite sobrevivir a múltiples condiciones adversas como sequía y temperaturas extremas (Valladares *et al.* 2000, Balaguer *et al.* 2001, Valladares *et al.* 2002). En nuestro caso, se trataría de ver si el pinsapo muestra para la luz y la humedad del sustrato una estrategia más conservadora que *A. alba*, como parte de una respuesta adaptativa a condiciones ambientales por lo general más adversas, o si, por el contrario, es esta última la especie que peor se adapta a los cambios que se produzcan en estos recursos, “acostumbrada” a un ambiente cuyas condiciones son por lo general más estables.

### **I.5. Estructura y contenido de la tesis.**

El contenido de este trabajo de investigación se estructura en dos bloques bien diferenciados. En el primero de ellos, que comprende los **Capítulos 3, 4 y 5**, se exponen distintos experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas, y que han tenido por objeto comparar dos especies filogenéticamente emparentadas, *Abies pinsapo* y *A. alba*, en términos de su comportamiento ecofisiológico y siempre en el contexto de las posibles presiones selectivas diferenciales sufridas por el primero, dada su localización en un

ambiente típicamente mediterráneo. Estos experimentos, en los cuales se han investigado las posibles diferencias entre estas especies a distintos niveles (tasas de intercambio gaseoso, curvas fotosíntesis – irradiancia, capacidad de fijación de carbono, eficiencia en el uso del agua y de la luz, discriminación de isótopos de carbono, equipo pigmentario, potencial hídrico, reserva de carbohidratos no estructurales y patrones de asignación de recursos), han abordado tres cuestiones esenciales: *i*, la capacidad de aclimatación a distintos niveles de irradiancia; *ii*, la respuesta frente al estrés hídrico severo y el *trade-off* asociado al par de recursos agua-luz; y *iii*, y la capacidad de fijación de C y el grado de control de la apertura estomática.

Así, con la información recabada en estos experimentos se pretende, por un lado, contribuir de forma significativa a la elaboración del perfil ecofisiológico de la especie, iniciado por trabajos de investigación recientes, además de poder situar la especie en el ámbito evolutivo y ecológico descrito en esta **Introducción**, y en relación con otras especies de coníferas, tanto pertenecientes a bosques templados como a comunidades típicamente mediterráneas. Por otro lado, se trata de elucidar si existen diferencias entre ambas especies, en términos de su capacidad de respuesta al estrés y patrones de compensación de factores, y si estas diferencias pueden relacionarse directamente con la historia evolutiva de ambas especies.

El segundo bloque, constituido por el **Capítulo 6**, comprende el trabajo de campo realizado, enfocado a conocer, mediante una aproximación espacialmente explícita, el comportamiento de individuos juveniles de *A. pinsapo* localizados en distintos microambientes del ecosistema forestal del pinsapar, al objeto de conocer qué rasgos o estrategias les permiten sobrevivir al rigor del ambiente mediterráneo, cuáles son las mejores condiciones microclimáticas para los individuos que se encuentran en este estadio vital tan vulnerable, y si las conclusiones derivadas de este trabajo son consistentes con los patrones de regeneración natural encontrados en el pinsapar.

## **I.6. Objetivos generales.**

El objetivo general de este trabajo de investigación es abordar el estudio del pinsapo desde una perspectiva ecofisiológica, concediendo gran importancia a variables fisiológicas clásicas (como las tasas de fijación de carbono o las de conductancia estomática, entre otros), sin olvidar en ningún momento las cuestiones ecológicas que subyacen a las cuestiones antes planteadas. Con esta idea de partida, por un lado se han diseñado y

llevado a cabo experimentos bajo condiciones controladas, en los que esta especie de abeto se ha comparado con otra de carácter *a priori* más “templado”, *A. alba*, que puede presentar diferencias en lo que respecta a su comportamiento ecofisiológico; y por otro lado, se ha realizado el seguimiento de individuos juveniles de *A. pinsapo* en campo, todo ello para alcanzar los siguientes objetivos específicos:

i) debido a la latitud (36°) y a la altitud (habitualmente entre los 1000 y los 1500 m.s.n.m.) a la que se encuentran los pinsapares, es de esperar que los individuos adultos de esta especie se encuentren sometidos a niveles de irradiancia altos de forma prolongada. Sin embargo, el grado de tolerancia a la sombra y la capacidad de aprovechar los rayos de luz que se filtren a través del dosel forestal pueden ser decisivos para sus plántulas a la hora de sobrevivir y tener éxito en el interior umbroso de los pinsapares. Así, dada la variabilidad de condiciones lumínicas que los individuos de esta especie pueden encontrarse a lo largo de su ciclo de vida, el primer objetivo de este trabajo ha sido estudiar en qué medida puede producirse la aclimatación de individuos juveniles de la especie a distintos niveles de irradiancia y las consecuencias de dicha aclimatación en los mecanismos de fijación de carbono y crecimiento de los individuos juveniles tanto de *A. pinsapo* como de *A. alba*;

ii) además, en *A. pinsapo*, que se localiza en zonas sometidas a un clima mediterráneo con una estacionalidad acusada y una notable sequía estival, cabe esperar una notable eficiencia en el uso del agua. Se trata, en este caso, de determinar la capacidad de respuesta de la especie ante un episodio provocado de estrés hídrico severo, y comparar la misma con la exhibida en idénticas circunstancias por individuos de *A. alba*;

iii) del mismo modo, y dado que en condiciones naturales, los individuos de *A. pinsapo* se encuentran sometidos a un amplio rango de combinaciones de irradiancia y humedad del sustrato, otro de nuestros objetivos ha consistido en determinar la importancia del *trade off* que se establece entre estos dos recursos clave para la especie, y la diferencia a este respecto en lo que concierne a una especie de abeto localizada en condiciones ambientales más méxicas como es *A. alba*;

iv) por otro lado, para conocer en qué medida los individuos que no reciben radiación solar directa son capaces de aprovechar la radiación difusa o los rayos de sol que de forma ocasional atraviesan el dosel, o la respuesta de este tipo de individuos cuando se abre un claro en el bosque, es necesario evaluar en qué medida se relaciona la tasa de fijación de carbono con la dosis de radiación recibida. Así, otro objetivo ha consistido en determinar en qué medida la capacidad de fijar C depende de la disponibilidad lumínica,

en términos tanto de la eficiencia en el uso de la luz como de la velocidad exhibida en esta respuesta, y cómo esta capacidad está modulada por el ambiente lumínico en que se desarrollan los individuos, comparando de nuevo *A. pinsapo* y *A. alba*;

v) finalmente, al objeto de conocer la influencia de la heterogeneidad ambiental a pequeña escala asociada a huecos del dosel del pinsapar sobre los procesos de regeneración natural de la especie, otro objetivo ha consistido en determinar en qué medida la distribución espacial de los individuos juveniles de *A. pinsapo* localizados en distintos microambientes, así como su comportamiento ecofisiológico, vienen determinados por el patrón espacial y estacional de disponibilidad hídrica y luminosa y la presencia de otras especies.





## **II. Material y Métodos. Generalidades**

---



## II. Material y Métodos. Generalidades.

*En este capítulo se describen de forma general los materiales y métodos empleados tanto en los experimentos de laboratorio bajo condiciones controladas que constituyen el primer bloque de este Trabajo de Tesis (Capítulos 3, 4 y 5) como en el trabajo de campo descrito en el segundo bloque del mismo (Capítulo 6). Así, en lo que respecta al primer bloque, se comenta el material experimental empleado en estos experimentos, y se especifican las distintas variables medidas en cada caso, la forma en que se midieron estas variables y los equipamientos y dispositivos necesarios para ello. En lo que respecta al segundo bloque, en este capítulo únicamente se detalla el procedimiento seguido para el registro de las variables bióticas y abióticas monitorizadas en el mismo. El diseño experimental seguido en cada caso y el tratamiento estadístico de los distintos tipos de datos obtenidos se abordan con la profundidad necesaria en los capítulos correspondientes.*

### II.1. Material experimental.

Para los experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas se emplearon individuos juveniles de 5-6 años de edad, de *Abies pinsapo* y de *Abies alba*, procedentes de vivero. A pesar de las posibles diferencias genotípicas que son de esperar *a priori* entre los individuos empleados, estos fueron seleccionados a partir de las mismas poblaciones, lo que asegura, en la medida de lo posible, la homogeneidad de condiciones iniciales en los experimentos, aportando consistencia a las posibles conclusiones que pudieran derivarse de los mismos en los que respecta a la capacidad de aclimatación y plasticidad fenotípica de las especies objeto de estudio.

Los individuos de *A. pinsapo* fueron suministrados gratuitamente por la Red de Viveros de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (vivero: La Resinera, Arenas del Rey, Granada; procedencia de las semillas: Sierra de las Nieves, Málaga; fecha de siembra: marzo de 2000; fecha de retirada del vivero: primavera de 2005). Una vez trasladados al Jardín Experimental de la Universidad de Jaén, fueron transplantados desde su bolsa (**Figura II.1**) hasta contenedores de plástico de aproximadamente 5 L de volumen, utilizando para ello una mezcla de suelo forestal secado al aire y tamizado a 4 mm, mantillo y perlita, en una proporción 2:2:0.75 v:v:v.

Los individuos de *Abies alba*, mantenidos en contenedor con una mezcla de suelo forestal y mantillo, al 50% v:v aproximadamente, fueron adquiridos en septiembre de 2005 en los viveros “StarPlant” de Breda (Gerona). Esta segunda remesa fue también trasladada al Jardín Experimental, donde ambas fueron preincubadas durante al menos cinco meses hasta su empleo en los distintos experimentos (**Figura II.1**).

En estas instalaciones, los individuos fueron rotados en sus posiciones con cierta periodicidad, y se encontraron a la intemperie durante todo el año, salvo en verano, en que se dispuso de una malla de sombreo que redujo la irradiancia incidente en un 75% aproximadamente, para protegerlos del exceso de luz y calor (**Figura II.2**).



**Figura II.1.** Individuos típicos de *A. pinsapo* (a la izquierda) y de *A. alba* (a la derecha) empleados en los experimentos.

Además, fueron regados convenientemente para evitar que la humedad del sustrato experimentase variaciones estacionales notables. Este suministro de agua, mediante riego por aspersión, se efectuaba en dos dosis diarias, que variaron con la época del año: en verano, 45’ a primera hora de la mañana y 20’ a última hora de la tarde. El resto del año, y progresivamente, la dosis era reducida a 20-30’ a media mañana y 10’ a media tarde. De igual modo, en épocas especialmente lluviosas la frecuencia de riego fue inferior. En los días más fríos del año, los individuos no fueron regados, para evitar daños en las raíces por congelación.



**Figura II.2.** Vista parcial de las instalaciones del Jardín Experimental de la Universidad de Jaén, con los distintos grupos de individuos de *A. pinsapo* y de *A. alba*. La malla de sombreo aparece retirada, a la izquierda.

## II.2. Condiciones ambientales.

### II.2.1. Humedad del sustrato y pérdida de agua.

En los experimentos realizados en cámara de incubación se hizo un seguimiento exhaustivo de la humedad del sustrato de los contenedores en que se hallaban los individuos, empleando una sonda TDR de 12 cm de longitud, modelo TDR100 (Campbell Scientific, Inc.), conectada a un ordenador portátil, para determinar el contenido volumétrico de agua en el suelo.

En el caso del experimento del **Capítulo 4**, durante la primera parte del mismo (primeras diez semanas), estas medidas sirvieron para comprobar la idoneidad de la cantidad de riego suministrada bajo ambos tratamientos de irradiancia. En la segunda parte, este control permitió, por un lado, garantizar el estatus hídrico de los individuos control, y por el otro, conocer la evolución temporal de la disponibilidad hídrica en aquellos individuos sometidos al tratamiento de estrés hídrico. A este respecto hay que señalar que, en esta segunda parte del experimento, los individuos fueron además

pesados regularmente con una balanza electrónica, al objeto de conocer la cantidad de agua correspondiente a las pérdidas de humedad registradas en el sustrato.

Por otro lado, durante la realización de los experimentos descritos en los **Capítulos 3 y 5** de esta memoria, y a pesar de que la humedad del sustrato no fuese una variable de control, se realizó un seguimiento de la misma, empleando la misma sonda de humedad, al objeto de garantizar el adecuado estatus hídrico de los individuos sometidos a estos experimentos.

En lo que respecta al trabajo de campo descrito en el **Capítulo 6**, el contenido volumétrico en agua del suelo se midió empleando diferentes sensores: la sonda modelo TDR100 (Campbell Scientific, Inc.), ya citada; una sonda Theta Probe modelo ML2x acoplada a un *datalogger* HH2 (Delta-T Devices, Croydon, Reino Unido); y finalmente el sistema Hydrosense, compuesto por un sensor TDR de 12 cm, modelo CS620, acoplado a un *display* digital modelo CD620 (Campbell Scientific). Para poder emplear los datos obtenidos con cada una de estas sondas, se efectuó una comparación previa entre todas ellas.

### *II.2.2. Irradiancia incidente.*

El nivel de irradiancia PAR incidente durante las medidas de intercambio gaseoso llevadas a cabo en los experimentos de los **Capítulos 3, 4 y 5** de esta memoria, se registró a través del sensor externo del IRGA portátil empleado para la realización de estas medidas (**Sección II.3.6** de este capítulo). El cálculo de la eficiencia en el uso de la luz se llevó a cabo a partir de estos registros.

Durante la realización del trabajo de campo del **Capítulo 6**, se empleó el sensor de referencia de un medidor LAI, modelo EMS7 (S.W. & W.S. Burrage, Ashford, Kent, Reino Unido), para medir la irradiancia incidente en los distintos puntos de muestreo, y poder caracterizar así el ambiente lumínico de las distintas “parcelas” de estudio. No obstante, para la evaluación de la eficiencia en el uso de la luz se empleó, como en anteriores ocasiones, el nivel de irradiancia PAR registrado por el IRGA portátil empleado para las medidas de intercambio gaseosos llevadas a cabo y descrito más adelante.

### II.3. Variables respuesta.

#### II.3.1. Patrones de reparto de biomasa.

La determinación del patrón de reparto de la biomasa de distintos individuos se llevó a cabo al principio y al final del experimento recogido en el Capítulo 3. Para ello, en cada caso se seleccionaron individuos al azar, y su biomasa total fue separada en distintos compartimentos: raíces finas (diámetro inferior a 2 mm), raíces gruesas (resto de raíces), acículas, ramas y tronco. Las distintas muestras de cada compartimento fueron desecadas en estufa a 70 °C hasta peso constante, y pesadas para la obtención del peso seco de cada compartimento. La biomasa total se calculó como la suma de todos los compartimentos. Para la separación entre biomasa aérea y subterránea se tomó como referencia el punto en el que el diámetro de la raíz principal es máximo (RCD, del inglés *root collar diameter*). A partir del peso seco de cada compartimento, se calcularon, para cada uno de los individuos, las relaciones mostradas en la **Tabla II.1**.

**Tabla II.1.** Variables morfológicas y de reparto de biomasa consideradas.

Denominación	Descripción
LAB ( <i>leaf biomass to aboveground biomass ratio</i> )	Cociente entre el peso seco de hojas y el del total de la biomasa aérea.
LMR ( <i>leaves biomass to total biomass ratio</i> )	Cociente entre el peso seco de las hojas y la biomasa total.
A/R ( <i>aboveground biomass to root biomass ratio</i> )	Cociente entre el total de la biomasa aérea y el total de la biomasa subterránea.
R/S ( <i>root biomass to stem biomass ratio</i> )	Cociente entre el peso seco de raíces y el peso de los “tallos” (calculado como la diferencia entre los compartimentos “biomasa aérea” y “biomasa foliar”).
F/C ( <i>fine roots biomass to coarse roots biomass ratio</i> )	Cociente entre la biomasa correspondiente a raíces finas ( $\varnothing < 2$ mm) y la biomasa de raíces gruesas ( $\varnothing > 2$ mm).
RMR ( <i>roots biomass to total biomass ratio</i> )	Cociente entre el peso seco de raíces y la biomasa total.

Se obtuvo asimismo un índice para evaluar el grado de control apical del crecimiento llamado ADR (*apical dominance ratio*), calculado según Leaky y Longman (1986) como

$$\text{ADR} = \frac{\text{longitud del tramo apical}}{\text{longitud promedio de los tramos laterales}} \quad (1)$$

Por otro lado, a partir de la cantidad de biomasa hallada en los distintos compartimentos, se halló en cada caso el ratio  $NPT/PT$ , entre la biomasa de tejido foliar, con capacidad fotosintética ( $PT$ , *photosynthetic tissue*) y la biomasa del resto de compartimentos ( $NPT$ , *non-photosynthetic tissue*). Asimismo, a partir de los datos registrados, y empleando las **Ecuaciones 6 y 7 (Sección II.3.6.3)**, se calculó el valor del ratio SLA (*specific leaf area*) en todos los individuos participantes en el experimento.

### II.3.2. Contenido relativo en agua.

En el experimento de estrés hídrico descrito en el **Capítulo 4** de esta memoria se midió el contenido relativo en agua de las acículas ( $RWC$ , *relative water content*), de acuerdo con el procedimiento descrito por Gindaba *et al.* (2004), ligeramente modificado, en todos los individuos de cada combinación de tratamientos y especies. Se tomaron, cuidadosamente, de 5 a 7 acículas de 1 año de edad y se colocaron en pequeños viales de plástico, que se llevaron inmediatamente al laboratorio, donde fueron pesadas (peso fresco,  $FW$ ). Después, las muestras fueron hidratadas hasta su máxima turgencia, mediante la adición de agua destilada. A continuación, se eliminó la humedad superficial con papel absorbente, y fueron pesadas nuevamente para obtener el peso turgente ( $TW$ ). Por último, las muestras fueron desecadas en estufa a 70°C hasta peso constante, y nuevamente pesadas para obtener el peso seco ( $DW$ ).

El contenido relativo en agua de las acículas se calcula entonces como (Beadle *et al.* 1993):

$$\text{RWC (\%)} = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100 \quad (2)$$

### II.3.3. Contenido foliar y xilemático en carbohidratos no estructurales.

El contenido en carbohidratos no estructurales se determinó tanto en muestras del experimento descrito en el **Capítulo 4** de esta memoria como en muestras tomadas durante el trabajo de campo del **Capítulo 6**.

#### II.3.3.1. Toma y preparación de las muestras.

En primer lugar, y en un tiempo inferior a 6 horas tras su recolección, las muestras fueron sometidas a un choque térmico en un horno microondas tradicional, a una potencia de 600W durante 90". Este pre-tratamiento desnaturaliza las enzimas presentes en las muestras, evitando la degradación enzimática de carbohidratos que pudiera ocurrir entre el momento de recolección de las muestras y su secado en el laboratorio (Popp *et al.* 1996). Este secado se efectuó en una estufa a 75 °C hasta peso constante. Una vez secas, fueron reducidas a polvo muy fino mediante un molino de bolas, y conservadas a 4 °C en un recipiente hermético, sobre un lecho de gel de sílice, hasta su empleo en los análisis.

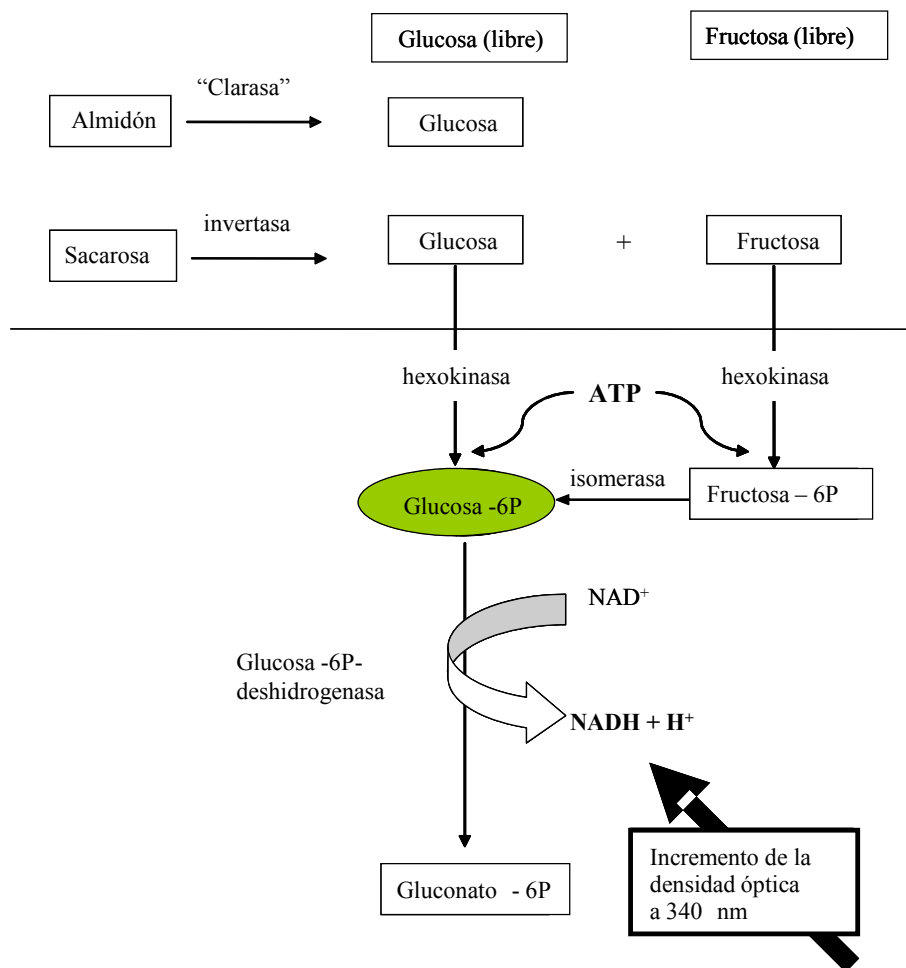
#### II.3.3.2. Análisis.

En esta memoria son considerados como "carbohidratos no estructurales" los azúcares libres, de bajo peso molecular (glucosa, fructosa y sacarosa), y el almidón. Fueron determinados mediante los protocolos descritos por Wong (1990) y Hoch *et al.* (2002) (**Figura II.3**).

En primer lugar, y a partir de una cantidad variable de muestra molida y seca (8-10 mg en el caso de acículas; 10-15 mg en el caso de xilema), se obtuvo un extracto al vapor, mediante agua destilada hirviendo durante 30 minutos. El almidón y la sacarosa fueron convertidos en glucosa, y en glucosa y fructosa, respectivamente, por incubación a 40° C durante 15 horas junto con una enzima cruda obtenida por diálisis ("Clarasa", de *Aspergillus oryzae*, Enzyme Solutions Pty Ltd, Crydon South, Victoria, Australia),

A continuación, la solución obtenida fue tratada con fosfoglucosa-isomerasa, y la cantidad total de glucosa (correspondiente al total de carbohidratos no estructurales presente en la muestra) fue determinada fotométricamente en un fotómetro para microplatos (HR 7000; Hamilton, Reno, NE, EE.UU.), una vez que esta glucosa fue

transformada a gluconato-6 fosfato mediante la adición de hexokinasa (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EEUU). Una alícuota del extracto original fue tratado con invertasa y fosfogluco-isomerasa (ambos de Sigma Diagnostics), al objeto de determinar la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa presente en las muestras, a través del test de glucosa descrito anteriormente. El almidón fue calculado como la diferencia entre el contenido total de carbohidratos no estructurales y el de azúcares libres. Soluciones puras de glucosa, sacarosa, fructosa y almidón fueron usadas como estándares, junto con material vegetal estándar (polvo seco de hojas de árboles frutales, de Leco, St. Joseph, MI, EE.UU), incluido para controlar la reproducibilidad de las extracciones. Las concentraciones de carbohidratos no estructurales se expresan en esta memoria como porcentaje sobre el peso seco de la muestra.



**Figura II.3.** Representación esquemática de la acción de las distintas enzimas implicadas en la determinación de carbohidratos no estructurales, según el protocolo descrito en la **Sección II.3.3.**

#### II.3.4. Composición foliar en pigmentos.

La composición foliar en pigmentos a que se hace referencia en el **Capítulo 3**, se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC), siguiendo el protocolo descrito por Büch *et al.* (1994), ligeramente modificado. La determinación del contenido foliar en pigmentos de muestras de *Abies pinsapo* fue llevada a cabo durante una estancia breve de investigación, en las instalaciones adscritas al Departamento de Ciencias Forestales de la Universidad de British Columbia (Vancouver, Canadá). Las muestras correspondientes a *Abies alba* fueron analizadas en las instalaciones de los Servicios Técnicos de apoyo a la investigación (S.T.I.) de la Universidad de Jaén, donde el protocolo hubo de ser ligeramente modificado al no disponer de los mismos equipos.

La técnica seleccionada se basa en la interacción hidrofóbica entre el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Ésta última normalmente consiste en un gel de sílice poroso, con un tamaño de partícula de 5-10  $\mu\text{m}$ . “Fase inversa” hace referencia a que existe una capa hidrocarbonada unida mediante enlaces químicos a la superficie del gel de sílice, mediante la silicación de tres grupos hidroxilo libres con un alquiltriclorosilano (normalmente octadecil u octiltriclorosilano).

A pesar de que la naturaleza del mecanismo de retención en RP-HPLC es aún objeto de controversia, se acepta que los compuestos a separar (en nuestro caso, los pigmentos foliares), se eluyen de la columna en orden creciente de sus coeficientes de partición (orden de polaridad decreciente). Así, las xantofilas son liberadas en primer lugar, por delante de las clorofilas, y las feofitinas y los carotenos se eluyen en último lugar. Dado el pequeño tamaño de partícula y la debilidad de las fuerzas superficiales, las separaciones llevadas a cabo son rápidas y muy eficientes, incluso para mezclas complejas (Braumann y Grimme, 1981).

##### II.3.4.1. Toma de muestras y preprocesado.

Se tomaron muestras de acículas en distintos momentos del tiempo: al inicio del experimento, en el tramo de edad correspondiente a un año, y a los dos y cinco meses desde el inicio del experimento, tanto de acículas maduras de un año de edad como en los brotes con acículas nuevas que surgieron en el transcurso del experimento. En el momento inicial se tomaron muestras en siete individuos por especie; a los dos y cinco

meses, se tomaron muestras en al menos cuatro individuos por especie y combinación de tratamientos. Una vez tomadas las muestras, fueron inmediatamente congeladas con N<sub>2</sub> líquido, y conservadas a -20° C hasta su procesamiento. Esta tarea, y el resto de las descritas fueron llevadas a cabo bajo luz tenue, para impedir el deterioro de los pigmentos por fotooxidación.

#### II.3.4.2. Extracción de los pigmentos foliares.

Para la extracción de los pigmentos, se empleó un sistema de tres pasos con acetona a dos concentraciones distintas, según el método propuesto por Dunn *et al.* (2004). Ambos tipos de acetona fueron conservados en hielo durante su empleo. Para optimizar el método, el tejido foliar se homogeneizó empleando el sistema de homogeneización *FastPrep* (MP Biomedicals, Ohio, EE.UU).

Pesados 100 mg de tejido foliar congelado, el material se trocea con la ayuda una cuchilla y se coloca en viales de 2 ml de plástico del kit de homogeneización (FastPrep Lysing Matrix A) (**Figura II.4**). Se añaden 1.5 mL de acetona al 85%, y se agita durante 30'' (agitador FastPrep System FP120, a velocidad 6.5). Acto seguido, el vial se coloca en oscuridad y hielo durante 10'. Se agita con un vórtex durante 10'', y nuevamente se coloca en oscuridad y hielo durante 10'. Pasado este tiempo, se vierte el sobrenadante en un vial de vidrio, y se reserva en oscuridad sobre hielo. El *pellet* se resuspende con 0.5 mL de acetona al 100% y se repite todo el proceso. El sobrenadante obtenido se vierte en el vial de vidrio junto con el anterior y se repite nuevamente el proceso, resuspendiendo de nuevo el *pellet* con 0.5 mL de acetona al 100%. Una vez completados los tres pasos, el último sobrenadante se mezcla con los obtenidos previamente. El extracto obtenido, en 2.5 mL de volumen y acetona al 91% aproximadamente, se guarda en frío (-20 °C) y oscuridad hasta su empleo en el cromatógrafo.



**Figura II.4.** Con el sistema *FastPrep*, la muestra troceada se introduce en viales especiales para su homogeneización.

En el caso de las muestras de *Abies alba*, analizadas en los STI de la Universidad de Jaén, no se dispuso del sistema de homogeneización descrito, por lo que fue necesario homogeneizar cada muestra manualmente, empleando nitrógeno líquido y un mortero de cerámica hasta conseguir un polvo fino de cada muestra en cantidad suficiente.

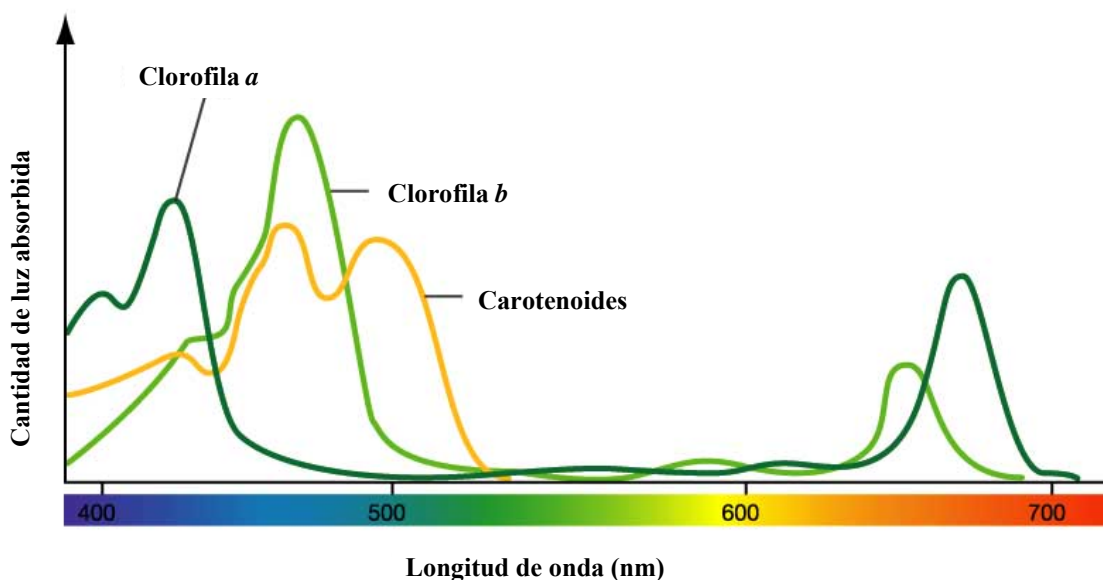
#### II.3.4.3. Separación de pigmentos mediante RP-HPLC.

Para la separación, identificación y cuantificación de los principales componentes del equipo pigmentario de *A. pinsapo*, se empleó un cromatógrafo Dionex Summit HPLC (Sunnyvale, California, EE.UU.) junto con un detector UV-VIS de tipo PDAD (*photo-diode array detector*), Dionex PDA 100, el cual permitió registrar la absorbancia de los picos generados para todo un rango de longitudes de onda (en nuestro caso, en la banda de 300 a 700 nm, con 400, 445 y 665 nm como longitudes de onda de referencia) en lugar de únicamente para dos o tres predefinidas. Se empleó una columna de tipo Hypersil 5 C18 (ODS) de 250 x 4.6 mm, de Phenomenex (Torrance, California, EEUU). Parte de las muestras (las obtenidas de *A. alba*) fueron analizadas en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén, empleando un cromatógrafo Prominence Serie 20 (Shimadzu), en un procedimiento análogo al anterior.

El sistema de fase móvil en gradiente, que emplea únicamente acetona (al 100%) y un tampón acuoso (1mM Hepes, pH 7.0), consigue la separación de los principales pigmentos en 44.1 minutos. Ambas fases móviles fueron conservadas siempre en frío, y degasificadas antes de su uso, con un baño de ultrasonidos a baja presión. La velocidad de flujo y la temperatura se fijaron respectivamente en 1.2 mL min<sup>-1</sup> y 30° C, y se inyectaron 50 µL del extracto filtrado de cada muestra. Este sistema se ejecuta de la siguiente manera: 0-10' 60-75% de acetona, 10-30' 75-98% de acetona, 30-44.1' 98% acetona.

En la identificación de los pigmentos, y en la determinación de las concentraciones, fueron clave cuatro factores: *i*, la extensa bibliografía revisada relativa a la caracterización de pigmentos foliares y su separación mediante el empleo de técnicas cromatográficas, lo que permitió conocer de antemano tanto el espectro de absorción característico de todos los pigmentos en distintos disolventes (**Figuras II.5** y **II.6**) y los coeficientes de extinción necesarios para el cálculo de las concentraciones,

como el orden de elución de los pigmentos separados en condiciones similares a las empleadas en este trabajo; *ii*, la resolución del método de separación seleccionado, que permitió una buena separación de los picos/pigmentos sin presentar problemas de coelución entre compuestos; *iii*, el empleo de un detector de tipo PDAD, que permitió el registro de la absorbancia en todo un rango de longitudes de onda, información necesaria para confirmar la pureza espectral de los picos separados, y para conocer las características espectrales de cada uno de ellos y poder confirmar la identidad de los mismos por comparación con los espectros hallados en la literatura. Además, el detector empleado permite trabajar con las longitudes de onda óptimas en cada caso (aquellas en las que los pigmentos muestran máximos locales de absorbancia, y para las que se hallaron los coeficientes de extinción antes mencionados); y *iv*, la purificación de pigmentos llevada a cabo para la preparación de auténticos estándares, que permitió confirmar por partida doble la identificación inicial de los picos, al poder comparar los tiempos de retención y los espectros de absorbancia obtenidos para los distintos pigmentos en uno y otro caso con los hallados en otros trabajos.



**Figura II.5.** Los principales pigmentos presentes en organismos autótrofos presentan espectros de absorción característicos.

En primer lugar, y mediante una extensa revisión bibliográfica (ver, por ejemplo, Braumann y Grimme, 1981; Eskins *et al.* 1983; de las Rivas *et al.* 1989; Thayer y Björkman, 1990; Gilmore y Yamamoto, 1991; Choudhury *et al.* 1993; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993; Büch *et al.* 1994; Schoefs *et al.* 1995; Hegazi *et al.*

1998), se efectuó una identificación tentativa de los picos separados, considerando su secuencia de aparición, los tiempos de retención y los espectros de absorción asociados a cada uno de ellos, con máximos locales característicos (**Figura II.6** y **Tabla II.2**). Esta identificación preliminar fue ratificada *a posteriori* tras el proceso de purificación de pigmentos y la preparación de estándares, descrito en el siguiente apartado.

**Tabla II.2.** Máximos locales de absorción (nm) de distintos pigmentos en acetona (etanol en el caso de la anteraxina). I, II y III hacen referencia al primer, segundo y tercer máximo local, respectivamente.

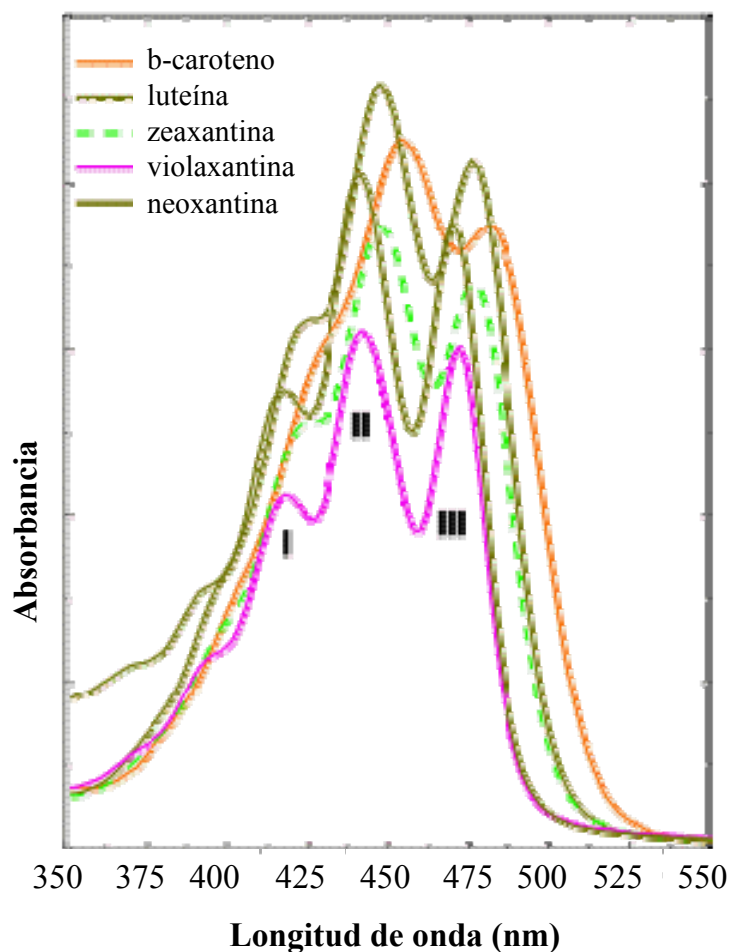
	I	II	III
neoxantina	413 (415)	438 (439)	466 (467)
violaxantina	417 (419)	440 (442)	470 (472)
anteraxantina	422 (421)	444 (443)	472 (473)
zeaxantina	(425) (428)	450 (454)	478 (481)
luteína	425 (422)	447.5 (445)	476 (474)
clorofila <i>b</i>	456.9	596.7	645.5
clorofila <i>a</i>	430.3	616.5	662.1
feofitina <i>a</i>	409.5	505.3; 608.9	665.5
feofitina <i>b</i>	434.5	527.7; 599.9	653.5
$\beta$ - caroteno	(426)	453.5	479.9
$\alpha$ - caroteno	(422)	447	475

#### II.3.4.4. Purificación de pigmentos y preparación de estándares.

Para la luteína y el  $\beta$ -caroteno se contó con estándares comerciales. Para el resto de los pigmentos a cuantificar (neoxantina, violaxantina, luteína, clorofilas *a* y *b*, y  $\beta$ -caroteno), fue necesaria la obtención de pigmentos purificados, usando un extracto concentrado de tejido foliar de una planta herbácea genérica expuesta a pleno sol, conforme a Adams y Demmig-Adams (1992), al objeto de activar el ciclo de las xantofilas y obtener así suficiente cantidad de cada uno de los distintos pigmentos.

De todos los pigmentos identificados, no se cuantificaron ni las feofitinas ni la violaxantina, a falta de un estándar comercial o por ser éste extremadamente caro y por la imposibilidad de purificar una cantidad de pigmento suficiente a partir de otras fuentes. En el caso de las feofitinas, es de destacar que son indicativas de la degradación de la clorofila. Por tanto, el registro de niveles muy bajos o indetectables en nuestras muestras da garantías sobre su buen estado de conservación cuando fueron analizadas. Los niveles de feofitinas en los extractos concentrados para la obtención de estándares

fueron también muy bajos, por lo que no se pudo aislar una cantidad suficiente de este tipo de compuestos.



**Figura II.6.** Espectro de absorción de distintos compuestos carotenoides. I, II y III indican los máximos locales característicos.

Para la purificación de los pigmentos se empleó el sistema descrito en este trabajo, pero con un colector de fracciones acoplado en línea. 50  $\mu$ L del extracto concentrado fueron inyectados en el sistema cuatro veces seguidas. Conociendo el tiempo de retardo entre la inyección y el detector, así como la cantidad de flujo recolectada en cada fracción, se identificaron las fracciones en las que se encontraban los distintos pigmentos aislados individualmente. El contenido de estas fracciones se desecó bajo un flujo laminar de  $N_2$  durante toda una noche. Los pigmentos se redisolvieron con los disolventes para los cuales se halló el coeficiente de extinción en la literatura (ver **Tabla II.3**), y las disoluciones obtenidas se llevaron al

espectrofotómetro, al objeto de medir su absorbancia para las longitudes de onda correspondientes a estos coeficientes.

**Tabla II.3.** Coeficientes de extinción (*specific absorption coefficients*) de los pigmentos cuantificados hallados en la literatura consultada.

<b>Pigmento</b>	<b>Lambda</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Referencia</b>
Neoxantina	438 nm	2470	Britton <i>et al.</i> 1994
Violaxantina	440 nm	2550	Britton <i>et al.</i> 1994
Luteína	445 nm	2550	Britton <i>et al.</i> 1994
Clorofila a	662 nm	88.88	Lichtenthaler y Wellburn, 1983
Clorofila b	645 nm	56.11	Lichtenthaler y Wellburn, 1983
$\beta$ -caroteno	450 nm	2620	Britton <i>et al.</i> 1994

La concentración de cada pigmento en los estándares preparados se calculó usando los coeficientes de extinción publicados (ver e.g. Gruszecki *et al.* 1994), mediante la siguiente ecuación:

$$A = \alpha \times c_w \times d \quad (3)$$

donde  $A$  es la absorbancia registrada a una cierta longitud de onda (sin dimensiones),  $\alpha$  es el coeficiente específico de absorción calculado para esa longitud de onda (en  $L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $c_w$  es la concentración (en  $\text{g L}^{-1}$ ) y  $d$  es la longitud del recorrido óptico, según la cubeta usada, en cm (el ancho de la cubeta estándar es de 1 cm). Conocida la concentración, las nuevas disoluciones fueron inyectadas en el sistema cromatográfico como si se tratara de nuevas muestras, y en los cromatogramas obtenidos, se halló la altura de los diferentes picos hallados en cada caso, para conocer la relación existente entre ambas variables.

#### II.3.4.5. Cálculo de la concentración en las muestras.

Una vez conocida, para cada pigmento, la relación existente entre la concentración (a través de la medida de absorbancia y el coeficiente de extinción) y la altura del pico purificado en los distintos estándares, se aplicó esta misma relación a la altura de los picos separados en los distintos cromatogramas, al objeto de conocer la concentración de cada pigmento presente en las distintas muestras. Esta concentración fue calculada con la precaución de corregir la deriva de la línea de base de los cromatogramas. La

altura de pico correspondiente a cada pigmento fue la hallada a la longitud de onda requerida en cada caso, aquella a la que el pigmento muestra la máxima absorbancia.

### II.3.5. Potencial hídrico xilemático.

El potencial hídrico es una medida de la tensión con que el agua está retenida dentro de los tejidos de la planta, siendo esta tensión mayor cuanto más estresada está la planta desde el punto de vista hídrico. Para medir este potencial se empleó una cámara de Schölander acoplada a una botella de N<sub>2</sub> comprimido. Este dispositivo proporciona la presión que hay que ejercer con un gas inerte para desplazar el agua de los tejidos en la rama empleada, presión que se hace más negativa a medida que el estrés hídrico del espécimen aumenta. Consta



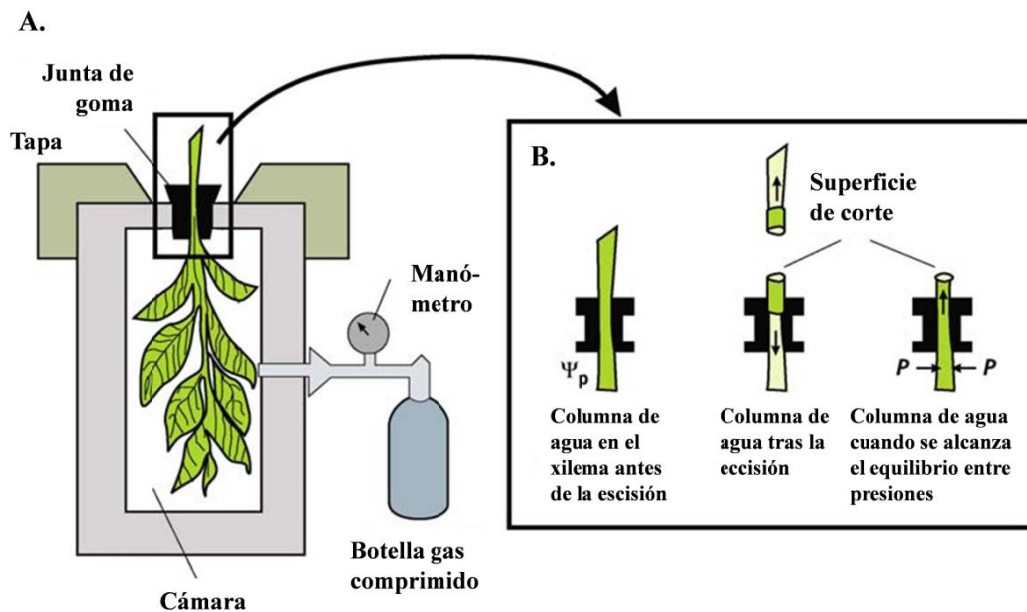
**Figura II.7.** El modelo de sobremesa empleado. Obsérvese la cámara metálica, el manómetro, la entrada de gas y distintas válvulas.

básicamente de un recipiente metálico, capaz de soportar una presión en su interior de hasta 80 bares, un portamuestras, formado por una pieza metálica perforada, un *set* de juntas de goma, que permiten el cierre hermético de la cámara; y un manómetro, una conexión externa para la entrada del gas y una válvula para regular su caudal.

Para el experimento de estrés hídrico descrito en el **Capítulo 4** de este trabajo, se empleó una cámara de Schölander de sobremesa, modelo Pressure Chamber 3000 (SoilMoisture Inc., Santa Bárbara, California, EE.UU.). El potencial hídrico xilemático fue medido al mediodía en todos los individuos empleados en el experimento (**Figura II.7**). Para el trabajo de campo (**Capítulo 6**) se empleó una cámara de Schölander portátil cedida por la Universidad Pablo de Olavide, modelo PMS 100 (PMS Instruments Co., Corvallis, Oregón, EE.UU.), y las medidas se realizaron en las primeras horas de la tarde.

En cada individuo se empleó una ramita, cortada en su base con una cuchilla afilada mediante un corte biselado y limpio. Esta rama es depositada en el interior de la

cámara, justo tras ser escindida, con la sección de corte atravesando la apertura de la misma. Tras el cierre hermético de la cámara, se aplica una presión creciente de gas en su interior, hasta que la superficie de corte se oscurece por la proximidad del agua desplazada, siendo el potencial hídrico el valor de presión (en bares) que se lee en ese momento en el manómetro del dispositivo (**Figura II.8**).



**Figura II.8.** Principio de funcionamiento de la cámara de Schölander (tomado de Lambers *et al.* 1998).

### II.3.6. Medidas de intercambio gaseoso.

#### II.3.6.1. Tasas instantáneas de fotosíntesis y de conductancia estomática.

Para las medidas de intercambio gaseoso a las que se hace referencia en esta memoria (**Capítulos 3, 4, 5 y 6**), se empleó un analizador portátil de intercambio gaseoso ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) por absorción de infrarrojos (*Infra Red Gas Analyzer*, IRGA), modelo LI-6400, acoplado a una cámara de medida específica para coníferas, el modelo LI-6400-05 (LICOR Inc. Lincoln, Nebraska, EE.UU.) (**Figura II.9**). El dispositivo cuenta además con un sensor de PAR externo para conocer la irradiancia incidente en la banda PAR durante las medidas, y registra simultáneamente otras variables ambientales, como la temperatura del aire o la presión atmosférica.

El LI-6400 es un sistema abierto que mide simultáneamente la concentración de CO<sub>2</sub> y de H<sub>2</sub>O en dos canales: un canal de referencia, representativo de las condiciones ambientales en que se encuentra el individuo, y un canal de medida, que proviene de la cámara de coníferas y en el que la concentración de gas varía como consecuencia del proceso predominante (fotosíntesis, respiración). Las diferencias registradas entre ambos canales se traducen en valores de tasas instantáneas de fotosíntesis neta ( $A_N$ , expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y de conductancia estomática al vapor de agua ( $g_s$ , expresada en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).



**Figura II.9.** Cámara de coníferas modelo LI – 6400 - 05 empleada con el IRGA LI - 6400. El cilindro negro de la parte izquierda es el sensor externo de PAR incidente..

Este dispositivo registra además otras variables como la transpiración, y la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$ ), la cual es calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$C_i = \frac{\left(g_{tc} - \frac{E}{2}\right) x C_s - A}{g_{tc} + \frac{E}{2}} \quad (4)$$

donde  $g_{tc}$  es la conductancia total al CO<sub>2</sub>, expresada en expresada en  $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $C_s$  es la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire que llega hasta la hoja (fracción molar de CO<sub>2</sub> en el canal de medida, en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$ ),  $A$  es la tasa neta de asimilación (en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), y  $E$  es la tasa de transpiración, expresada en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . El cálculo de estos parámetros por el dispositivo sigue las ecuaciones obtenidas por Caemmerer y Farquhar (1981).

El registro de este tipo de datos se efectuó en ciclos de medida de cinco minutos, con una frecuencia de cinco segundos, para garantizar un seguimiento adecuado de los rápidos cambios que puedan producirse en las variables a medir. Del conjunto de datos obtenidos, se desecharon sistemáticamente los correspondientes a los dos primeros

minutos, el tiempo necesario para que el ambiente del interior de la cámara se estabilice y las hojas se “aclimaten” a las nuevas condiciones ambientales.

### II.3.6.2. Curvas fotosíntesis vs. irradiancia (curvas P-I).

La obtención de curvas P-I permite conocer la actividad fotosintética de los distintos individuos frente a condiciones crecientes de irradiancia. Con esta información pueden deducirse parámetros tales como el punto de compensación para la luz, la respiración en la oscuridad, la tasa máxima de fijación de carbono o la eficiencia fotosintética, fundamentales para caracterizar los patrones de producción vegetal.

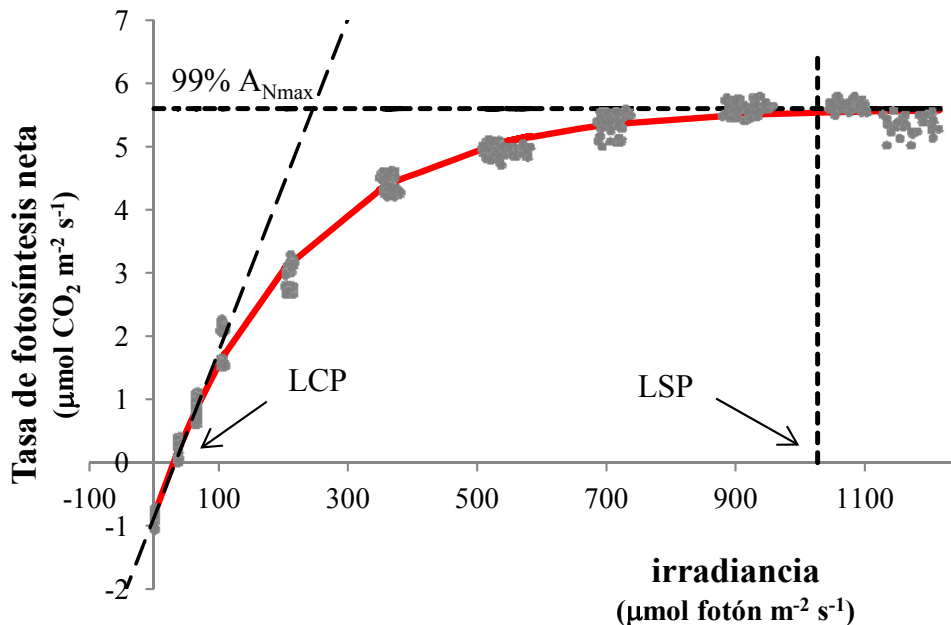
Para la obtención de los valores experimentales con que construir estas curvas P-I se empleó el mismo IRGA portátil junto con la cámara de coníferas. Los individuos fueron incubados en oscuridad y bajo irradiancias crecientes en un rango de aproximadamente 30 a 1100  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La irradiancia fue suministrada mediante una lámpara de haluro metálico acoplada a un foco halógeno. Los distintos niveles de luz se consiguieron variando la distancia a la fuente de luz, y mediante la interposición de filtros neutros de malla gris. Las medidas se tomaron en dos tramos distintos de un año de edad, durante cinco minutos y con una frecuencia nuevamente de cinco segundos, para cada nivel de luz.

Una vez corregidos los datos experimentales por el área real empleada en cada tramo, se utilizó el programa CurveExpert v. 1.4 (Hyams y Microsoft Corporation, 1995 - 2009) para calcular los parámetros fotosintéticos mediante el ajuste de los datos a una ecuación exponencial inversa (Goudriaan, 1982; Tosserams *et al.* 2001; Avola *et al.* 2008) (**Figura II.10**):

$$A_N = A_{max}x \left( 1 - e^{\frac{-Q_{app}xPPFD}{A_{max}}} \right) + R_d \quad (5)$$

donde,  $A_N$  representa la tasa neta instantánea de fotosíntesis ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),  $A_{max}$  la tasa máxima de fotosíntesis ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),  $PPFD$  es la irradiancia de medida ( $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),  $R_d$  la tasa de respiración en oscuridad (el punto de corte de la curva con el eje de ordenadas), también expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , y  $Q_{app}$  es la eficiencia lumínica aparente del proceso fotosintético ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ foton}$ ): el máximo

rendimiento cuántico logrado en la parte lineal de la curva, el cual se obtiene a partir de la primera derivada de la ecuación  $\delta A_N / \delta PPF D$ , y considerando  $PPFD = 0$  (Tosserams *et al.* 2001). La tasa máxima de fotosíntesis neta,  $A_{Nmax}$ , el valor para el que se produce la saturación de la curva, se obtuvo como la suma de los valores de  $A_{max}$  y  $R_d$ .



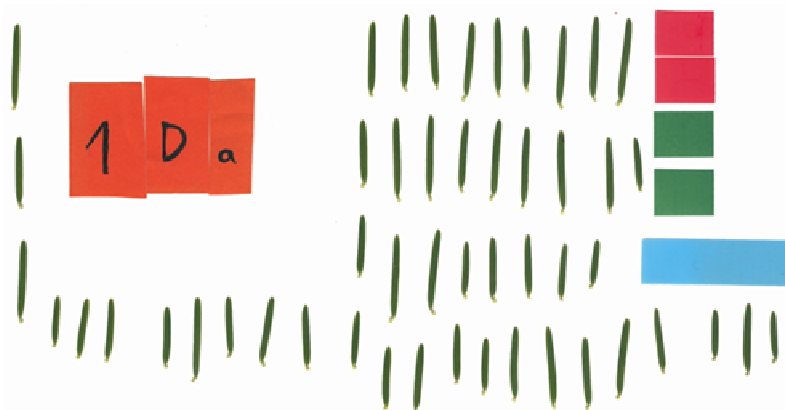
**Figura II.10.** Representación de los datos experimentales obtenidos en la realización de una curva P-I, junto con el ajuste efectuado (en rojo) de acuerdo con la ecuación propuesta por Avola *et al.* (2008). Se indica la forma de calcular el punto de compensación para la luz (LCP) y el punto de saturación (LSP).

Por otro lado se empleó Mathematica 7 (Wolfram Research Inc., 1988-2009) para la obtención del punto de compensación para la luz (*LCP, light compensation point*), como el punto de intersección de la curva con el eje de abscisas; es decir, el valor de *PPFD* para el que  $A_N = 0$ . El punto de saturación para la luz (*LSP, light saturation point*), se calculó como el valor de *PPFD* para el que  $A_N = 99 \% A_{Nmax}$ .

### II.3.6.3. Determinación del área foliar.

El equipo LI-6400 utilizado emplea por defecto un valor de 1000 mm<sup>2</sup> de área foliar para el cálculo de las tasas de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y otras variables. Salvo en los casos en que no fue posible, estos datos se recalcularon para expresar el intercambio gaseoso respecto al área foliar a través de la que realmente se produce éste. Para ello, tras las medidas con el IRGA, los tramos empleados en cada

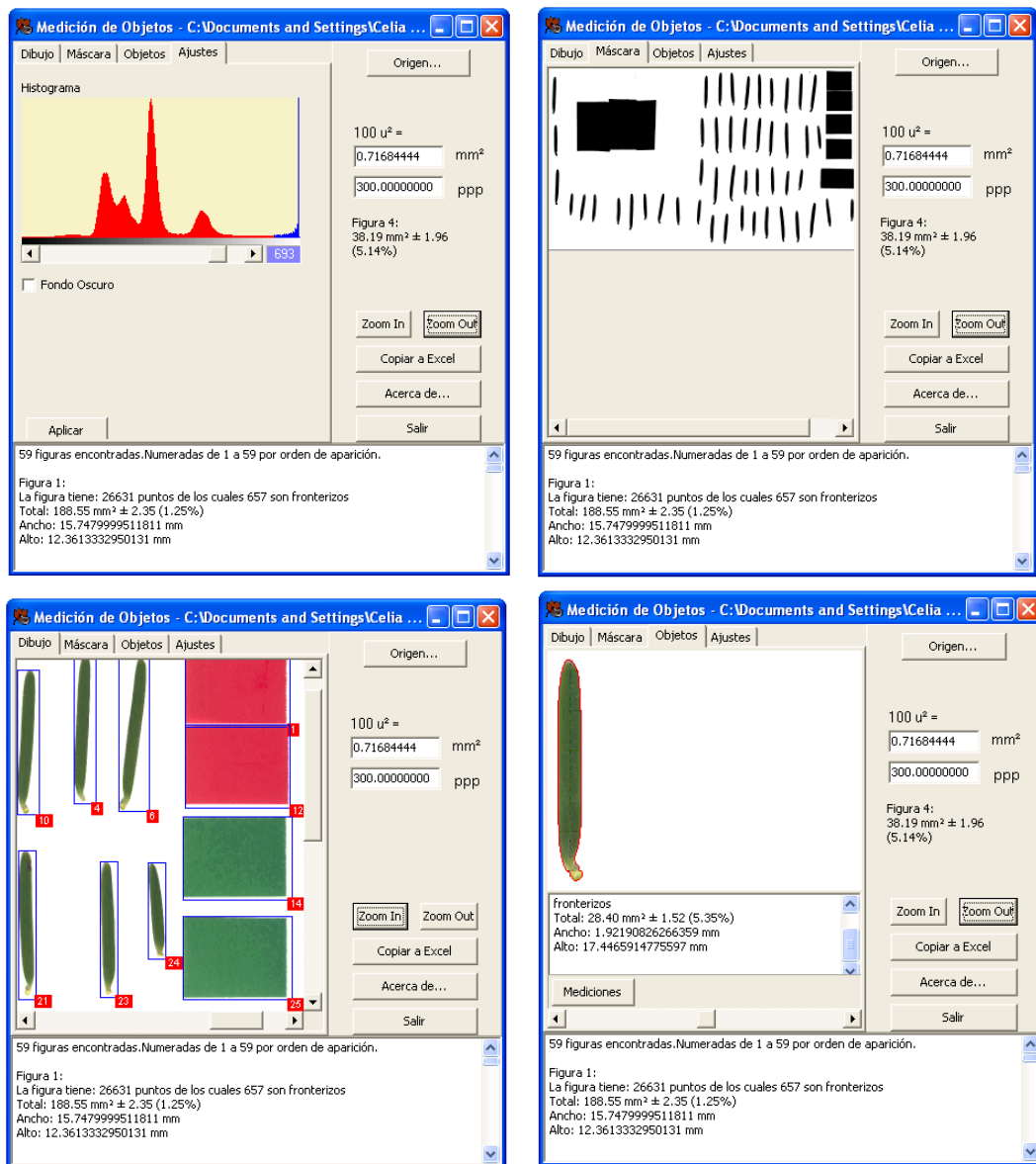
rama se cortaron y se transportaron al laboratorio para calcular su área foliar mediante análisis de imagen. Para cada tramo, se escindieron todas sus acículas y se escanearon junto con un objeto de área conocida (**Figura II.11**).



**Figura II.11.** Imagen tipo procesada de una muestra de acículas empleada con el programa *midebmp* para el cálculo del área foliar real. A la derecha, “objetos” de área conocida tomados por el programa como referencia.

Se empleó un escáner comercial, modelo ScanJet 4300 C (Hewlett-Packard), junto con la interfaz para PC HP Precision LTX. La imagen así obtenida fue procesada para eliminar las sombras del contorno de las acículas con un programa de tratamiento de imágenes básico (Adobe Photoshop 6.0; Adobe Systems Inc., 1990 - 2000), antes de emplearse con un programa de análisis de imagen denominado *midebmp*. (Ordiales-Plaza, 1999-2000). Esta aplicación, partiendo de imágenes en color de 24 bits obtenidas con una resolución de 300 ppp, reconoce los objetos de una imagen que muestren colores diferenciados y permite tanto calcular los datos de superficie como exportarlos a una hoja de cálculo (**Figura II.12**).

Para aumentar la operatividad en la corrección por el área foliar real de las distintas medidas registradas, se optó por hallar una ecuación que permitiera conocer el área foliar de un conjunto de acículas a partir del peso fresco de las mismas. En el caso de los individuos juveniles de *Abies pinsapo* se tomaron, por duplicado, seis muestras con cantidades variables de acículas (5, 10, 25, 50, 100 y 200), en los tramos de las ramas correspondientes a uno, dos y tres años de edad, en cinco individuos seleccionados al azar dentro de la partida de individuos empleada en los distintos experimentos (36 muestras en total).



**Figura II.12.** El programa *midebmp*, partiendo de una imagen con acículas y objetos de tamaño conocido, y una vez hecho los ajustes de contraste necesarios, reconoce cada una de las acículas como objetos independientes a las que asigna un valor de superficie.

Estas muestras fueron pesadas en fresco, escaneadas y procesadas tal y como se ha descrito en esta sección, para conocer el área foliar real de cada una de ellas. A partir de este conjunto de 36 pares de datos, se obtuvo la relación entre el peso fresco de acículas y el área foliar que éstas exponen (**Figura II.13**), comprobándose que ambas variables guardan una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$  para el coeficiente de correlación de Pearson; los valores de éste se muestran más abajo).

Las ecuaciones de regresión lineal que expresan las relaciones representadas en la **Figura II.13**, son:

- Juveniles de vivero de *Abies pinsapo*:

$$AF = 1995.9 \times PF \text{ (g)} + 9.3763; R^2 = 0.9923 \quad (6)$$

- Juveniles de vivero de *Abies alba*:

$$AF = 2365.3 \times PF \text{ (g)} + 32.566; R^2 = 0.9952 \quad (7)$$

donde  $AF$  es el área foliar ( $\text{mm}^2$ ) y  $PF$  es el peso fresco (g), de las acículas.

Para la corrección de las medidas de intercambio gaseoso tomadas a cabo durante el trabajo de campo (**Capítulo 6**), la resolución de este problema fue algo más compleja, considerando la variabilidad natural inherente a los individuos silvestres, de edades distintas y localizados en distintos microambientes. A pesar de que se procedió de forma similar, se hizo una distinción entre los individuos de mayor porte localizados en posiciones de sol, los individuos claramente de sombra, con crecimiento ralentizado, y los individuos que se hallaron en condiciones ambientales más heterogéneas, en el borde de los claros. Dentro de cada uno de estos grupos, se tomaron muestras con cantidades variables de acículas, correspondientes al primer, segundo y tercer tramo de las ramas, en individuos seleccionados al azar.

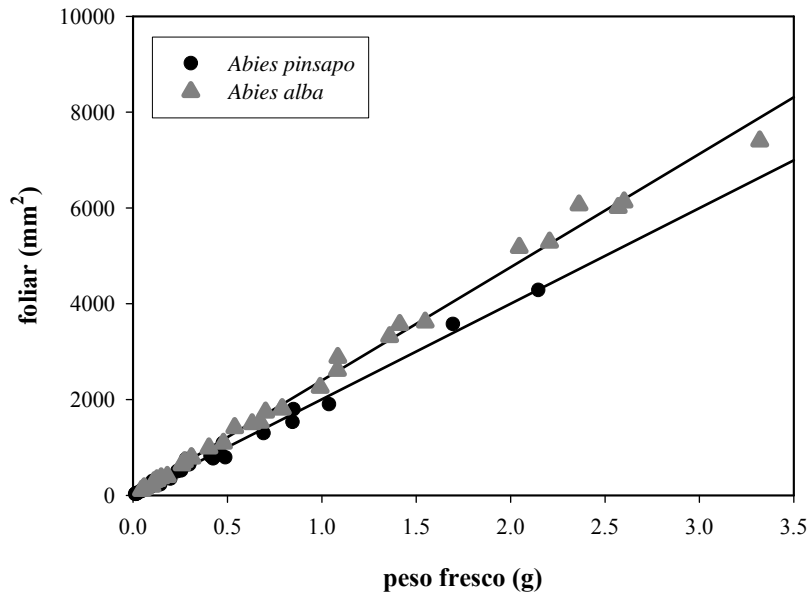
Dentro de cada subgrupo de individuos, se obtuvo la relación entre el peso fresco de las acículas y su área foliar (**Figura II.14**), comprobándose nuevamente que ambas variables guardan una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$  para el coeficiente de correlación de Pearson; los valores de éste se muestran más abajo).

Las ecuaciones correspondientes a juveniles silvestres de *A. pinsapo* fueron las siguientes:

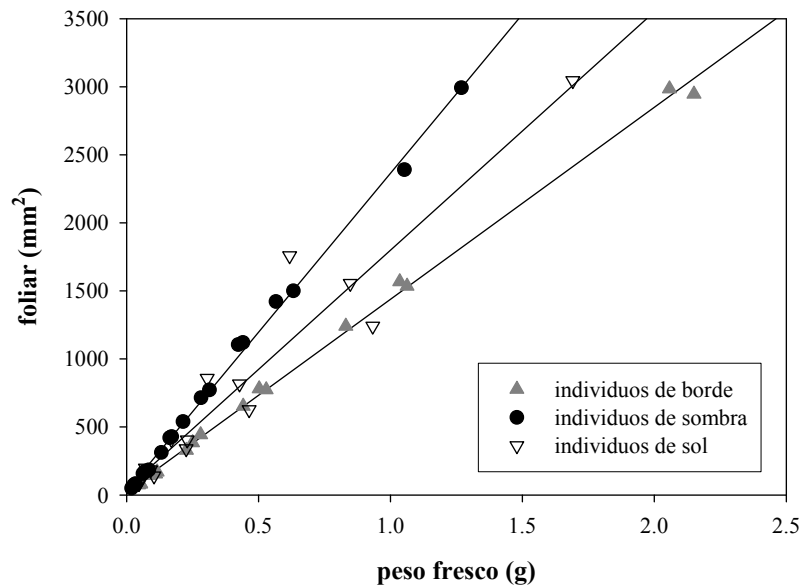
- Individuos de sol:  $AF = 1751.8 \times PF \text{ (g)} + 47.539; R^2 = 0.9241 \quad (8)$

- Individuos de borde:  $AF = 1411.3 \times PF \text{ (g)} + 27.359; R^2 = 0.9979 \quad (9)$

- Individuos de sombra:  $AF = 2335.7 \times PF \text{ (g)} + 28.864; R^2 = 0.9973 \quad (10)$



**Figura II.13.** Relación entre el peso fresco y el área foliar que oponen a las fuentes de luz las acículas de individuos juveniles de *Abies pinsapo* y de *Abies alba* de vivero.



**Figura II.14.** Relación entre el peso fresco y el área foliar que oponen a las fuentes de luz las acículas de individuos juveniles silvestres de *Abies pinsapo* localizados en distintos microambientes.

### II.3.7. Discriminación de isótopos estables de carbono.

La composición isotópica en muestras de acículas de *A. pinsapo* y de *A. alba* obtenidas durante la realización de los experimentos de los **Capítulos 3** y **4** de esta memoria se determinó mediante GC-C-IRMS, es decir, un espectrómetro de masas de razones isotópicas en línea con un cromatógrafo de gases y un horno de combustión, como pasos previos.

El tejido foliar, procedente de acículas maduras y nuevas de cada uno de los individuos, fue homogeneizado en un mortero de cerámica empleando N<sub>2</sub> líquido, posteriormente secado en estufa a 60° C, y una cantidad de 1.5 mg por muestra, encapsulada en receptáculos de estaño. Las cápsulas se enviaron a la Stable Isotope Facility de la Universidad de California-Davis (California, EE.UU.), para el análisis de <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C mediante un analizador elemental PDZ Europa ANCA-GSL en línea con un espectrómetro de masas de ratio isotópico PDZ Europa 20-20 (Sercon Ltd., Cheshire, Reino Unido).

El análisis consiste en un primer paso de combustión de las muestras a 1020°C en un horno reactor con matriz de óxido de cromo y óxido cobaltoso/cobáltico de plata. A continuación, la mezcla de gases producida en la combustión se hace fluir, junto con un gas portador (He), a través de un reactor de reducción (cobre reducido a 650°C), para la eliminación de los óxidos, y posteriormente a través de una trampa desecante de perclorato de magnesio que elimina el vapor de agua. A continuación, los gases reducidos de nitrógeno y el CO<sub>2</sub> resultantes se separan en una columna cromatográfica Carbosieve (65°C, 65 mL min<sup>-1</sup>) y son inyectados en el analizador de gases por infrarrojo acoplado al espectrómetro de masas (IRMS).

Con este procedimiento, se obtiene la composición en isótopos estables de C del tejido foliar, expresada en tanto por mil (‰, con una precisión analítica inferior al 0.01 ‰), indica la desviación proporcional del cociente molar de la muestra con respecto al del carbonato del estándar de Belemnita PeeDee (PDB), y se calcula según la expresión (Craig 1957):

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[ \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right] \times 1000 \quad (11)$$

donde *R* representa el ratio <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C.

A partir de estos valores de composición isotópica, se calculó la discriminación isotópica de la fotosíntesis,  $\Delta$ , el parámetro que refleja en qué medida tiene lugar ese proceso de discriminación del isótopo pesado  $^{13}\text{C}$  respecto al ligero  $^{12}\text{C}$ , mediante el modelo propuesto por Farquhar *et al.* (1989):

$$\Delta(\text{‰}) = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \delta_p} \quad (11)$$

donde  $\delta_a$  y  $\delta_p$  hacen referencia a la composición isotópica del aire y del tejido vegetal, respectivamente, y asumiendo que la composición isotópica del aire es de -8‰. Esta discriminación isotópica, que explica el empobrecimiento en  $^{13}\text{C}$  de la materia orgánica con respecto al aire, representa el balance neto de procesos biofísicos (difusión del  $\text{CO}_2$  desde el aire al interior de la hoja, dependiente de la diferencia entre la presión parcial de  $\text{CO}_2$  interna y externa, y de la conductancia estomática) y bioquímicos (discriminación enzimática contra el  $^{13}\text{CO}_2$  por la Rubisco). Y por ello, tiene la ventaja sobre la composición isotópica de informar directamente sobre las consecuencias de los procesos biológicos que han tenido lugar, independientemente de la composición isotópica de la fuente. No obstante, en los diferentes análisis estadísticos se emplearon tanto los valores de discriminación isotópica como los de composición isotópica para la detección de diferencias significativas.



**III. Respuestas de aclimatación a la luz en *Abies pinsapo* y *Abies alba***

---



### **III. Respuestas de aclimatación a la luz en *Abies pinsapo* y en *Abies alba*.**

*En este capítulo se recoge el primero de los experimentos realizados con la intención de comparar, desde una perspectiva ecofisiológica, el comportamiento mostrado por individuos juveniles de *A. pinsapo* y *A. alba* bajo condiciones controladas. En particular, se trata de un experimento diseñado con el objetivo de evaluar las respuestas de aclimatación a dos niveles de irradiancia distintos, mediante el seguimiento de variables de índole ecofisiológica caracterizadas por manifestarse a distintas escalas espaciales y temporales. Así, dicho diseño permitió evaluar, en distintos plazos de tiempo, el efecto que el desarrollo de este proceso de aclimatación tuvo sobre los patrones de distribución de biomasa, el intercambio gaseoso, el equipo pigmentario y la composición isotópica del tejido foliar sometido a este proceso, a fin de conocer, en última instancia, si esta variable puede ser empleada no sólo como indicador del estrés hídrico sino también del estrés por déficit energético.*

#### **III.1. Introducción.**

##### *III.1.1. El ambiente lumínico en ecosistemas forestales mediterráneos.*

El tipo y la cantidad de radiación disponible influye en numerosos procesos fisiológicos, morfogénicos y reproductivos de plantas y animales, y afecta de forma muy significativa al funcionamiento general del ecosistema (Kohen *et al.* 1995). En el caso de las especies vegetales, el ambiente lumínico en general, y la intensidad lumínica promedio en particular, constituyen un componente muy importante del nicho de regeneración (Canham *et al.* 1994; Kobe 1999), hasta el punto de que la disponibilidad de irradiancia incidente en la banda PAR constituye una de las variables ambientales más determinantes para la presencia y el desarrollo de una especie vegetal en un lugar concreto.

En lo que respecta a los bosques mediterráneos, la información existente sobre las características de la luz disponible bajo su dosel es escasa, existiendo unos pocos estudios comparativos sobre su intensidad (Valladares, 2003; Valladares, 2004). Esto puede deberse a que el papel que juega la disponibilidad de luz en estos ecosistemas haya sido tradicionalmente subestimado, toda vez que, en comparación con otros

ecosistemas forestales, su emplazamiento geográfico posibilita que la cantidad de luz que incide sobre el dosel sea bastante mayor y más constante que en otros ecosistemas forestales. No obstante, con los pocos datos disponibles se puede concluir que el sotobosque de un bosque mediterráneo -con pocas limitaciones hídricas y escasa o nula intervención- llega a ser tan oscuro como el de un bosque templado o tropical maduro (Valladares *et al.* 2004a). Además, la intensa estacionalidad del clima mediterráneo (que también influye en la cantidad y el tipo de radiación incidente), la heterogeneidad espacial que caracteriza a estos bosques, las discontinuidades en el dosel y la fragmentación que afecta a muchos de ellos, la gestión de estos sistemas mediante distintos tipos de intervención... son factores que contribuyen a incrementar la variabilidad temporal y espacial de este recurso clave, especialmente a nivel del sotobosque, por lo que se considera que la luz también juega un papel fundamental en estos ecosistemas (Valladares *et al.* 2004a).

### *III.1.2. Estructura forestal y disponibilidad de luz en los pinsapares.*

Debido a la latitud (36° N) y a la altitud a la que se encuentran habitualmente los pinsapares (entre los 1000 y los 1800 m.s.n.m.), los individuos adultos del dosel se encuentran sometidos durante gran parte del año a niveles de irradiancia altos de forma prolongada (**Figura III.1**). No obstante, la presencia frecuente de frentes borrascosos de origen atlántico, y la retención de éstos en las sierras donde se encuentran, disminuyen significativamente la irradiancia incidente en periodos de distinta duración. Además, la densidad de pies por hectárea y la escasa diversidad específica de estos bosques, especialmente por encima de los 1100 metros (ver, por ejemplo, Linares, 2004) favorecen el desarrollo de un dosel cerrado y compacto, que impide el acceso a este recurso tanto para individuos del sotobosque como para las especies de matorral acompañante, cuya presencia está prácticamente excluida salvo en aquellos casos en que se abre un hueco como consecuencia de una perturbación. Así, el grado de tolerancia a la sombra y la capacidad de aprovechar los rayos de luz que se filtren a través del dosel forestal (**Figura III.2**) pueden ser decisivos para las plántulas y brinzales a la hora de sobrevivir y tener éxito en el interior umbroso de los pinsapares, al igual que la capacidad de adaptarse a los cambios bruscos en el ambiente lumínico que puedan derivarse de la apertura de un hueco en el dosel forestal. En este sentido, distintos trabajos han puesto de manifiesto que, frecuentemente, es necesario que se produzca un

aumento en los niveles de la irradiancia relativa a través de la apertura de claros para que los individuos juveniles de las especies forestales, tanto tolerantes como intolerantes a la sombra, puedan alcanzar la parte superior del dosel (Canham, 1988b; Spies y Franklin, 1989; Emborg 1998). En el caso particular de los pinsapares, ya Arista (1995) resaltó el papel que puede jugar la moderada tolerancia a la sombra del pinsapo ante la apertura de un hueco en el dosel forestal.

### *III.1.3. La aclimatación a la luz como respuesta a cambios en el ambiente lumínico.*

La aclimatación y la adaptación constituyen procesos críticos que afectan a la manera en que los árboles y el propio ecosistema forestal hacen frente a cambios en el ambiente. La capacidad de aclimatación es una propiedad intrínseca a todos los organismos vivos, especialmente a las especies forestales, caracterizadas por su gran tamaño y largo ciclo de vida (Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000).



**Figura III.1.** Individuos adultos expuestos al sol de septiembre. Puerto de Los Pilonos, ca. 1800 m.s.n.m. (Ronda, Málaga).

La aclimatación se define como el ajuste morfológico y fisiológico que los organismos experimentan cuando se ven sometidos a un factor de estrés, al objeto de compensar la disminución que se produce en un determinado proceso fisiológico a consecuencia de éste (Lambers *et al.* 1998). Otros autores la definen como “*el proceso por el que, a través de cambios morfológicos y fisiológicos, se incrementa la capacidad*

*de fijación de carbono en un nuevo medio ambiente*” (Naidu y DeLucia 1997). Este proceso de aclimatación se manifiesta a una escala temporal que va desde los días hasta las semanas, y puede demostrarse sometiendo a individuos genéticamente similares a condiciones ambientales distintas durante su crecimiento (Lambers *et al.* 1998).



**Figura III.2.** Los rayos de sol se filtran a través del dosel del pinsapar. Puerto Saucillo (Yunquera, Málaga).

En el caso particular de la luz como variable ambiental responsable del proceso, existen diferencias entre hojas que se hayan desarrollado en ambientes distintos, en cuanto a su respuesta fotosintética a la luz, lo que proporciona un mecanismo potencial para maximizar la fijación de carbono de la planta (Björkman, 1981; Givnish 1988). De hecho, la definición clásica de aclimatación a la sombra sugiere que las hojas aclimatadas son más productivas en la sombra que las no aclimatadas (Björkman, 1981; Givnish, 1988).

Los efectos de la aclimatación a la luz pueden observarse a distintos niveles: i) alteraciones en parámetros morfológicos y de distribución de biomasa (Niinemets 1998; Lambers *et al.* 1998; Fownes y Harrington 2004; Canham *et al.* 1996); ii) cambios en la composición foliar de pigmentos y en el destino final del nitrógeno foliar (Terashima y Evans 1988; Pearcy y Sims 1994); y iii) cambios en los parámetros fotosintéticos y en las tasas instantáneas de fotosíntesis y conductancia estomática (e.g. Lambers *et al.* (1998), Larcher *et al.* (1995), Terashima y Evans (1988) o Pearcy y Sims (1994)).

En lo que respecta al pinsapo, el interés en el estudio del proceso de aclimatación a distintos niveles de irradiancia está relacionado con el amplio rango de condiciones lumínicas que los individuos de esta especie encuentran a lo largo de su ciclo vital, ya que, sin duda, las condiciones lumínicas que experimenta una plántula que germina en el sotobosque del pinsapar son completamente distintas de las que experimentará en caso de que se produzca una apertura o un aclareo del dosel, o en caso de que llegue a ser uno de los individuos adultos que lo conforman. Por ello, se ha llevado a cabo un experimento, bajo condiciones controladas y con individuos juveniles de pinsapo, que pretende dilucidar en qué medida puede producirse la aclimatación a distintos niveles de irradiancia y las consecuencias de dicha aclimatación en los mecanismos de fijación de carbono y crecimiento, y en el patrón de inversión de recursos. A este respecto, la variabilidad de niveles a los que se manifiesta el proceso de aclimatación a la luz ha permitido su evaluación mediante un diseño experimental que cubre los cambios que tienen lugar en las variables antes mencionadas a distintas escalas temporales.

Por otro lado, este experimento se ha llevado a cabo comparando *A. pinsapo* con individuos de edad y porte similar de *A. alba*, al objeto de dirimir si existen diferencias entre ambas especies en estos términos, y si estas diferencias en su comportamiento pueden interpretarse considerando las presiones selectivas diferenciales que han podido actuar sobre cada una de ellas, en el contexto geográfico y evolutivo en el que ambas especies se enmarcan. Con todo ello, se pretende contribuir a testar la hipótesis planteada en la **Introducción** de este trabajo, relativa a si las especies presentes en ambientes más favorables exhiben una mayor capacidad de aclimatación y plasticidad fenotípica que especies más propias de climas mediterráneos, evaluando en este caso concreto cuál de los dos tipos de especies presenta mayor capacidad de respuesta frente a variaciones en el ambiente lumínico.

## **III.2. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos.**

### *III.2.1. Diseño experimental.*

El experimento descrito en este capítulo consistió básicamente en el seguimiento de variables relacionadas con el proceso de aclimatación a la luz y la fijación de carbono en individuos sometidos a dos irradiancias distintas de incubación. Fue llevado a cabo en el interior de una cámara de crecimiento *in vivo* de los Laboratorios del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén, bajo condiciones controladas descritas más adelante.

Para este experimento se emplearon individuos juveniles de ambas especies, que no sólo constituyen uno de los estadios vitales más vulnerables (Harper, 1977; Cook, 1979), sobre el que recae en gran parte la “responsabilidad” de los procesos de regeneración natural de los bosques que forman (Harper, 1977; Silvertown y Lovett-Doust, 1993; Castro *et al.* 2004), sino que también estos individuos son los más capaces *a priori* de mostrar cambios en respuesta a los tratamientos aplicados en los plazos de tiempo contemplados en el experimento. Por otro lado, el empleo de condiciones controladas, e incluso de individuos de procedencia similar y de algún modo también “controlada” permite evitar efectos confusos hallados en otros estudios, derivados de realizar comparaciones usando amplios rangos de condiciones ambientales y/o distintos genotipos (Balaguer *et al.* 2001).

En lo que respecta a los niveles de irradiancia empleados en el experimento, es de destacar que limitaciones logísticas impidieron simular las condiciones de irradiancia propias de los huecos naturales del dosel forestal, lo que habría permitido de alguna manera comparar los resultados obtenidos en este experimento con los hallados para individuos juveniles de *A. pinsapo* localizados en huecos del dosel, y cuyo estudio se aborda mediante el trabajo de campo descrito en el **Capítulo 6**. No obstante, los niveles de irradiancia empleados –baja y “alta”– son similares a los registrados bajo dosel y en la zona de transición entre el dosel y el claro respectivamente, por lo que los resultados obtenidos pueden compararse con los hallados en individuos silvestres de pinsapo localizados en los microambientes de esas características. Además, los bajos niveles suministrados en el tratamiento a baja irradiancia, a diferencia de los propuestos en otros trabajos de investigación previos, pueden permitirnos extraer conclusiones valiosas sobre la tolerancia a la sombra de ambas especies (Walters & Reich, 1996).

Las características de la cámara *in vivo* empleada permitieron un control ajustado de las condiciones ambientales, que se mantuvieron constantes en todo momento, con una temperatura media alrededor de los 20 °C, una humedad relativa del aire en torno a un 50 - 60 % y un fotoperiodo de doce horas de luz y doce de oscuridad. Se controló además el nivel de humedad del sustrato en los contenedores, ajustándose el riego de los individuos asignados a ambos tratamientos, para garantizar un adecuado estatus hídrico a lo largo de todo el experimento (aproximadamente el 30%).

Dadas las dimensiones de la cámara, el porte de los individuos y el tiempo necesario para la toma de datos en un número suficiente de individuos de cada combinación de tratamientos, se optó por ejecutar el experimento en dos tandas: desde marzo de 2005 hasta enero de 2006 con individuos de *Abies pinsapo*, y desde marzo de 2006 hasta enero de 2007 con *Abies alba*.

Los individuos fueron asignados al azar, en un diseño completamente aleatorizado, a dos niveles de irradiancia diferentes: una irradiancia baja, de ca. 50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , y una irradiancia media de aproximadamente 500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Estos niveles de irradiancia se registraron en la zona apical de los individuos, encontrándose en ramas situadas en posiciones intermedias una irradiancia de 30–50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , en el tratamiento de baja irradiancia, y de 250–350  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en el tratamiento de irradiancia media (**Figura III.3**). Sin embargo, a la hora de tomar las medidas de intercambio gaseoso en los distintos tratamientos, se prefirió emplear niveles de irradiancia en torno a los 50 y los 500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  respectivamente, para asegurar un *input* energético suficiente para la fijación de C, en el primer caso, y para valores cercanos a la saturación de la tasa neta de fotosíntesis, sin alejarse demasiado de los valores de irradiancia de incubación, en el segundo, conforme a resultados previos obtenidos con la realización de curvas P–I. En adelante, estos tratamientos serán referidos como “baja irradiancia” (BI) y “alta irradiancia” (AI), para hacer más intuitivos los correspondientes análisis y gráficos de la **Sección III.3** (Resultados) y facilitar así su comprensión.

La irradiancia incidente, procedió de tubos fluorescentes convencionales, en el tratamiento de baja irradiancia, y de lámparas de haluro metálico acopladas a focos halógenos, en el tratamiento de alta irradiancia (**Figura III.3**). Se emplearon lámparas y tubos nuevos al inicio del experimento en cada ocasión, para evitar que su decaimiento hiciese variar la cantidad de irradiancia suministrada.



**Figura III.3.** Individuos de *A. pinsapo* en la cámara *in vivo* bajo el tratamiento de “alta” irradiancia.

Los individuos fueron rotados al azar dentro de cada tratamiento de irradiancia, cada 4 ó 5 días aproximadamente durante los diez meses que duró el experimento, al objeto de evitar los posibles efectos derivados de la posición de los individuos en el interior de la cámara. De todos los individuos asignados a cada tratamiento, la mitad permanecieron en el mismo diez meses, hasta el final del experimento; la otra mitad fueron cambiados de un tratamiento de irradiancia al otro transcurridos seis meses desde el inicio del experimento, al objeto de detectar una potencial reversión de los efectos derivados del tratamiento inicial (**Tabla III.1**).

### *III.2.2. Variables dependientes.*

Al objeto de conocer cómo se manifiesta en las especies empleadas el proceso de aclimatación a la luz, a lo largo del experimento se ha hecho un seguimiento de diversos aspectos a diferentes niveles, incluyendo las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua, la eficiencia fotosintética en la fijación de C y la tasa máxima de fotosíntesis (mediante la obtención de curvas fotosíntesis vs. irradiancia), los

patrones de reparto de biomasa, la composición del equipo pigmentario foliar, la discriminación de isótopos estables de C y la eficiencia en el uso del agua.

#### *III.2.2.1. Intercambio gaseoso.*

En el experimento se llevaron a cabo dos registros distintos relacionados con el intercambio gaseoso. Por un lado, se realizaron curvas fotosíntesis vs. irradiancia (curvas P–I), para la obtención de los distintos parámetros fotosintéticos, al inicio del experimento, y tras varios meses de incubación (ver **Tabla III.1**), en individuos adscritos a los dos tratamientos de irradiancia aplicados. También se registraron estas curvas P–I en individuos que, transcurridos seis meses desde el inicio del experimento, fueron cambiados de un tratamiento al otro, al objeto de saber si es posible revertir el proceso de aclimatación a la luz que podría haberse producido como consecuencia de la incubación durante ese periodo de tiempo. El procedimiento para la realización de estas curvas P–I se detalla en la **Sección II.3.6.2** del capítulo dedicado a “Material y Métodos”. La irradiancia incidente en los distintos niveles, así como los tiempos de preincubación previos a las medidas se muestran en la **Tabla III.2**. El cálculo de los distintos parámetros fotosintéticos mediante el ajuste de los datos a la ecuación propuesta por Avola *et al.* (2008) también se describe en la citada **Sección II.3.6.2**.

Por otro lado, se midieron las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua en 8–10 individuos seleccionados al azar dentro de cada uno de los tratamientos, al objeto de conseguir una visión de conjunto del estado en el que se encontrasen ambos grupos de individuos. Estas medidas se tomaron en tramos correspondientes a un año de edad (acículas maduras), bajo los niveles de PAR previstos, cada nueve días aproximadamente durante aproximadamente 6 meses. Para su registro, se empleó un IRGA portátil, cuya descripción y funcionamiento se detallan también en la **Sección II.3.6.1** del **Capítulo 2**.

#### *III.2.2.2. Patrones de distribución de biomasa.*

Se determinó el patrón de inversión de recursos, estimado a partir de la distribución de biomasa en distintos compartimentos en los individuos juveniles de ambas especies anteriormente descritos, al inicio del experimento y al final del mismo (**Tabla III.1**), y se calcularon los ratios NPT/PT y SLA en los distintos individuos. La descripción de

cómo se tomaron los datos necesarios para el cálculo de las distintas variables y ratios se encuentra en la **Sección II.3.1 del Capítulo 2**, dedicado a “Material y Métodos”.

**Tabla III.1.** Momentos de obtención de curvas P-I y de determinación de los patrones de distribución de biomasa a lo largo del experimento. “BI”: tratamiento de baja irradiancia; “AI”: alta irradiancia; “BI → AI”: individuos sometidos a 6 meses de BI y 4 de AI; “AI → BI”: individuos sometidos a 6 meses de AI y 4 de BI. Ver explicación en el texto).

	<b>Tiempo de incubación</b>	<b>n° réplicas</b>
<b>Curvas P-I</b>	0 meses	n = 7
	2 meses	n = 3 (BI) n = 3 (AI)
	10 meses	n = 3 (BI) n = 3 (AI) n = 3 (BI → AI) n = 3 (AI → BI)
<b>Patrón de asignación de recursos</b>	0 meses	n = 5
	10 meses	n = 3 (BI) n = 3 (AI)

**Tabla III.2.** Niveles de irradiancia incidente ( $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y tiempos de preincubación dentro de cada nivel, empleados en la obtención de las curvas P-I.

<b>Irradiancia incidente</b>	<b>Tiempo de preincubación</b>
0	15'
30	5'
60-75	5'
100-125	5'
175-200	5'
300-350	5'
500	5'
700	5'
900	5'
1100-1200	5'

*III.2.2.3. Composición foliar en pigmentos y discriminación de isótopos estables de carbono.*

Para evaluar la composición del equipo pigmentario y la discriminación de isótopos estables de carbono, se tomaron muestras de tejido foliar al inicio del experimento (acículas maduras, de 1 año de edad), y una vez transcurridos dos y cinco meses, en

acículas maduras y nuevas, a partir de brotes cuya elongación tuvo lugar en el transcurso del experimento. La descripción detallada de cómo se procedió para la obtención de esta información se recoge en las **Secciones II.3.4** y **II.3.7** del capítulo dedicado a “Material y Métodos”.

### *III.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.*

Para las medidas de intercambio gaseoso tomadas en un subconjunto de individuos del total sometido a cada tratamiento de irradiancia, se optó por analizar estadísticamente los datos recogidos mediante un ANOVA de medidas repetidas, dado que, a pesar de no tratarse de pseudorréplicas *sensu stricto*, pues se tomaron en cada caso 8–10 individuos al azar de un total de 12 (en el caso de *A. alba*) o 18 individuos (en el caso de *A. pinsapo*), se trataba de un número notable de individuos similares entre sí sometidos al mismo tratamiento de irradiancia durante un largo periodo de tiempo, además de que lógicamente interesaba tener en cuenta especialmente el efecto del tiempo en la toma de estas medidas. Así, la existencia de diferencias entre especies, tratamientos de irradiancia y los distintos momentos del tiempo, en lo que respecta a las distintas variables relativas al intercambio gaseoso consideradas, se evaluó mediante un GLM (*General Linear Model*), en el que se consideraron como variables predictoras las especies y los tratamientos de irradiancia, y como variables dependientes, los datos registrados de cada variable en distintas fechas, seguido del test *post-hoc* de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*). De forma previa, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos, mediante el test de Kolmogorov–Smirnov y el test de homogeneidad de las varianzas de Cochran, respectivamente. En caso de que los datos no cumplieren alguno de ellos, se procedió a la transformación de los datos. Para todos los análisis estadísticos se empleó el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 1984-2004). El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95%.

Para el caso de los parámetros fotosintéticos calculados a partir de las distintas curvas P–I obtenidas, la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de irradiancia y entre distintos momentos del tiempo se evaluó mediante un GLM seguido del test *a posteriori* de Tukey HSD. Posteriormente, se realizó el mismo tipo de análisis sobre los datos obtenidos para cada una de las especies por separado. También se efectuó este mismo tipo de análisis para la detección de diferencias entre individuos de cada especie que hubiesen permanecido en un mismo tratamiento de

irradiancia a lo largo de todo el experimento, o que hubiesen sido “traspasados” al otro tratamiento de irradiancia.

En lo referente a las distintas variables calculadas para la descripción de los patrones de asignación de recursos, la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de irradiancia y entre distintos momentos del tiempo se evaluó mediante un GLM, seguido del test *post-hoc* de Tukey HSD. Como en el caso anterior, las diferencias entre momentos del tiempo y tratamientos de irradiancia dentro de una misma especie, se evaluaron igualmente mediante un GLM seguido del test de Tukey HSD. Para evaluar la existencia de diferencias interespecíficas en lo relativo a los ratios NPT/PT y SLA, se optó por efectuar un ANOVA de 1 vía, seguido de un *test a posteriori* Tukey HSD

En el caso de los pigmentos fotosintéticos, los distintos análisis estadísticos se efectuaron sobre los datos obtenidos para cada especie por separado, dado que, en primer lugar, el procesamiento y análisis de las distintas muestras se efectuó mediante procedimientos ligeramente distintos en cada especie, y en segundo lugar porque este hecho impidió que pudiesen detectarse el mismo número y tipo de pigmentos en ambas especies. Además, se diferenció entre muestras de tejido foliar de distinta “edad”. En cualquier caso, la existencia de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos y los distintos momentos del tiempo se evaluó mediante un GLM seguido del test de Tukey HSD, como en anteriores ocasiones. Las diferencias entre especies, y entre las distintas edades del tejido foliar en lo que respecta a la concentración con que aparecieron los distintos pigmentos se exploraron mediante un ANOVA de 1 vía, seguido de un test Tukey HSD.

En lo que respecta a la discriminación de isótopos estables de carbono, los análisis realizados para la detección de diferencias derivadas de la incubación a ambos tratamientos de irradiancia se realizaron en primer lugar sobre el conjunto de datos obtenidos para ambas especies, aunque diferenciando entre muestras de tejido foliar de distinta edad. La existencia de diferencias entre especies, tratamientos de irradiancia y momentos del tiempo nuevamente se evaluó mediante un GLM seguido de un test *post-hoc* de Tukey. Posteriormente, se efectuaron análisis del mismo tipo sobre cada una de las especies por separado. Las diferencias detectadas entre muestras de tejido foliar de distinta edad se evaluaron asimismo aplicando un ANOVA de 1 vía, seguido del test Tukey HSD. En todos estos análisis, el nivel de significación quedó nuevamente fijado en el 95%.

### III.3. Resultados.

#### III.3.1. Variables relacionadas con el intercambio gaseoso.

##### III.3.1.1. Tasas instantáneas de fotosíntesis neta potencial y de conductancia estomática al agua. Eficiencia en el uso del agua y de la luz.

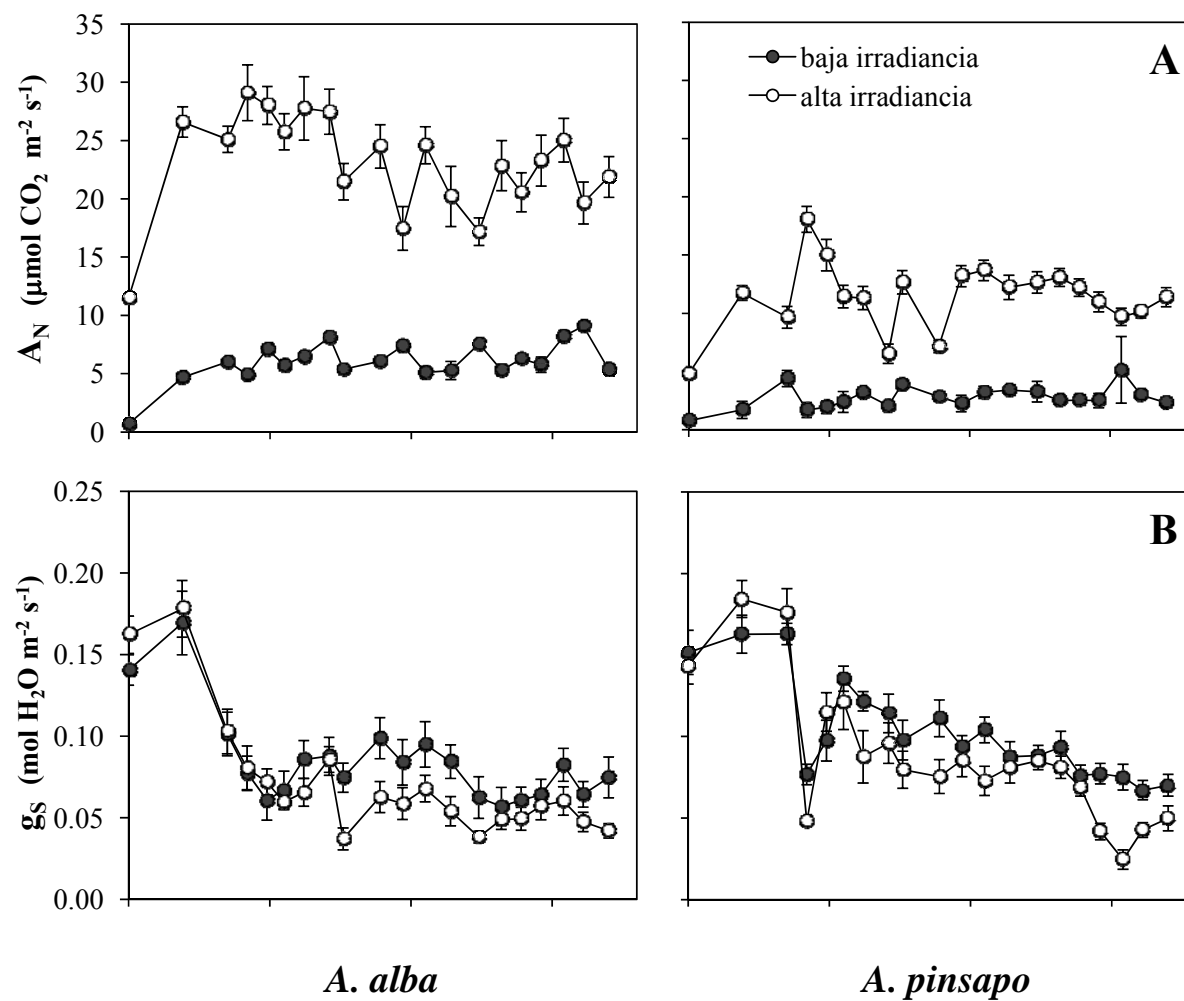
Los resultados de los análisis estadísticos realizados para la detección de diferencias significativas en los registros temporales de las tasas de fotosíntesis neta y conductancia estomática al agua se muestran en la **Tabla III.3**. En ambos tratamientos de irradiancia se registraron valores particularmente altos de fotosíntesis neta, en consonancia con los altos niveles de CO<sub>2</sub> existentes en la cámara en el momento de tomar estas medidas (alrededor de 1200 ppm en valores promedio). No obstante, y como era de esperar, los mayores valores de esta tasa de fotosíntesis neta “potencial” se registraron en el tratamiento a alta irradiancia, en ambas especies (**Figura III.4**). Se hallaron diferencias significativas entre especies y entre tratamientos de irradiancia, así como derivadas del paso del tiempo. En lo que respecta a la tasa de conductancia estomática al agua, se hallaron asimismo diferencias entre especies, tratamientos de irradiancia y derivadas del tiempo de incubación (**Tabla III.3**). Los mayores valores de esta variable se registraron en *A. pinsapo*. Con el paso del tiempo, se produjo en ambos tratamientos una disminución de esta variable. Las diferencias entre tratamientos de irradiancia, puntuales, derivaron de las mayores tasas de conductancia estomática registradas en el tratamiento a baja irradiancia.

En lo que respecta al ratio entre la tasa de fotosíntesis neta “potencial” y la de conductancia estomática al agua (eficiencia “potencial en el uso del agua”), se hallaron igualmente diferencias significativas entre especies y tratamientos de irradiancia, y debidas al tiempo de incubación (**Tabla III.3**). La mayor eficiencia en el uso del agua se halló en *A. alba*, en ambos tratamientos (**Figura III.5**). Este ratio fue asimismo muy superior en el tratamiento a alta irradiancia, como consecuencia de las altas tasas de fotosíntesis potencial observadas en este tratamiento, y las menores tasas de conductancia estomática registradas en paralelo. Con el tiempo, se produjo un incremento en la eficiencia en el uso del agua, particularmente evidente en *A. alba*. Finalmente, para la eficiencia en el uso de la luz (el ratio entre las tasas de fotosíntesis

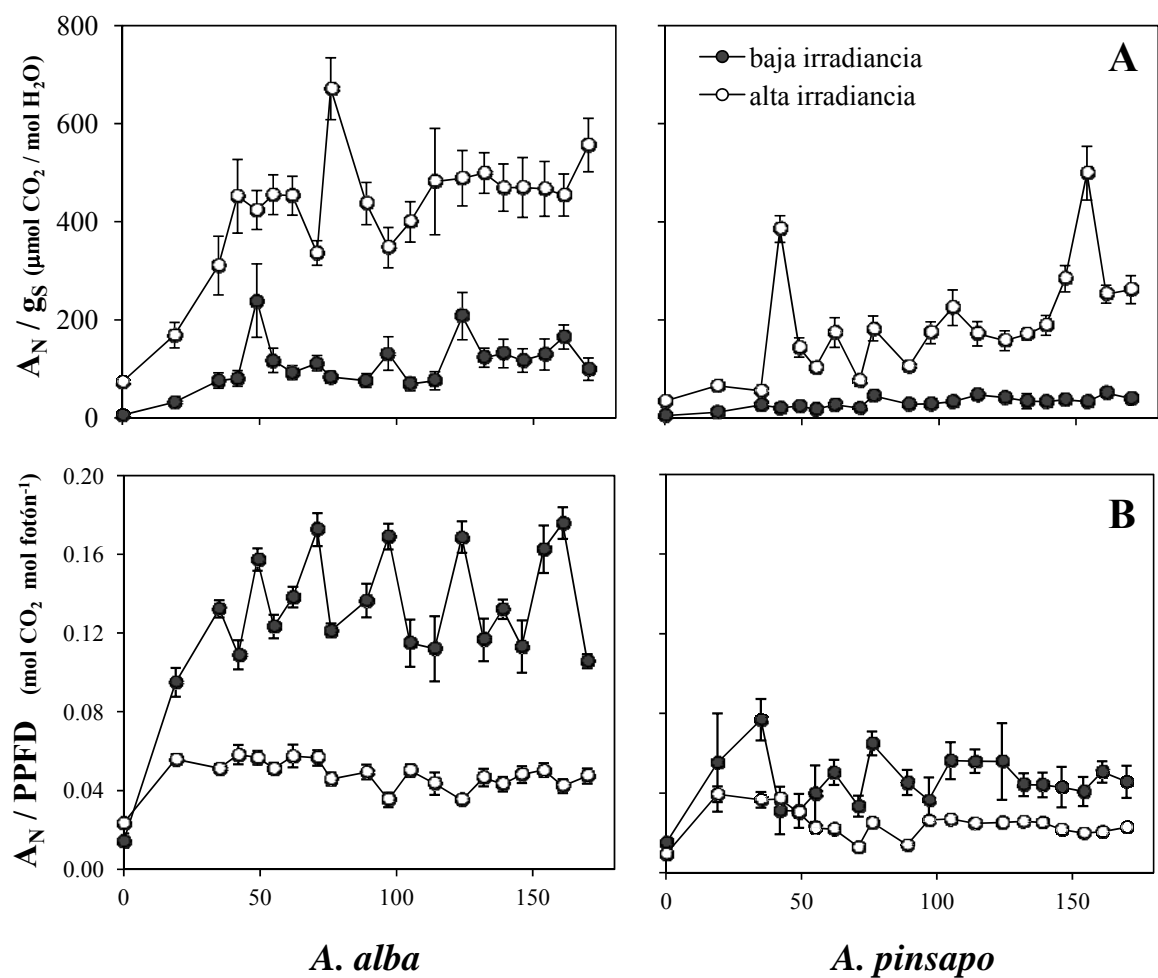
potencial y de irradiancia PAR registrada en paralelo), se hallaron diferencias significativas para los principales efectos considerados, así como para el efecto “especie x tratamiento de irradiancia” (**Tabla III.3**). Así, entre tratamientos, los mayores valores de este ratio se observaron a baja irradiancia, siendo estas diferencias mucho menos evidentes en *A. pinsapo*. Entre especies, los mayores valores de eficiencia en el uso de la luz se hallaron en *A. alba*, en ambos tratamientos (**Figura III.5**).

**Tabla III.3.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre ambas especies, los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ ), la tasa instantánea de conductancia estomática al agua ( $g_s$ ), y los ratios entre la tasa de fotosíntesis y la conductancia estomática, y entre la tasa de fotosíntesis y la irradiancia PAR registrada en paralelo. Para ello se consideraron los datos registrados en individuos de *Abies pinsapo* y de *Abies alba* en sendos experimentos (ANOVA de medidas repetidas considerando como factores las especies y los tratamientos de irradiancia, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	$A_N$	$g_s$	$A_N / g_s$	$A_N / \text{PPFD}$
Especie	447.76 (1) <b>0.000*</b>	17.64 (1) <b>0.000*</b>	302.45 (1) <b>0.000*</b>	813.01(1) <b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia	1562.74 (1) <b>0.000*</b>	9.03 (1) <b>0.005*</b>	746.99 (1) <b>0.000*</b>	704.49 (1) <b>0.000*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	0.32 (1) 0.575	0.107 (1) 0.746	1.70 (1) 0.203	239.06 (1) <b>0.000*</b>
Tiempo de incubación	18.55 (19) <b>0.000*</b>	38.36 (19) <b>0.000*</b>	39.84 (1) <b>0.000*</b>	10.62 (19) <b>0.000*</b>
Tiempo de incubación x especie	5.42 (19) <b>0.000*</b>	5.73 (19) <b>0.000*</b>	4.32 (19) <b>0.000*</b>	6.06 (19) <b>0.000*</b>
Tiempo de incubación x tratamiento de irradiancia	7.09 (19) <b>0.000*</b>	2.92 (19) <b>0.000*</b>	4.33 (19) <b>0.000*</b>	7.18 (19) <b>0.000*</b>
Tiempo de incubación x especie x tratamiento de irradiancia	3.87 (19) <b>0.000*</b>	0.81 (19) 0.695	2.97 (19) <b>0.000*</b>	4.50 (19) <b>0.000*</b>



**Figura III.4.** Evolución temporal de las tasas de fotosíntesis neta (A) y de conductancia estomática al agua (B) registradas en individuos de ambas especies sometidos a los tratamientos de irradiancia de incubación previstos en el experimento.



**Figura III.5.** Evolución temporal del ratio entre las tasas de fotosíntesis neta y las tasas de conductancia estomática al agua (A), y entre las tasas de fotosíntesis y los niveles de PAR (B) registrados durante la realización del experimento en individuos de ambas especies sometidos a los tratamientos de irradiancia de incubación previstos.

### III.3.1.2. Curvas fotosíntesis – irradiancia.

Las curvas P–I se obtuvieron en al menos tres individuos de cada especie y tratamiento de luz, en tres momentos distintos del tiempo: al inicio del experimento, transcurridos dos meses y al final del experimento, ocho meses más tarde. Los parámetros fotosintéticos fueron calculados mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación mencionada en el capítulo dedicado a “Material y Métodos” (ver **Sección II.3.6.2**).

Un primer análisis conjunto de los resultados obtenidos acerca de la evolución temporal experimentada por estos parámetros puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre ambas especies, halladas en la mayoría de las comparaciones efectuadas (**Tabla III.4, Figura III.6**), además de mostrar diferencias significativas en el tiempo. Pero el hecho de disponer, casi siempre, de datos heterocedásticos, posiblemente a causa de la existencia de estas diferencias, obligó a realizar los análisis estadísticos por separado para cada una de las especies.

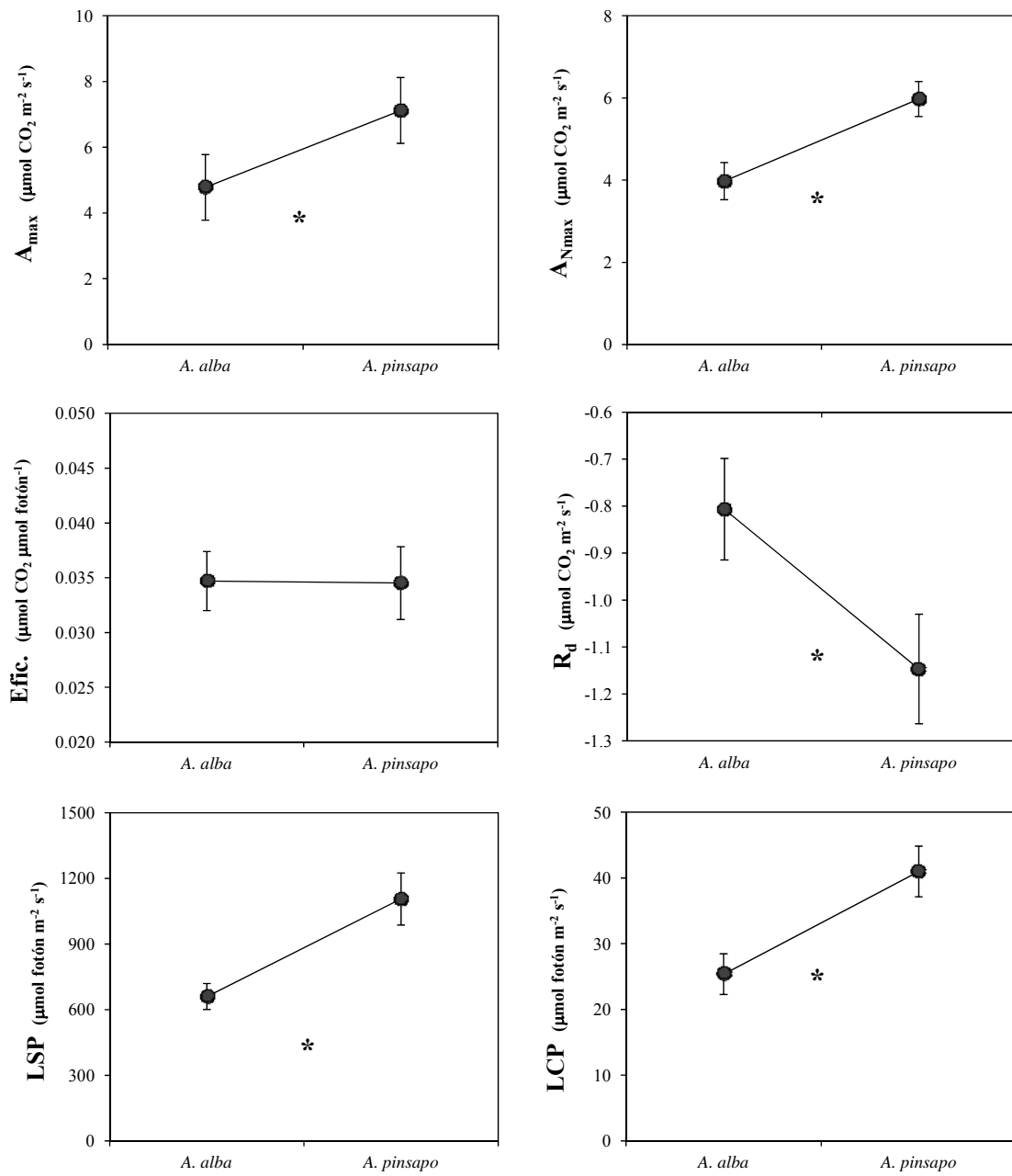
En cualquier caso, estos resultados preliminares muestran, para el caso de *A. pinsapo*, mayores tasas de fotosíntesis neta máxima y potencial, y mayores tasas de respiración en oscuridad, que en el caso de *A. alba*. Consecuentemente, *A. pinsapo* fue la especie que alcanzó el punto de compensación para la luz y el punto de saturación a mayores niveles de irradiancia. En lo que respecta a la eficiencia lumínica aparente mostrada por ambas especies, no se hallaron diferencias significativas.

Los análisis que se llevaron a cabo posteriormente, en los cuales se consideró cada una de las especies por separado, se realizaron no sólo con el objeto de conocer la evolución temporal de los distintos parámetros calculados; también se ejecutaron para conocer el efecto que, sobre un grupo de individuos de cada tratamiento de irradiancia, tuvo el hecho de que, mediado el experimento, fuesen “traspasados” de un tratamiento de irradiancia al otro, para evaluar en qué medida es posible revertir el proceso de aclimatación que se hubiese iniciado en cada caso. Estos análisis pusieron de manifiesto, por un lado, que las únicas diferencias significativas halladas se debieron al efecto del tiempo, sin que en ningún caso pudiesen atribuirse a los distintos tratamientos de irradiancia aplicados (**Tablas III.5 y III.6, Figuras III.7, III.8 y III.9**). Por otro lado, y en lo referente al efecto del cambio de un tratamiento de irradiancia al otro, cabe destacar que no se halló diferencia alguna en el caso de *A. alba* (**Tabla III.7**), mientras que sí se hallaron en el caso de *A. pinsapo* (**Tabla III.8**). Así, las variables sobre las que

sí tuvo efecto fueron las relacionadas con las tasas de fotosíntesis neta máxima y potencial, y los valores de irradiancia a los que se alcanzó el punto de saturación y el punto de compensación para la luz, aunque los análisis *a posteriori* sólo confirmaron las diferencias halladas para el punto de saturación para la luz (**Tabla III.8**).

**Tabla III.4.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre especies, tratamientos de irradiancia y momentos de tiempo considerados en el experimento, considerando como variables la tasa máxima de fotosíntesis,  $A_{max}$ , la tasa máxima de fotosíntesis neta,  $A_{Nmax}$ , la eficiencia lumínica,  $Q_{app}$ , la tasa de respiración en oscuridad,  $R_d$ , el punto de saturación para la luz, LSP, y el punto de compensación para la luz, LCP, encontrados en individuos de ambas especies (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *post-hoc* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de  $p$ . En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	$A_{max}$	$A_{Nmax}$	$Q_{app}$	$R_d$	LSP	LCP
Especie	28.15 (1)	24.15 (1)	3.66 (1)	10.17 (1)	13.71 (1)	7.93 (1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.064	<b>0.003*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.008*</b>
Tratamiento de irradiancia	0.39 (1)	0.09 (1)	0.19 (1)	1.43 (1)	0.00 (1)	0.97 (1)
	0.538	0.762	0.663	0.239	0.993	0.331
Tiempo de incubación	20.36 (2)	22.40 (2)	2.81 (2)	2.34 (2)	28.21 (2)	6.78 (2)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.074	0.112	<b>0.000*</b>	<b>0.003*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	0.53 (1)	0.80 (1)	0.51 (1)	0.05 (1)	0.52 (1)	0.11 (1)
	0.471	0.376	0.481	0.821	0.474	0.747
Especie x tiempo de incubación	9.46 (2)	6.70 (2)	22.99 (2)	7.35 (2)	4.60 (2)	1.11 (2)
	<b>0.001*</b>	<b>0.004*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.002*</b>	<b>0.017*</b>	0.340
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.15 (2)	0.10 (2)	1.68 (2)	0.48 (2)	0.44 (2)	0.43 (2)
	0.860	0.901	0.202	0.624	0.649	0.653
Especie x tratamiento irradiancia x tiempo de incubación	0.48 (2)	0.52 (2)	0.21 (2)	0.13 (2)	0.21 (2)	0.03 (2)
	0.621	0.600	0.811	0.874	0.808	0.968



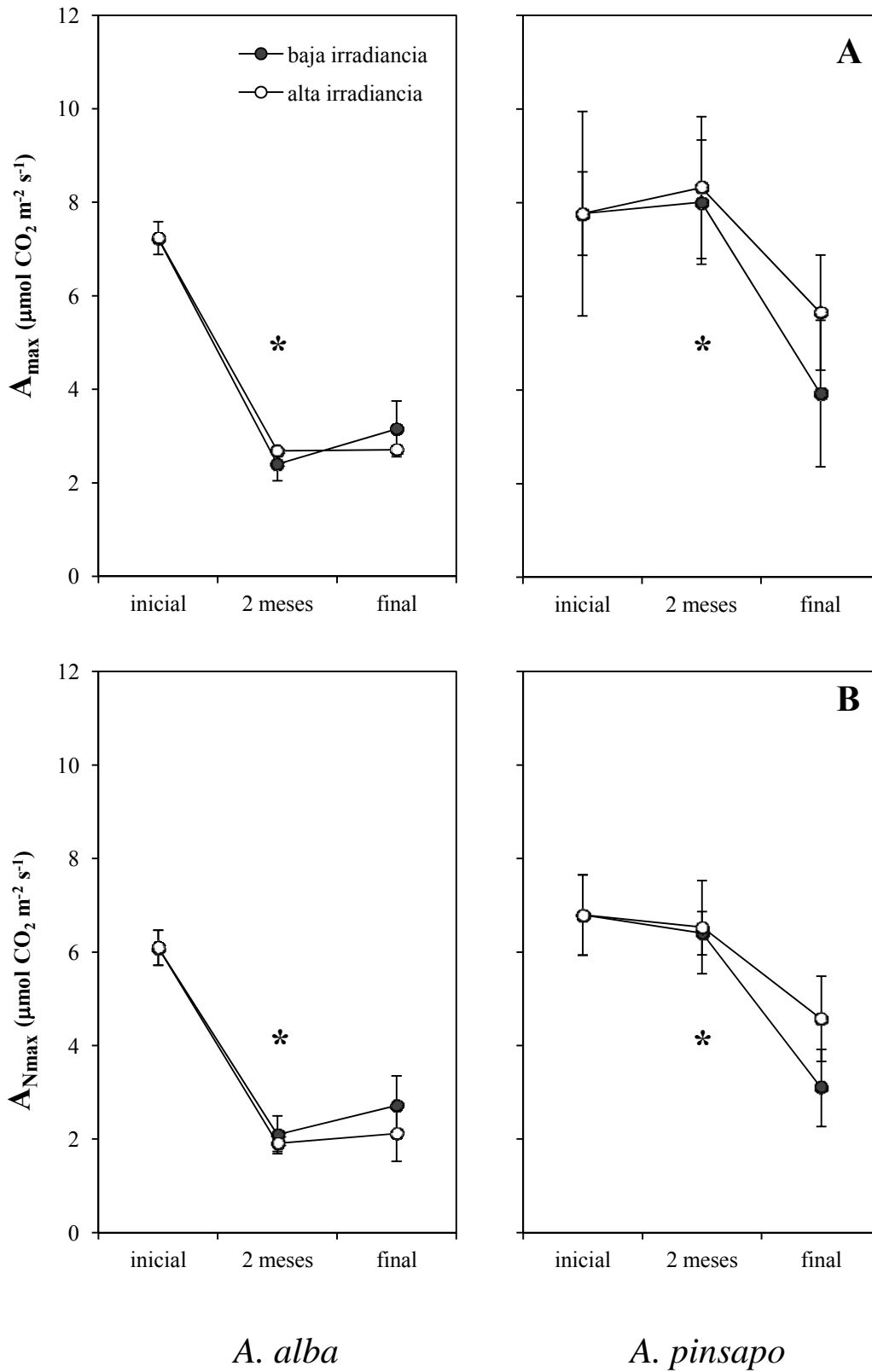
**Figura III.6.** Promedio de los distintos parámetros fotosintéticos calculados para los individuos de ambas especies que participaron en el experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre ambas especies.

**Tabla III.5.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables, la tasa máxima de fotosíntesis,  $A_{\max}$ , la tasa máxima de fotosíntesis neta,  $A_{N\max}$ , la eficiencia lumínica,  $Q_{\text{app}}$ , la tasa de respiración en oscuridad,  $R_d$ , el punto de saturación para la luz, LSP, y el punto de compensación para la luz, LCP, encontrados en individuos de *A. alba*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

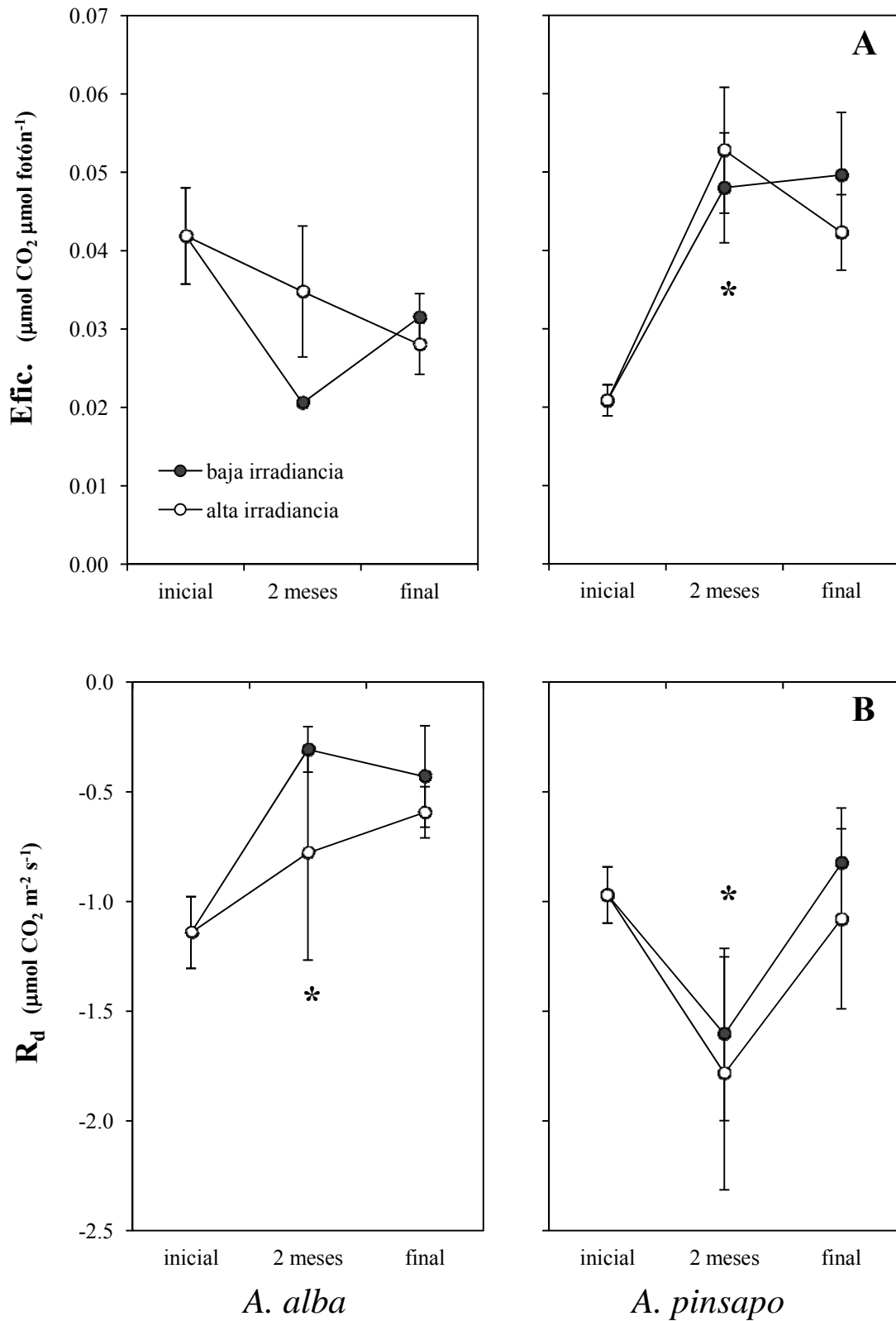
efecto	$A_{\max}$	$A_{N\max}$	$Q_{\text{app}}$	$R_d$	LSP	LCP
Tratamiento de irradiancia	0.02 (1) 0.890	0.51 (1) 0.486	0.52 (1) 0.481	1.26 (1) 0.278	0.60 (1) 0.449	0.96 (1) 0.341
Tiempo de incubación	72.99 (2) <b>0.000*</b>	58.57 (2) <b>0.000*</b>	3.71 (2) <b>0.047</b>	5.57 (2) <b>0.015*</b>	11.84 (2) <b>0.001*</b>	1.74 (2) 0.208
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.27 (2) 0.770	0.24 (2) 0.788	1.06 (2) 0.368	0.57 (2) 0.579	0.39 (2) 0.685	0.36 (2) 0.703

**Tabla III.6.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables, la tasa máxima de fotosíntesis,  $A_{\max}$ , la tasa máxima de fotosíntesis neta,  $A_{N\max}$ , la eficiencia lumínica,  $Q_{\text{app}}$ , la tasa de respiración en oscuridad,  $R_d$ , el punto de saturación para la luz, LSP, y el punto de compensación para la luz, LCP, encontrados en individuos de *A. pinsapo*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

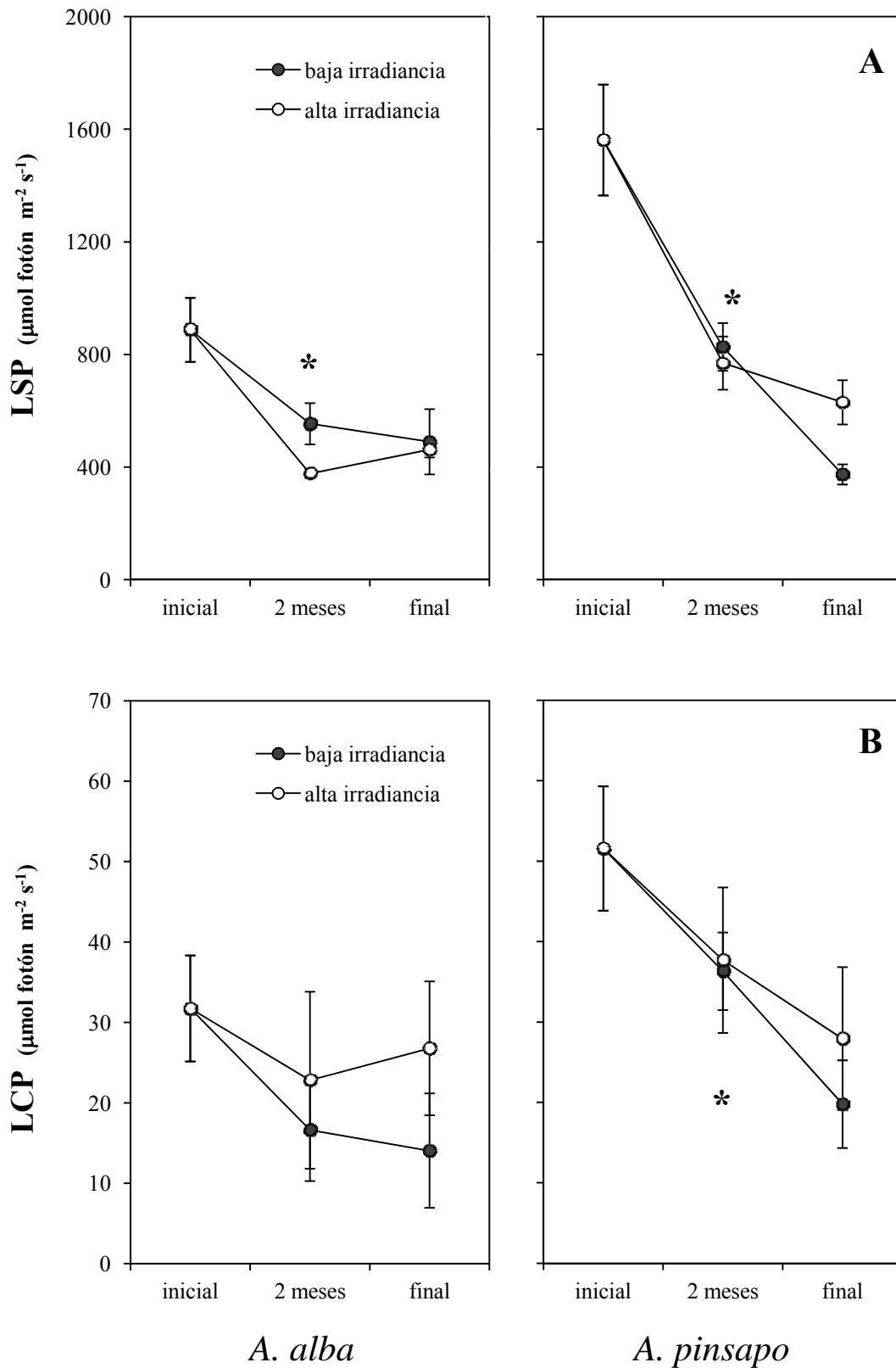
efecto	$A_{\max}$	$A_{N\max}$	$Q_{\text{app}}$	$R_d$	LSP	LCP
Tratamiento de irradiancia	0.57 (1) 0.460	0.46 (1) 0.506	0.05 (1) 0.828	0.40 (1) 0.533	0.17 (1) 0.682	0.20 (1) 0.660
Tiempo de incubación	5.04 (2) <b>0.018*</b>	5.50 (2) <b>0.014*</b>	28.27 (2) <b>0.000*</b>	4.34 (2) <b>0.029*</b>	19.11 (2) <b>0.000*</b>	5.91 (2) <b>0.011*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.35 (2) 0.709	0.35 (2) 0.712	0.70 (2) 0.509	0.13 (2) 0.875	0.32 (2) 0.729	0.13 (2) 0.883



**Figura III.7.** Evolución temporal experimentada por la tasa máxima de fotosíntesis (A) y por la tasa máxima de fotosíntesis neta (B), en individuos de ambas especies. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre distintos momentos del tiempo.



**Figura III.8.** Evolución temporal experimentada por la eficiencia lumínica aparente del proceso fotosintético (A) y la tasa de respiración en oscuridad (B). Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre distintos momentos del tiempo.



**Figura III.9.** Evolución temporal del punto de saturación para la luz (A) y del punto de compensación para la luz (B). Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre distintos momentos de tiempo.

**Tabla III.7.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables, la tasa máxima de fotosíntesis,  $A_{max}$ , la tasa máxima de fotosíntesis neta,  $A_{Nmax}$ , la eficiencia lumínica,  $Q_{app}$ , la tasa de respiración en oscuridad,  $R_d$ , el punto de saturación para la luz, LSP, y el punto de compensación para la luz, LCP, encontrados en individuos de *A. alba*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia inicial y final experimentados por los individuos (baja irradiancia – baja irradiancia, baja – alta, alta – alta y alta – baja), seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En ningún caso se hallaron diferencias significativas.

efecto	$A_{max}$	$A_{Nmax}$	$Q_{app}$	$R_d$	LSP	LCP
Tratamiento de irradiancia inicial	1.27 (1) 0.292	1.04 (1) 0.338	0.45 (1) 0.522	0.00 (1) 0.992	2.06 (1) 0.188	0.03 (1) 0.877
Tratamiento de irradiancia final	1.18 (1) 0.310	0.45 (1) 0.522	0.00 (1) 0.958	1.10 (1) 0.325	0.33 (1) 0.582	0.95 (1) 0.359
Tratamiento inicial x tratamiento final	0.01 (1) 0.908	0.05 (1) 0.832	2.04 (1) 0.191	1.31 (1) 0.286	1.32 (1) 0.285	3.40 (1) 0.102

**Tabla III.8.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables, la tasa máxima de fotosíntesis,  $A_{max}$ , la tasa máxima de fotosíntesis neta,  $A_{Nmax}$ , la eficiencia lumínica,  $Q_{app}$ , la tasa de respiración en oscuridad,  $R_d$ , el punto de saturación para la luz, LSP, y el punto de compensación para la luz, LCP, encontrados en individuos de *A. pinsapo*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia inicial y final experimentados por los individuos (baja irradiancia – baja irradiancia, baja – alta, alta – alta y alta – baja), seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	$A_{max}$	$A_{Nmax}$	$Q_{app}$	$R_d$	LSP	LCP
Tratamiento de irradiancia inicial	0.51 (1) 0.496	0.06 (1) 0.806	3.71 (1) 0.090	1.93 (1) 0.202	1.95 (1) 0.200	1.12 (1) 0.322
Tratamiento de irradiancia final	1.44 (1) 0.265	3.10 (1) 0.116	0.68 (1) 0.435	0.54 (1) 0.485	7.60 (1) <b>0.025*</b>	0.80 (1) 0.397
Tratamiento inicial x tratamiento final	8.33 (1) <b>0.020</b>	6.18 (1) <b>0.038</b>	0.44 (1) 0.527	5.17 (1) 0.053	8.42 (1) <b>0.020*</b>	5.37 (1) <b>0.049</b>

### III.3.2. Variables morfológicas y patrones de asignación de recursos.

Los análisis estadísticos realizados sobre el conjunto de resultados obtenidos en ambas especies pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre especies, y debidas al tiempo de incubación, en la mayor parte de las variables consideradas, sin hallarse en ningún momento diferencias derivadas de la aplicación de los tratamientos de irradiancia previstos (**Tabla III.9**). Además de para estas variables, también se

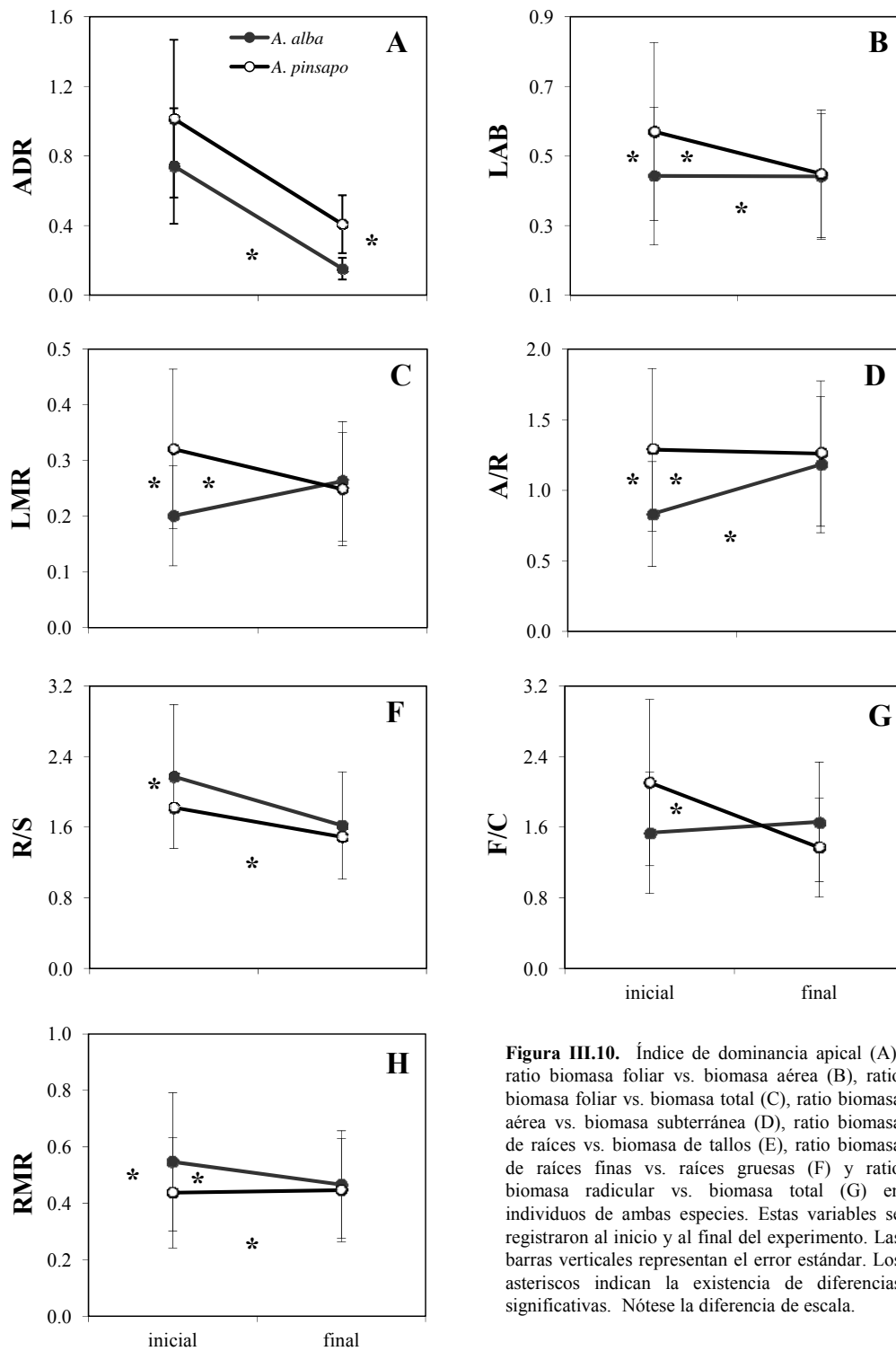
observaron diferencias entre especies en lo que respecta al ratio NPT/PT (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), obteniéndose en *A. alba* un valor de 4 frente a 2.125 hallado en *A. pinsapo*, en valores promedios. Asimismo, en esta última especie se halló un menor valor del ratio SLA - 2 frente a 2.37 hallado en *A. alba*, en valores promedios (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ). En *A. pinsapo* se hallaron los mayores valores de los ratios ADR, LAB, LMR y A/R, mientras que en *A. alba* se hallaron los mayores valores de R/S y de RMR (**Figura III.10**). Para el ratio F/C, únicamente se detectaron diferencias marginalmente significativas ( $p = 0.053$ ), observándose una mayor proporción de raíces finas en *A. pinsapo*.

Posteriormente, se llevaron a cabo estos mismos análisis en cada una de las especies por separado, para explorar la existencia de diferencias ligadas a los distintos tratamientos de irradiancia, que pudiesen haberse visto enmascaradas al considerar ambas especies conjuntamente. Así, en *Abies pinsapo* se hallaron diferencias significativas debidas al tiempo transcurrido y/o a la interacción “tratamiento de irradiancia x tiempo” (**Tabla III.11**), pero únicamente se hallaron diferencias entre ambos tratamientos de irradiancia para las variables LMR (mayor a baja irradiancia), A/R (ídem) y RMR (menor a baja irradiancia) (**Figura III.12**). Para el ratio entre la biomasa de raíces y de tallos (R/S) se hallaron únicamente diferencias marginalmente significativas ( $p = 0.056$ ), observándose un mayor valor de este ratio en el tratamiento a alta irradiancia. Con el paso del tiempo, tuvo lugar un descenso los índices ADR, LAB, LMR, R/S y F/C. RMR se incrementó a alta irradiancia y disminuyó a baja, al contrario que el ratio A/R.

En el caso de *Abies alba*, no se hallaron diferencias significativas entre los individuos adscritos a uno u otro tratamiento, detectándose únicamente diferencias significativas debidas al tiempo de incubación, en cinco de los índices considerados (**Tabla III.10**). Así, tuvo lugar una disminución de ADR, R/S y RMR, y un incremento tanto de LMR como de A/R (**Figura III.11**).

**Tabla III.9.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los distintos momentos del tiempo y los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables el índice de dominancia apical (ADR), el ratio entre la biomasa foliar y el total de biomasa aérea (LAB), el ratio entre la biomasa foliar y el total de biomasa de cada individuo (LMR), el ratio entre la biomasa aérea y la biomasa subterránea (A/R), el ratio entre la biomasa de raíces y de tallos (R/S), el ratio entre la biomasa de raíces finas y la de raíces gruesas (F/C) y el ratio entre la biomasa de raíces y el total de biomasa (RMR), en individuos de ambas especies. Todos los parámetros referidos a la biomasa de distintos compartimentos se han calculado sobre el peso seco (DW) de éstos. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	ADR	LAB	LMR	A/R	R/S	F/C	RMR
Especie	22.77	87.61	53.11	20.42	5.06	0.75	21.63
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.034*</b>	0.394	<b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia	1.37	0.00	2.14	2.79	1.84	1.22	2.37
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	0.253	0.972	0.156	0.108	0.187	0.280	0.137
Tiempo de incubación	117.51	72.18	0.49	7.48	16.95	3.78	6.59
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.490	<b>0.012*</b>	<b>0.000*</b>	0.064	<b>0.017*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	1.24	0.90	1.99	2.43	0.39	0.24	1.49
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	0.276	0.352	0.172	0.132	0.536	0.630	0.234
Especie x tiempo de incubación	0.02	69.48	85.82	10.18	1.04	7.42	10.43
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	0.886	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.004*</b>	0.317	<b>0.012*</b>	<b>0.004*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	1.37	0.00	2.14	2.79	1.84	1.22	2.37
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	0.253	0.972	0.156	0.108	0.187	0.280	0.137
Especie x tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	1.24	0.90	1.99	2.43	0.39	0.24	1.49
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
	0.276	0.352	0.172	0.132	0.536	0.630	0.234



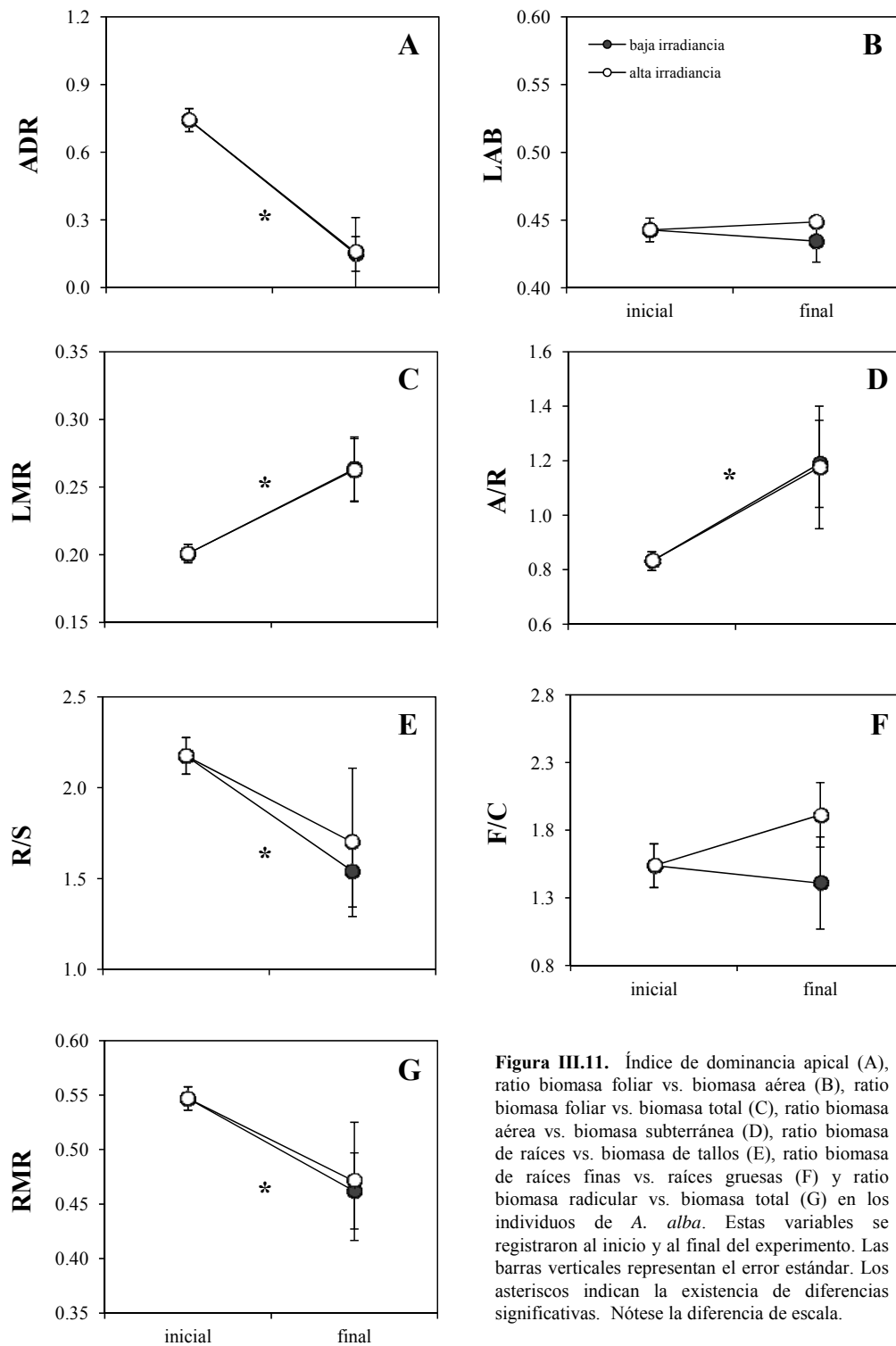
**Figura III.10.** Índice de dominancia apical (A), ratio biomasa foliar vs. biomasa aérea (B), ratio biomasa foliar vs. biomasa total (C), ratio biomasa aérea vs. biomasa subterránea (D), ratio biomasa de raíces vs. biomasa de tallos (E), ratio biomasa de raíces finas vs. raíces gruesas (F) y ratio biomasa radicular vs. biomasa total (G) en individuos de ambas especies. Estas variables se registraron al inicio y al final del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas. Nótese la diferencia de escala.

**Tabla III.10.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables el índice de dominancia apical (ADR), el ratio entre la biomasa foliar y el total de biomasa aérea (LAB), el ratio entre la biomasa foliar y el total de biomasa de cada individuo (LMR), el ratio entre la biomasa aérea y la biomasa subterránea (A/R), el ratio entre la biomasa de raíces y de tallos (R/S), el ratio entre la biomasa de raíces finas y la de raíces gruesas (F/C) y el ratio entre la biomasa de raíces y el total de biomasa (RMR), en los individuos de *A. alba*. Todos los parámetros referidos a la biomasa de distintos compartimentos se han calculado sobre el peso seco (DW) de éstos. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

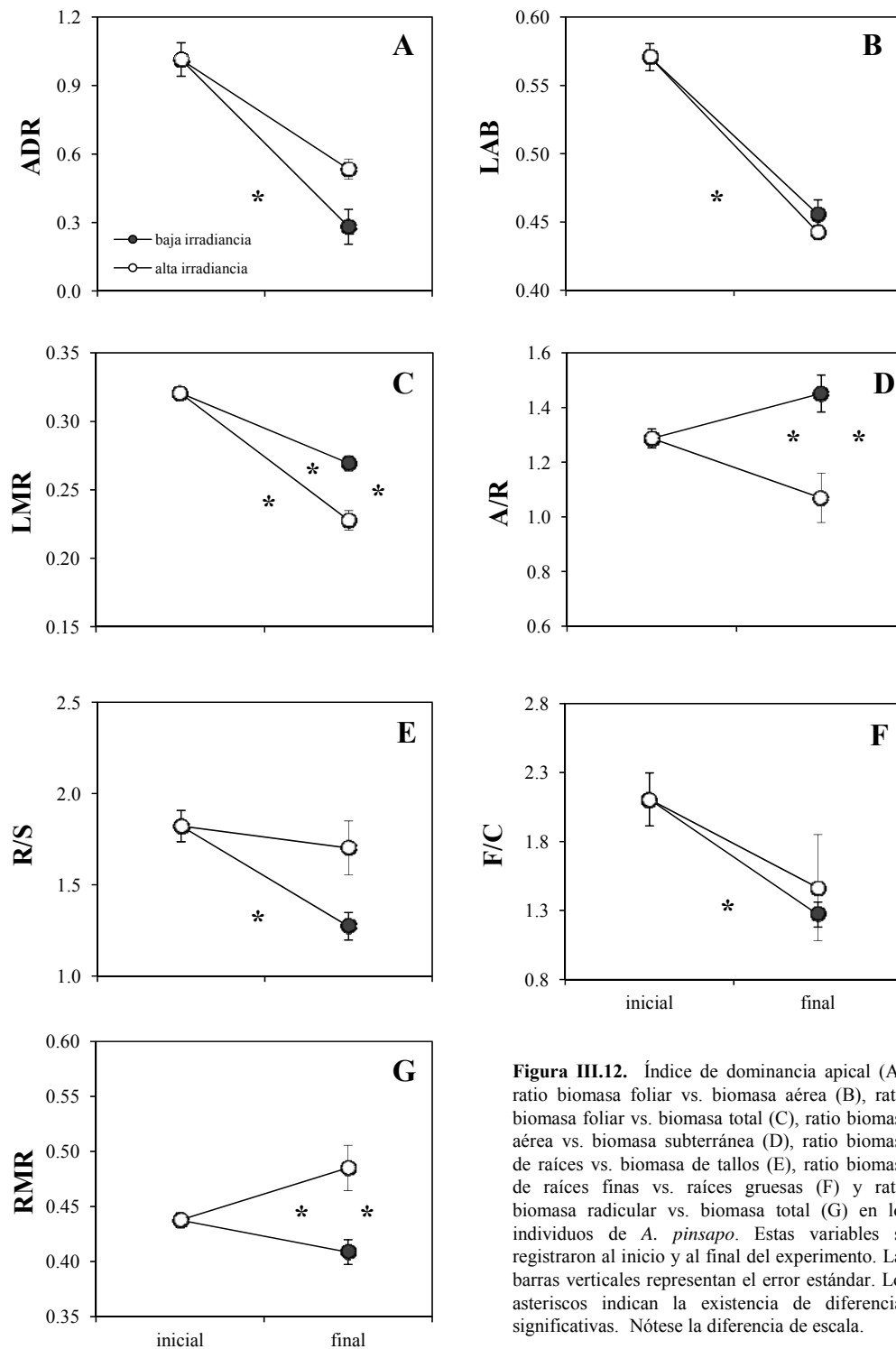
efecto	ADR	LAB	LMR	A/R	R/S	F/C	RMR
Tratamiento de irradiancia	0.00 (1) 0.970	0.49 (1) 0.498	0.00 (1) 0.977	0.00 (1) 0.952	0.26 (1) 0.621	1.37 (1) 0.264	0.03 (1) 0.865
Tiempo de incubación	54.82 (1) <b>0.000*</b>	0.01 (1) 0.911	21.34 (1) <b>0.000*</b>	10.93 (1) <b>0.006*</b>	6.57 (1) <b>0.025*</b>	0.33 (1) 0.577	9.85 (1) <b>0.009*</b>
Tratamiento de irradiancia	0.00 (1)	0.49 (1)	0.00 (1)	0.00 (1)	0.26 (1)	1.37 (1)	0.03 (1)
x tiempo de incubación	0.970	0.498	0.977	0.952	0.621	0.264	0.865

**Tabla III.11.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables el índice de dominancia apical (ADR), el ratio entre la biomasa foliar y el total de biomasa aérea (LAB), el ratio entre la biomasa foliar y el total de biomasa de cada individuo (LMR), el ratio entre la biomasa aérea y la biomasa subterránea (A/R), el ratio entre la biomasa de raíces y de tallos (R/S), el ratio entre la biomasa de raíces finas y la de raíces gruesas (F/C) y el ratio entre la biomasa de raíces y el total de biomasa (RMR), en los individuos de *A. pinsapo*. Todos los parámetros referidos a la biomasa de distintos compartimentos se han calculado sobre el peso seco (DW) de éstos. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	ADR	LAB	LMR	A/R	R/S	F/C	RMR
Tratamiento de irradiancia	2.73 (1) 0.124	0.41 (1) 0.533	19.07 (1) <b>0.001*</b>	13.21 (1) <b>0.003*</b>	4.46 (1) 0.056	0.18 (1) 0.681	12.91 (1) <b>0.004*</b>
Tiempo de incubación	63.08 (1) <b>0.000*</b>	140.25 (1) <b>0.000*</b>	229.62 (1) <b>0.000*</b>	0.26 (1) 0.618	10.83 (1) <b>0.006*</b>	10.16 (1) <b>0.008*</b>	0.75 (1) 0.404
Tratamiento de irradiancia	2.73 (1)	0.41 (1)	19.07 (1)	13.21 (1)	4.46 (1)	0.18 (1)	12.91 (1)
x tiempo de incubación	0.124	0.533	<b>0.001*</b>	<b>0.003*</b>	0.056*	0.681	<b>0.004*</b>



**Figura III.11.** Índice de dominancia apical (A), ratio biomasa foliar vs. biomasa aérea (B), ratio biomasa foliar vs. biomasa total (C), ratio biomasa aérea vs. biomasa subterránea (D), ratio biomasa de raíces vs. biomasa de tallos (E), ratio biomasa de raíces finas vs. raíces gruesas (F) y ratio biomasa radicular vs. biomasa total (G) en los individuos de *A. alba*. Estas variables se registraron al inicio y al final del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas. Nótese la diferencia de escala.



**Figura III.12.** Índice de dominancia apical (A), ratio biomasa foliar vs. biomasa aérea (B), ratio biomasa foliar vs. biomasa total (C), ratio biomasa aérea vs. biomasa subterránea (D), ratio biomasa de raíces vs. biomasa de tallos (E), ratio biomasa de raíces finas vs. raíces gruesas (F) y ratio biomasa radicular vs. biomasa total (G) en los individuos de *A. pinsapo*. Estas variables se registraron al inicio y al final del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas. Nótese la diferencia de escala.

### *III.3.3. Composición foliar en pigmentos.*

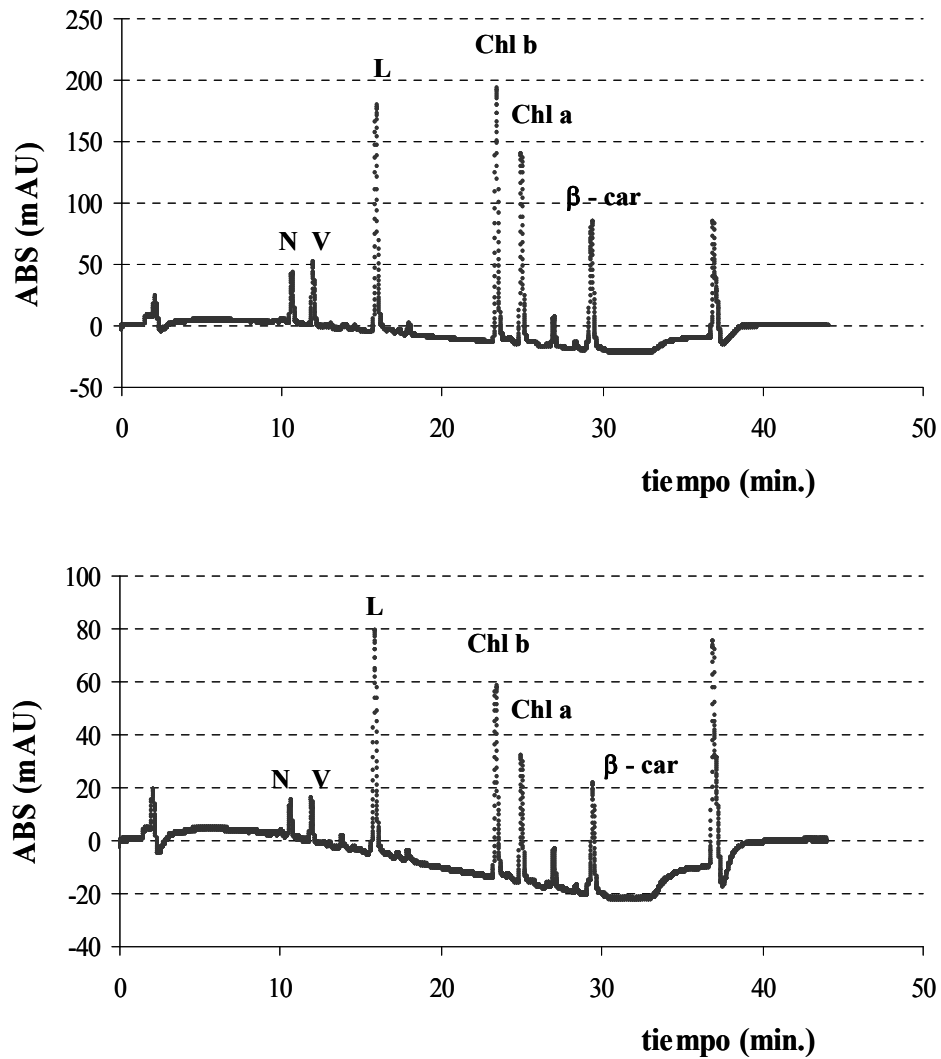
#### *III.3.3.1. Equipo pigmentario de Abies pinsapo.*

El método de separación seleccionado para la determinación de los pigmentos fotosintéticos resultó muy adecuado, a juzgar por la correcta separación de los picos aislados en los cromatogramas obtenidos (**Figura III.13**). Considerando la secuencia de elución en orden de polaridad decreciente, los tiempos de retención registrados y la abundante literatura científica relativa (ver el procedimiento descrito en la **Sección II.3.4** de esta memoria), los pigmentos separados con éxito con este procedimiento fueron (por orden de aparición (polaridad decreciente)): las xantofilas - neoxantina, violaxantina, luteína y zeaxantina -, clorofilas b y a, feofitinas, y  $\beta$ -caroteno (**Figura III.13**). No fue posible lograr una buena separación de la anteraxantina, posiblemente a consecuencia de su similitud con la luteína y la enorme desproporción en la concentración con que ambos pigmentos aparecen. Salvo por esta excepción, pudo constatarse la ausencia de problemas de coelución, y los espectros de absorción obtenidos confirmaron la identificación inicial de los pigmentos aislados (**Figura III.14**). A partir de los estándares empleados para el cálculo de las concentraciones, los pigmentos que finalmente pudieron ser cuantificados fueron la neoxantina, la violaxantina, la luteína, la clorofila b, la clorofila a y el  $\beta$ -caroteno.

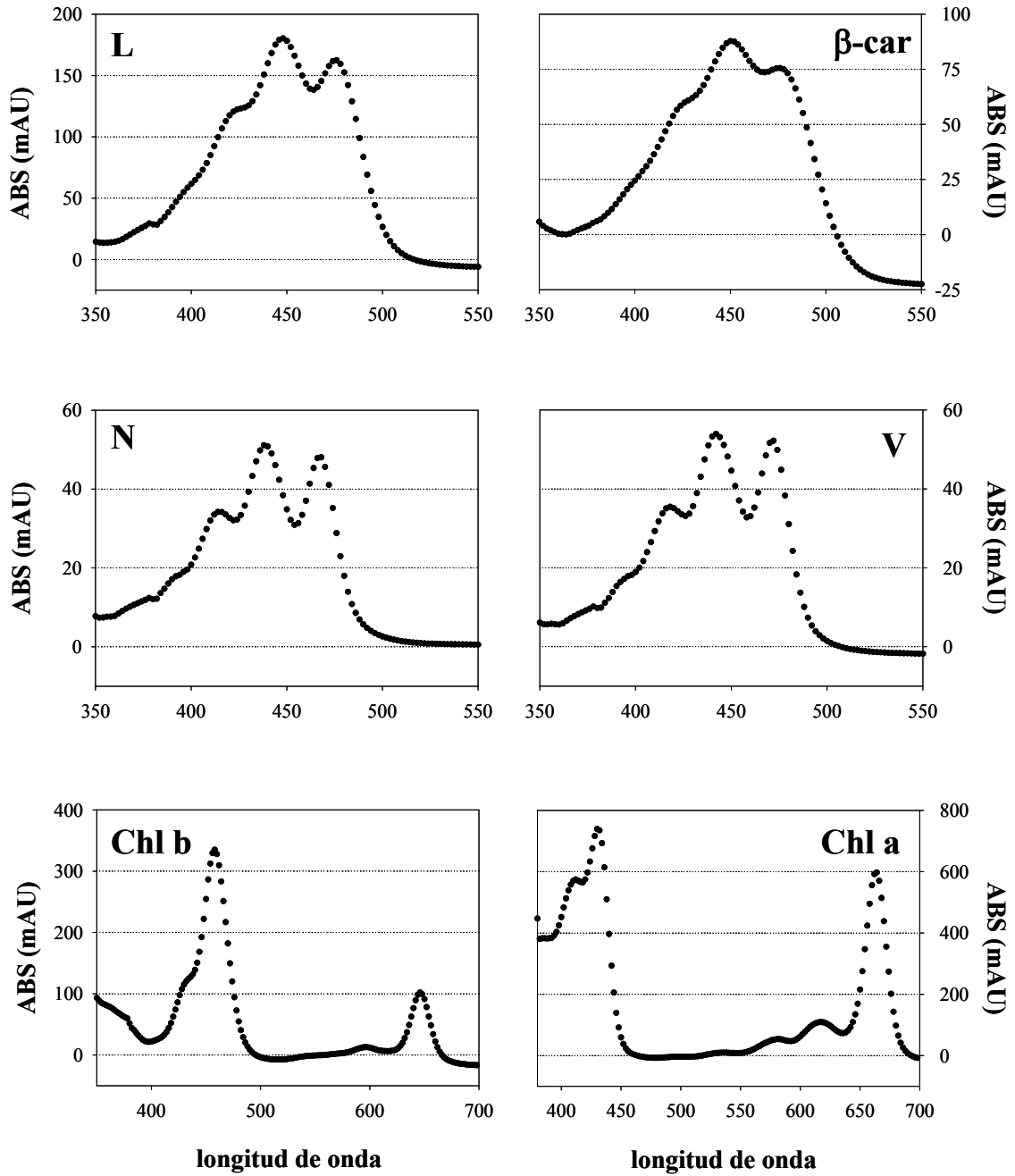
En las muestras de pinsapo, la concentración de pigmentos hallada en las acículas “nuevas”, surgidas en el transcurso del experimento, fue por término medio un 34% inferior a la registrada en las acículas maduras, si bien se hallaron notables diferencias entre tratamientos y en el comportamiento de los distintos pigmentos. Así, en el tratamiento de alta irradiancia, la concentración detectada en las acículas “nuevas” fue en torno a un 52% inferior a la detectada en las acículas maduras; sin embargo, en el tratamiento a baja irradiancia, la concentración en las acículas nuevas fue únicamente un 16% inferior a la detectada en las acículas maduras. En lo que respecta a los pigmentos, la menor diferencia entre acículas de ambas edades se detectó en la luteína (26%) y en la clorofila b (28%), mientras que la mayor diferencia se halló para la clorofila a (47%).

Los análisis estadísticos aplicados sobre el conjunto de muestras de tejido foliar maduro pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas debidas al paso del tiempo en todos los casos salvo en el de la luteína, produciéndose un incremento en la concentración del resto de pigmentos (**Tablas III.12 y III.13**). Sin embargo, no se hallaron diferencias entre tratamientos de irradiancia, encontrándose únicamente diferencias debidas a la interacción “tratamiento de irradiancia x tiempo” para las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y de ambas clorofilas, que tendieron a incrementarse en el tratamiento a baja irradiancia, y a disminuir a alta irradiancia (**Figuras III.15 y III.16**). El ratio entre la concentración de clorofila a y la de clorofila b, así como el ratio entre la concentración de clorofila a y la suma del resto de pigmentos mostraron un ligero incremento, aunque significativo, en ambos tratamientos de irradiancia (**Figura III.16**).

En las muestras de tejido foliar “nuevo”, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia, debidas al tiempo y a la interacción “tratamiento de irradiancia x tiempo”, en la mayor parte de los casos (**Tablas III.14. y III.15**). El tratamiento de alta irradiancia no tuvo un claro efecto sobre la concentración de pigmentos, dándose casos en que ésta aumentó (violaxantina, clorofila a), y manteniéndose sin cambios o incluso disminuyendo en el resto (**Figuras III.17 y III.18**). El tratamiento de baja irradiancia, sin embargo, produjo en todos los casos (excepto en la luteína) un incremento en la concentración de pigmentos. Por su parte, el ratio entre la concentración de clorofila a y la de clorofila b, y el ratio entre la concentración de clorofila a y la suma del resto de pigmentos experimentaron en ambos tratamientos un incremento más marcado que el hallado en el tejido foliar maduro (**Figura III.18**).



**Figura III.13.** Ejemplos de cromatogramas obtenidos en la determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos de *A. pinsapo* usando HPLC en fase inversa. En este caso, se muestra el contenido hallado en un individuo adscrito al tratamiento de alta irradiancia durante cinco meses. Se muestra la evolución en el tiempo de la absorbancia registrada (en miliunidades de absorbancia) a una longitud de 445 nm. Los pigmentos se eluyeron en orden de polaridad decreciente. Nótese la adecuada separación entre los picos aislados, así como la diferencia de escala.



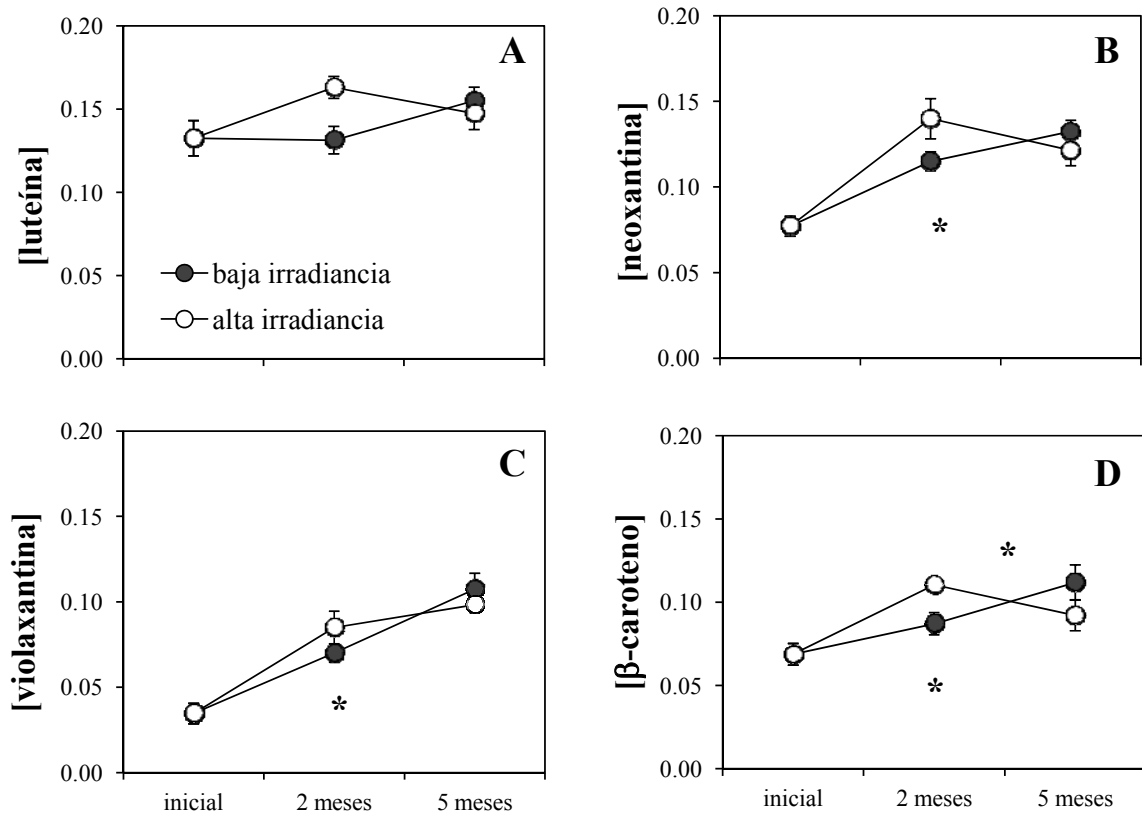
**Figura III.14.** Absorbancia registrada en los distintos momentos del tiempo en los que se aislaron los picos correspondientes a la luteína (L), el β-caroteno ( β-car), la neoxantina (N), la violaxantina (V), la clorofila b (Chl b) y la clorofila a (Chl a), en el individuo de *A. pinsapo* empleado como ejemplo en la figura anterior. La gran similitud hallada entre estos espectros de absorción y los hallados en la literatura permitieron garantizar la ausencia de problemas de coelución en los picos aislados. Nótese la diferencia de escala.

**Tabla III.12.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables la concentración de los pigmentos luteína,  $\beta$ -caroteno, neoxantina y violaxantina, expresadas en  $\mu\text{g}$  por mg de materia foliar (en peso seco), medidas en muestras de tejido foliar maduro de individuos de *A. pinsapo*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	Luteína	Neoxantina	Violaxantina	$\beta$ -caroteno
Tratamiento de irradiancia	0.95 (1) 0.340	0.56 (1) 0.461	0.11 (1) 0.741	0.04 (1) 0.842
Tiempo de incubación	2.20 (2) 0.134	34.55 (2) <b>0.000*</b>	53.38 (2) <b>0.000*</b>	13.39 (2) <b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	1.98 (2) 0.162	2.79 (2) 0.083	1.32 (2) 0.287	3.60 (2) <b>0.044*</b>

**Tabla III.13.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables la concentración en clorofila a (Chl a) y en clorofila b (Chl b), la suma de ambas, y los ratios Chl a : Chl b y Chl a : resto pigmentos. Las distintas concentraciones vienen expresadas en  $\mu\text{g}$  por mg de materia foliar (en peso seco), y han sido medidas en muestras de tejido foliar maduro de individuos de *A. pinsapo*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

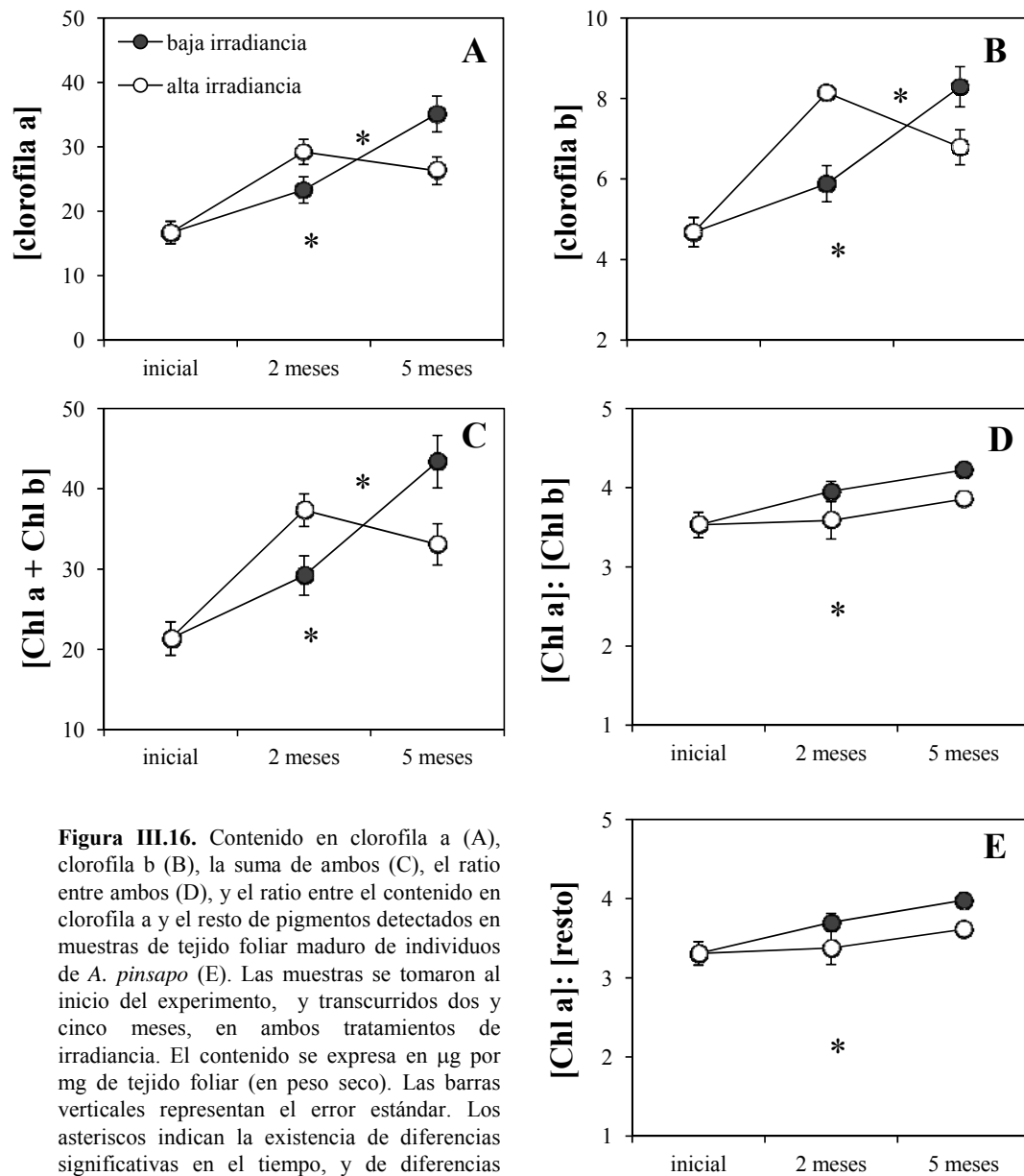
efecto	Chl a	Chl b	Chl a + Chl b	Chl a : Chl b	Chl a : resto
Tratamiento de irradiancia	0.33 (1) 0.571	0.60 (1) 0.446	0.13 (1) 0.721	3.37 (1) 0.080	3.55 (1) 0.073
Tiempo de incubación	26.60 (2) <b>0.000*</b>	32.75 (2) <b>0.000*</b>	28.20 (2) <b>0.000*</b>	5.28 (2) <b>0.013*</b>	5.78 (2) <b>0.010*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	5.65 (2) <b>0.010*</b>	9.95 (2) <b>0.001*</b>	6.36 (2) <b>0.007*</b>	0.96 (2) 0.397	1.03 (2) 0.375



**Figura III.15.** Contenido en luteína (A), neoxantina (B), violaxantina (C) y  $\beta$  – caroteno (D), expresado en  $\mu\text{g}$  por mg de tejido foliar maduro (en peso seco), hallado en individuos de *A. pinsapo* sometidos a los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento. Las muestras se recolectaron al inicio del experimento y a los dos y cinco meses desde su inicio. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y derivadas de la interacción “tratamiento de irradiancia x tiempo”.

**Tabla III.14.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables la concentración de los pigmentos luteína,  $\beta$ -caroteno, neoxantina y violaxantina, expresadas en  $\mu\text{g}$  por mg de materia foliar (en peso seco), medidas en muestras de tejido foliar “nuevo” de individuos de *A. pinsapo*. (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

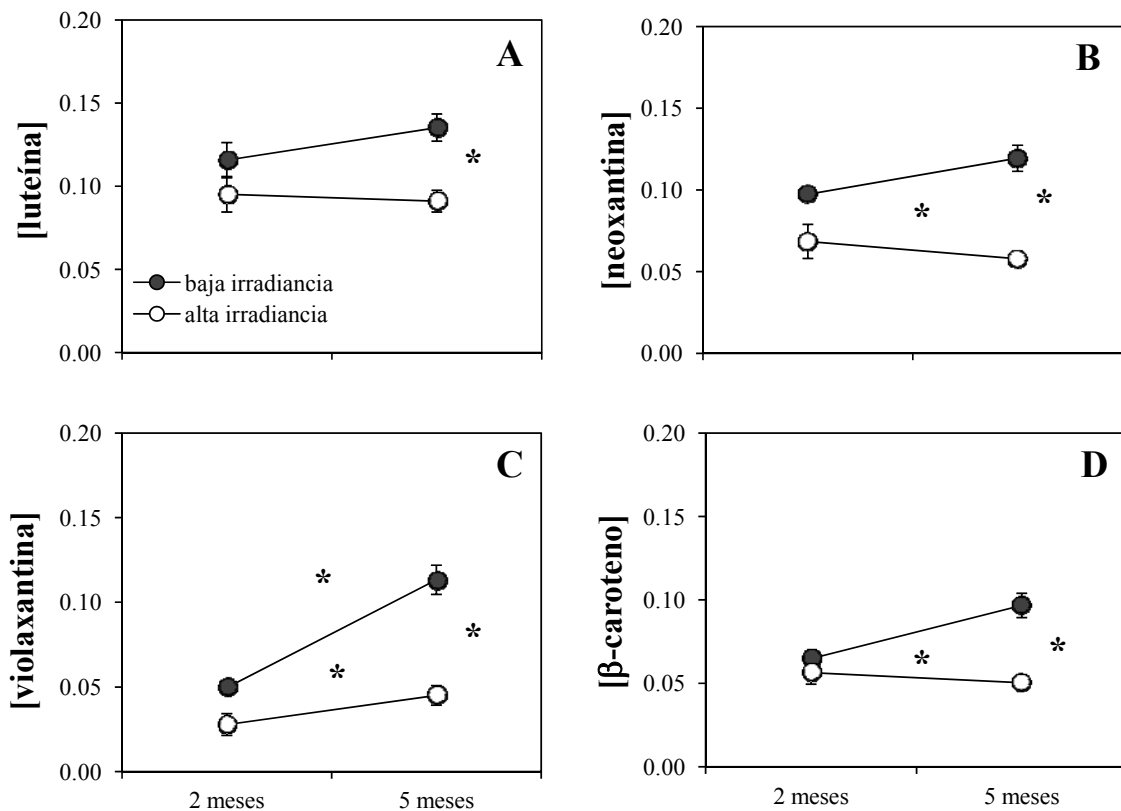
efecto	Luteína	Neoxantina	Violaxantina	$\beta$ -caroteno
Tratamiento de irradiancia	20.43 (1) <b>0.000*</b>	40.02 (1) <b>0.000*</b>	51.83 (1) <b>0.000*</b>	17.69 (1) <b>0.001*</b>
Tiempo de incubación	1.15 (1) 0.305	0.66 (1) 0.432	42.04 (1) <b>0.000*</b>	1.15 (1) 0.304
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	2.73 (1) 0.124	5.23 (1) <b>0.041*</b>	13.86 (1) <b>0.003*</b>	5.10 (1) <b>0.043*</b>



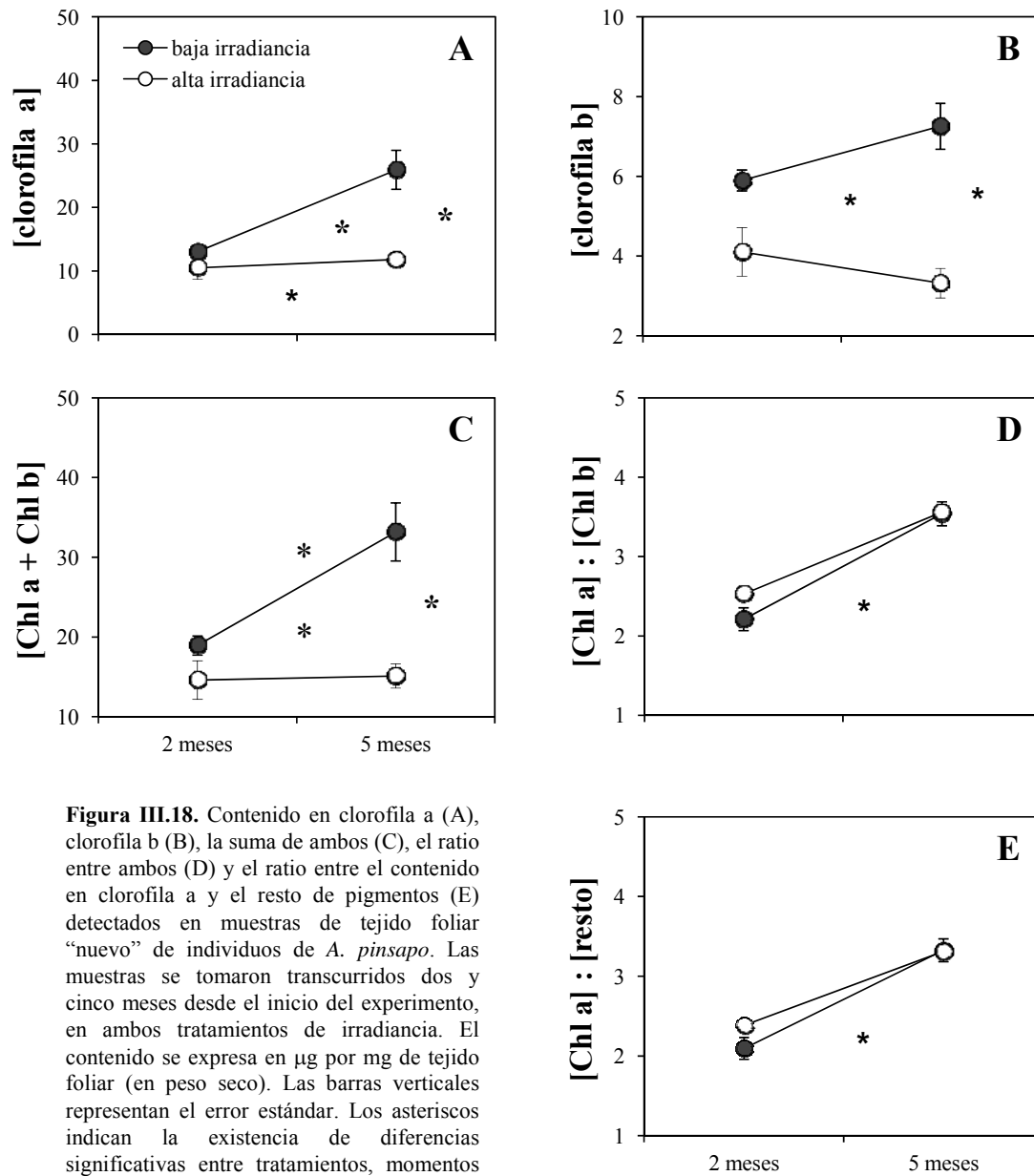
**Figura III.16.** Contenido en clorofila a (A), clorofila b (B), la suma de ambos (C), el ratio entre ambos (D), y el ratio entre el contenido en clorofila a y el resto de pigmentos detectados en muestras de tejido foliar maduro de individuos de *A. pinsapo* (E). Las muestras se tomaron al inicio del experimento, y transcurridos dos y cinco meses, en ambos tratamientos de irradiancia. El contenido se expresa en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de tejido foliar (en peso seco). Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo, y de diferencias debidas a la interacción tratamiento de luz x tiempo. Nótese la diferencia de escala.

**Tabla III.15.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables la concentración en clorofila a (Chl a) y en clorofila b (Chl b), la suma de ambas, y los ratios Chl a : Chl b y Chl a : resto pigmentos. Las distintas concentraciones vienen expresadas en  $\mu\text{g}$  por mg de materia foliar (en peso seco), y han sido medidas en muestras de tejido foliar “nuevo” de individuos de *A. pinsapo*. (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	Chl a	Chl b	Chl a + Chl b	Chl a : Chl b	Chl a : resto
Tratamiento de irradiancia	18.38 (1) <b>0.001*</b>	35.99 (1) <b>0.000*</b>	22.42 (1) <b>0.000*</b>	1.92 (1) 0.191	1.46 (1) 0.250
Tiempo de incubación	11.72 (1) <b>0.005*</b>	0.37 (1) 0.557	7.26 (1) <b>0.019*</b>	94.38 (1) <b>0.000*</b>	91.01 (1) <b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	5.08 (1) <b>0.044*</b>	5.04 (1) <b>0.044*</b>	4.78 (1) <b>0.049*</b>	1.48 (1) 0.248	1.77 (1) 0.209



**Figura III.17.** Contenido en luteína (A), neoxantina (B), violaxantina (C) y  $\beta$  – caroteno (D), expresado en  $\mu\text{g}$  por mg de tejido foliar “nuevo” (en peso seco), hallado en individuos de pinsapo sometidos a los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento. Las muestras se recolectaron a los dos y cinco meses desde su inicio. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, en el tiempo, y debidas a la interacción “tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación”.



**Figura III.18.** Contenido en clorofila a (A), clorofila b (B), la suma de ambos (C), el ratio entre ambos (D) y el ratio entre el contenido en clorofila a y el resto de pigmentos (E) detectados en muestras de tejido foliar “nuevo” de individuos de *A. pinsapo*. Las muestras se tomaron transcurridos dos y cinco meses desde el inicio del experimento, en ambos tratamientos de irradiancia. El contenido se expresa en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de tejido foliar (en peso seco). Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, momentos del tiempo, y debidas a la interacción “tratamiento de luz x tiempo”. Nótese la diferencia de escala.

### III.3.3.2. Equipo pigmentario de *Abies alba*.

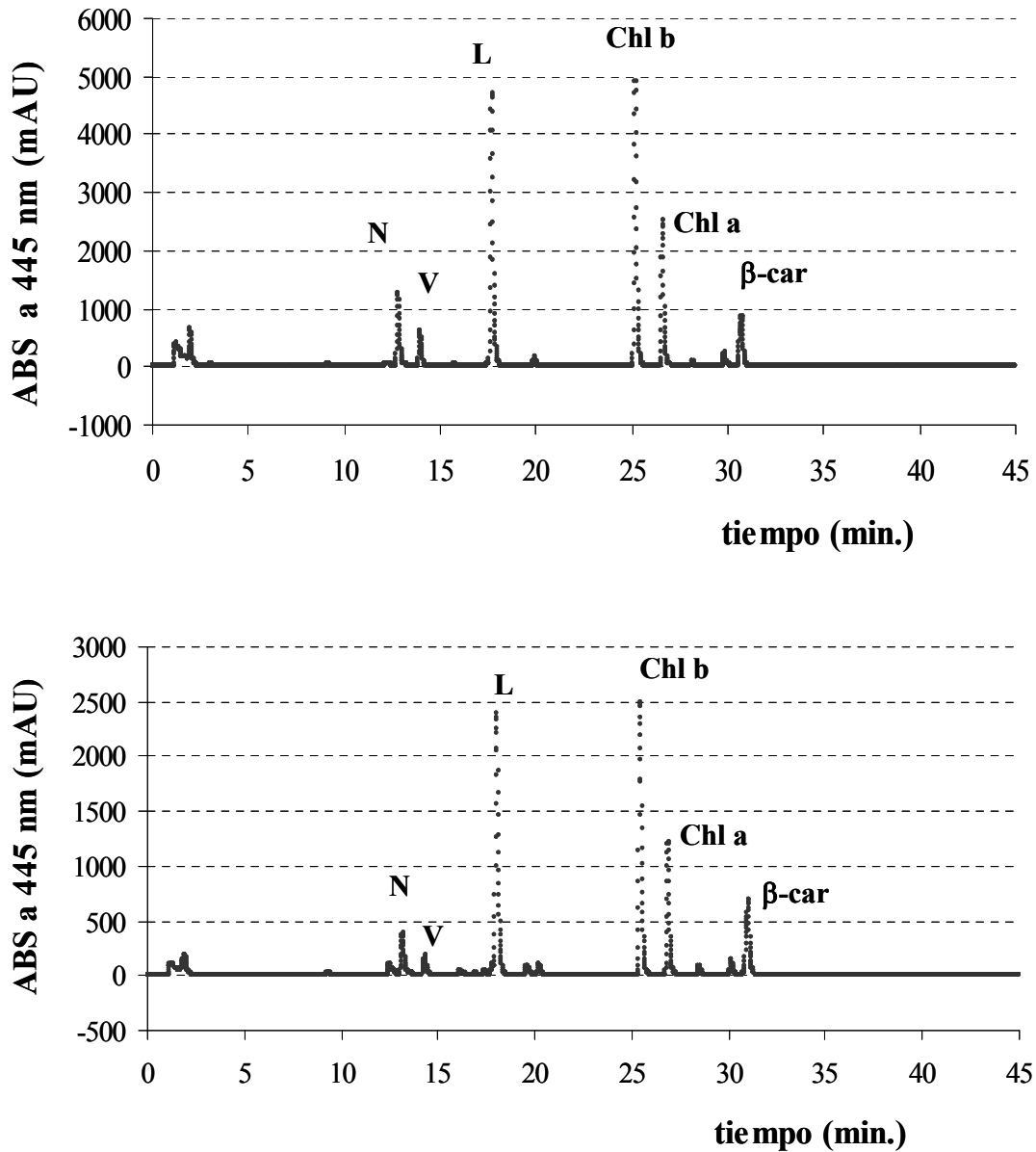
En este caso, el método seleccionado para la determinación de los pigmentos fotosintéticos resultó igualmente adecuado, a la vista de los resultados obtenidos (**Figura III.19**). Así, tras constatarse la ausencia de problemas de coelución, los distintos espectros de absorción obtenidos confirmaron la identificación inicial de los pigmentos aislados (**Figura III.20**). No obstante, en esta ocasión únicamente pudieron ser aislados y cuantificados tres pigmentos – la luteína, la clorofila b y la clorofila a -.

Al igual que en el caso de *A. pinsapo*, en las muestras de *A. alba* la concentración de pigmentos registrada en las acículas “nuevas” fue por término medio un 34% inferior a la registrada en las acículas maduras, de nuevo con diferencias notables entre tratamientos y entre los distintos pigmentos. Así, en el tratamiento de alta irradiancia, la concentración detectada en las acículas “nuevas” fue en torno al 49% inferior a la detectada en las acículas maduras; sin embargo, en el tratamiento a baja irradiancia, la concentración en las acículas nuevas fue únicamente un 20% inferior a la detectada en las acículas maduras. En lo que respecta a los pigmentos, hubo una diferencia del 30% entre las concentraciones de luteína y clorofila b registradas en acículas de ambas edades, mientras que esta diferencia fue del 42% en el caso de la clorofila a.

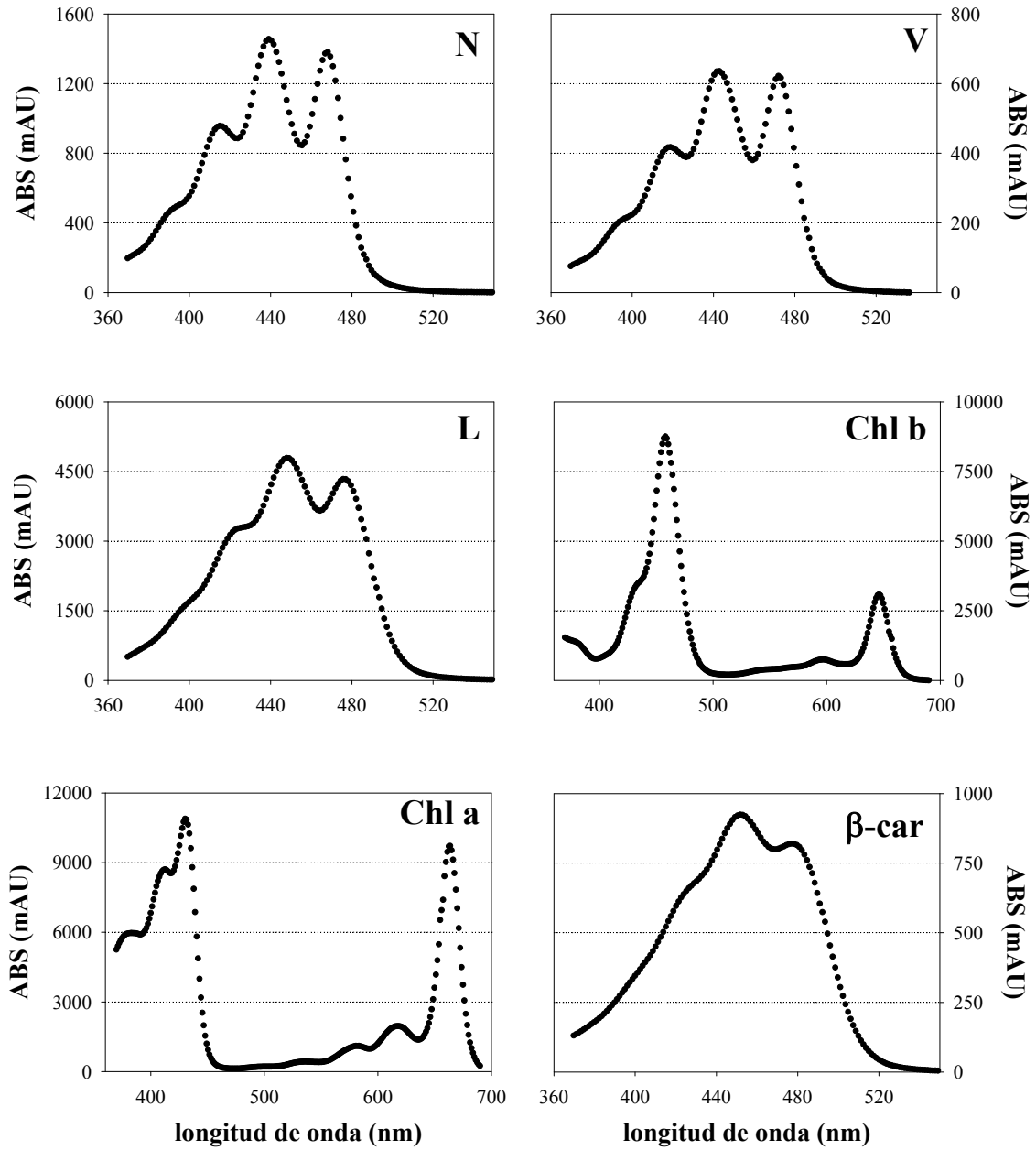
Los análisis estadísticos aplicados sobre el conjunto de muestras de tejido foliar maduro no evidenciaron que la concentración de luteína experimentase diferencias significativas con el paso del tiempo, ni derivadas de la aplicación de los tratamientos de irradiancia (**Tabla III.16**). Por el contrario, sí se hallaron diferencias para la concentración en clorofila b y para la suma de las concentraciones de ambas clorofilas, que experimentaron un incremento con el paso del tiempo, similar en ambos tratamientos (**Figura III.21**), y para el contenido en clorofila a y el ratio clorofila a : clorofila b, que experimentaron un incremento notable y posterior descenso, hallándose diferencias debidas a la aplicación de los tratamientos sólo para el ratio clorofila a : clorofila b (**Tabla III.16**, **Figura III.21**).

En las acículas “nuevas”, el contenido en luteína tampoco experimentó variaciones significativas en el transcurso del experimento ni derivadas de la aplicación de los tratamientos de irradiancia (**Tabla III.17**, **Figura III.22**). Sin embargo, para la clorofila a, la clorofila b y la suma de ambas, los análisis estadísticos revelaron la

existencia de diferencias debidas tanto al paso del tiempo (el contenido se incrementó en el tiempo) como a la aplicación de los tratamientos (las mayores concentraciones siempre se registraron en el tratamiento a baja irradiancia). Para el ratio clorofila a : clorofila b, se puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas por efecto de los tratamientos, y de diferencias (marginamente significativas,  $p = 0.054$ ) derivadas del tiempo de incubación, en el tratamiento a baja irradiancia.



**Figura III.19.** Típicos cromatogramas obtenidos en la determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos usando HPLC en fase inversa para las muestras obtenidas en individuos de *A. alba*. En este caso, se muestra el contenido hallado en un individuo de pinsapo tras cinco meses adscrito al tratamiento de alta irradiancia. Se muestra la evolución en el tiempo de la absorbancia registrada (en miliunidades de absorbancia) a una longitud de 445 nm. Los pigmentos se eluyeron en orden de polaridad decreciente. Nótese la adecuada separación entre los picos aislados, así como la diferencia de escala.



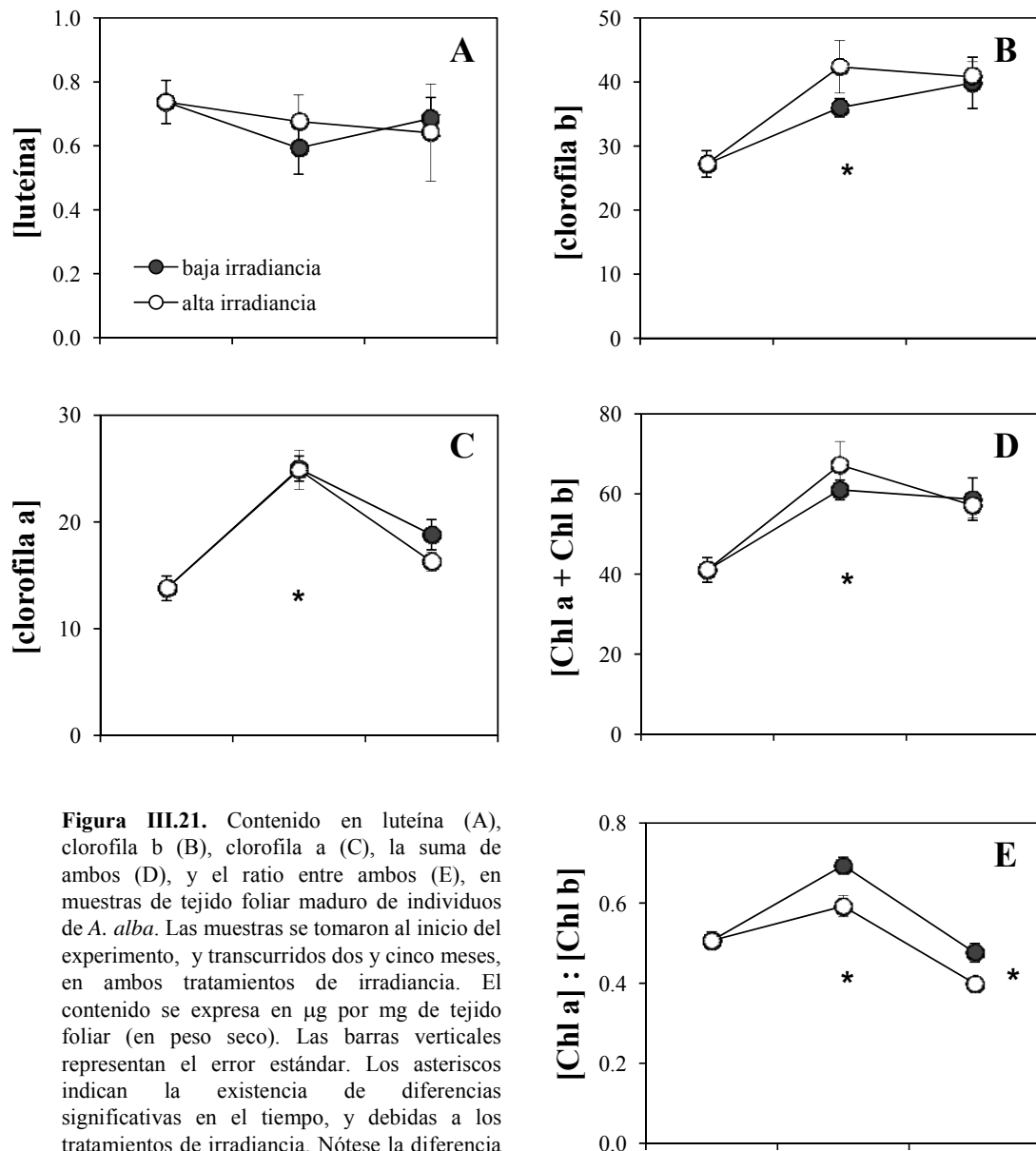
**Figura III.20.** Absorbancia registrada en los distintos momentos del tiempo en los que se aislaron los picos correspondientes a la neoxantina (N), la violaxantina (V), la luteína (L), la clorofila b (Chl b), la clorofila a (Chl a) y el β-caroteno ( β-car), en el individuo empleado como ejemplo en la figura anterior. La gran similitud hallada entre estos espectros de absorción y los hallados en la literatura permitieron garantizar la ausencia de problemas de coelución en los picos aislados. Nótese la diferencia de escala.

**Tabla III.16.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables la concentración en luteína, en clorofila b (Chl b) y en clorofila a (Chl a), la suma de ambas clorofilas, y el ratio Chl a : Chl b. Las distintas concentraciones vienen expresadas en  $\mu\text{g}$  por mg de materia foliar (en peso seco), y han sido medidas en muestras de tejido foliar maduro de individuos de *A. alba* (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

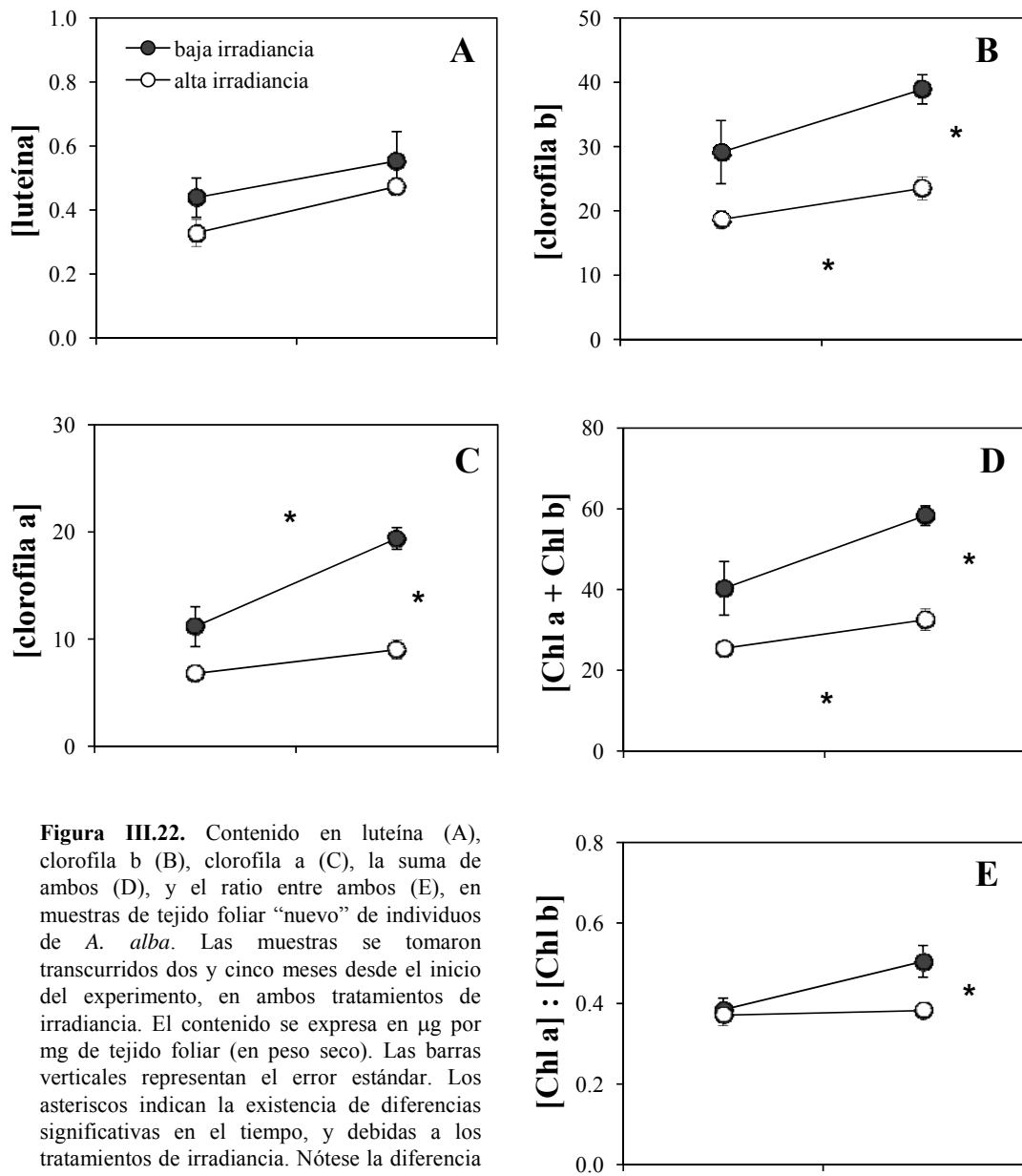
efecto	Luteína	Chl b	Chl a	Chl a + Chl b	Chl a : Chl b
Tratamiento de irradiancia	0.03 (1)	1.19 (1)	0.67 (1)	0.24 (1)	10.84 (1)
	0.858	0.288	0.420	0.631	<b>0.003*</b>
Tiempo de incubación	0.81 (2)	16.09 (2)	39.19 (2)	21.08 (2)	40.13 (2)
	0.456	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.24 (2)	0.78 (2)	0.57 (2)	0.52 (2)	3.24 (2)
	0.787	0.472	0.572	0.604	0.059*

**Tabla III.17.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento, considerando como variables la concentración en luteína, en clorofila a (Chl a) y en clorofila b (Chl b), la suma de ambas clorofilas, y el ratio Chl a : Chl b. Las distintas concentraciones vienen expresadas en  $\mu\text{g}$  por mg de materia foliar (en peso seco), y han sido medidas en muestras de tejido foliar “nuevo” de individuos de *A. alba* (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	Luteína	Chl b	Chl a	Chl a + Chl b	Chl a : Chl b
Tratamiento de irradiancia	2.12 (1)	17.33 (1)	37.35 (1)	26.41 (1)	4.94 (1)
	0.173	<b>0.002*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.048*</b>
Tiempo de incubación	4.01 (1)	5.54 (1)	18.82 (1)	10.76 (1)	4.63 (1)
	0.071	<b>0.038*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.007*</b>	0.054*
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.06 (1)	0.62 (1)	6.24 (1)	0.70 (1)	3.18 (1)
	0.816	0.448	<b>0.029*</b>	0.419	0.102



**Figura III.21.** Contenido en luteína (A), clorofila b (B), clorofila a (C), la suma de ambos (D), y el ratio entre ambos (E), en muestras de tejido foliar maduro de individuos de *A. alba*. Las muestras se tomaron al inicio del experimento, y transcurridos dos y cinco meses, en ambos tratamientos de irradiancia. El contenido se expresa en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de tejido foliar (en peso seco). Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo, y debidas a los tratamientos de irradiancia. Nótese la diferencia de escala.



### III.3.3.3. Análisis comparativo de los contenidos pigmentarios de ambas especies.

Por otro lado, los análisis efectuados al objeto de detectar las posibles diferencias interespecíficas en lo que respecta a la concentración presente de los pigmentos que pudieron ser cuantificados en las dos especies, mostraron que las mayores concentraciones de clorofila a se encontraron en *A. pinsapo* (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), aunque no se hallasen diferencias en el tejido foliar nuevo entre ambas especies. Asimismo, se hallaron diferencias significativas en lo concerniente a las concentraciones de clorofila b y de luteína (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), siendo éstas mayores en *A. alba*, con una concentración seis veces superior de clorofila b y cuatro veces superior en el caso de la luteína. Además, se hallaron diferencias para la suma de ambas clorofilas (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), hallándose en *A. alba* una concentración aproximadamente el doble que la hallada en *A. pinsapo*. El ratio Chl a: Chl b, no obstante, fue mayor en esta última especie (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), observándose un valor del ratio casi siete veces superior al hallado en *A. alba*.

### III.3.4. Discriminación de isótopos estables de C.

La composición en isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ ) hallada en muestras de *A. pinsapo* fue significativamente menor a la hallada en muestras de *A. alba* ). Así, el valor promedio en muestras de tejido maduro de *A. pinsapo* fue de -30.61 ‰, mientras que en *A. alba* fue de -28.26 ‰. En las muestras de tejido foliar “nuevo”, surgido durante el transcurso del experimento, la composición isotópica fue asimismo significativamente inferior a la obtenida en muestras de tejido foliar maduro (- 40.19 ‰ en muestras de *A. pinsapo*, - 34.27 ‰ en *A. alba*, en valores promedios) (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ). Esto indica, por un lado, que el tejido foliar de *A. pinsapo* se encuentra más empobrecido en el isótopo pesado que el tejido de *A. alba*, y por otro, que el tejido foliar nuevo se halla incluso más empobrecido en el isótopo pesado, en ambas especies. La discriminación de isótopos ( $\Delta^{13}\text{C}$ ,  $\Delta$ ) fue calculada a partir de los valores de composición isotópica obtenidos, asumiendo que la composición del aire fue de -8 ‰. El valor promedio obtenido en muestras de tejido foliar maduro de *A. pinsapo* (23.82 ‰) fue significativamente superior al obtenido en el caso de *A. alba* (20.85 ‰) . En el tejido foliar nuevo se mantuvieron estas diferencias entre especies, hallándose valores siempre

superiores a los obtenidos en muestras de tejido foliar maduro (33.54 ‰ en *A. pinsapo* y 27.21 ‰ en *A. alba*, en valores promedios) (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ).

Los análisis estadísticos aplicados sobre los valores de composición y de discriminación isotópica obtenidos para las muestras de tejido foliar maduro de ambas especies (**Tabla III.18**) mostraron la existencia de diferencias significativas entre especies y debidas al tiempo de incubación, que produjo un incremento en la discriminación contra el isótopo pesado (valores de  $\delta^{13}\text{C}$  cada vez más negativos) (**Figuras III.23** y **III.24**). Estas diferencias con el tiempo se mantuvieron asimismo cuando se realizaron los análisis por separado para cada una de las especies (**Tablas III.19** y **III.20**). En lo que respecta al tejido foliar sintetizado *de novo* durante el transcurso del experimento, muestreado a los dos y a los cinco meses del inicio del mismo, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies y derivadas de la interacción “especie x tratamiento de irradiancia” (**Tabla III.18**). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados obtenidos en cada una de las especie por separado, no se detectaron diferencias significativas en *A. alba*, si bien se detectaron diferencias entre tratamientos de irradiancia y los distintos momentos del tiempo en *A. pinsapo* (**Tablas III.19** y **III.20**, **Figuras III.23** y **III.24**). En esta especie, se produjo una mayor discriminación en el tratamiento a baja irradiancia (valores de  $\delta^{13}\text{C}$  más negativos); con el paso del tiempo, se tendió hacia una menor discriminación en ambos tratamientos de irradiancia (incremento en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ ). En *A. alba*, los individuos sometidos a tratamientos distintos mostraron comportamientos distintos en el tiempo: en el tratamiento de alta irradiancia, el comportamiento fue similar al exhibido por *A. pinsapo*; sin embargo, a baja irradiancia, se tendió a una mayor discriminación contra el isótopo pesado.

**Tabla III.18.** Resultado de los análisis estadísticos aplicados para la detección de las diferencias entre especies, momentos del tiempo y derivadas de la aplicación de los tratamientos de irradiancia previstos, en muestras de tejido foliar maduro y “nuevo”, considerando como variables la composición en isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), expresada en tanto por mil y calculada en relación con el estándar de Belemnita PeeDee (PDB), y la discriminación contra el isótopo pesado del C ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), expresada en tanto por mil y calculada conforme a Farquhar *et al.* (1989) (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada efecto se muestra el valor de F, los grados de libertad (entre paréntesis) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

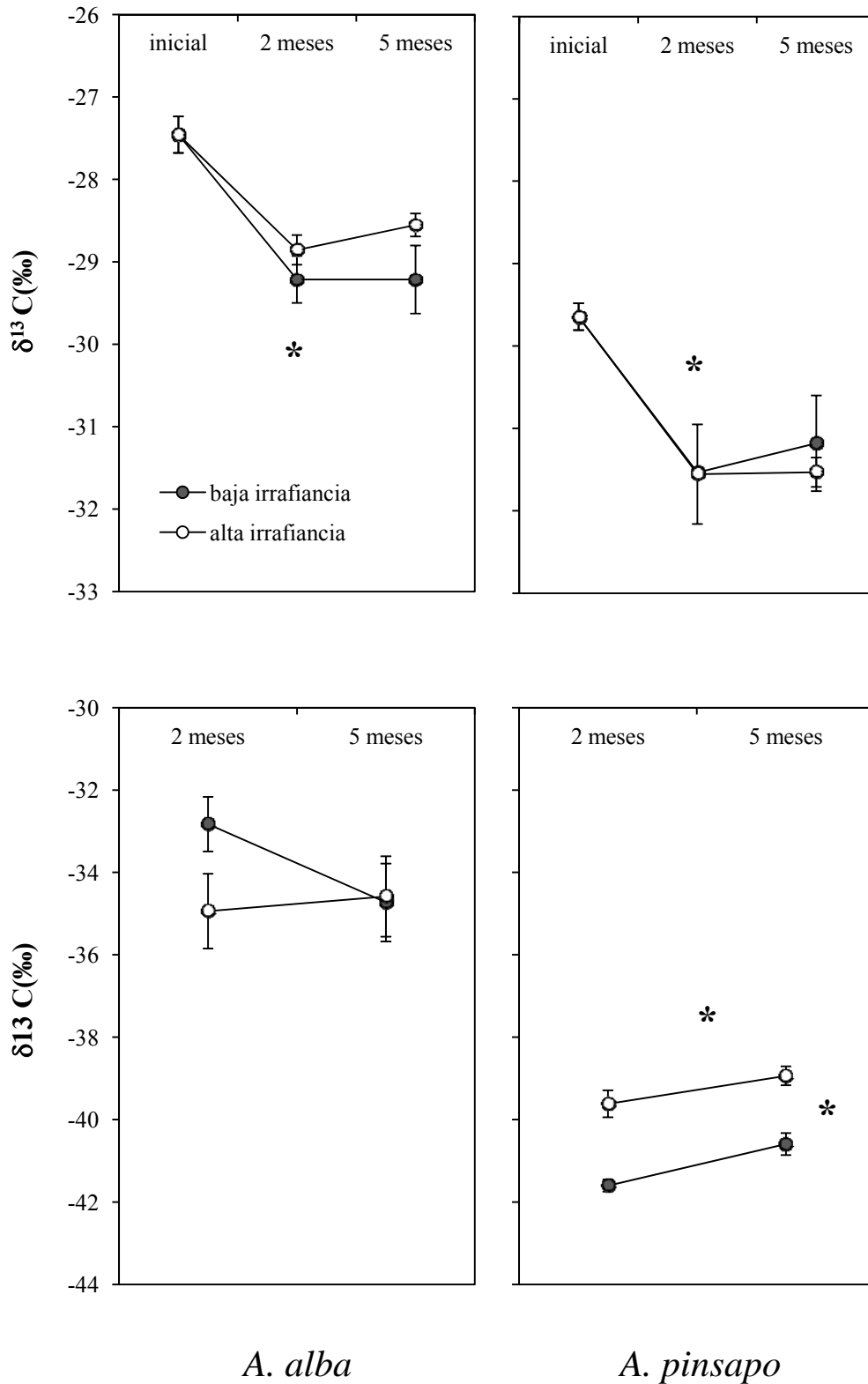
efecto	$\delta^{13}\text{C}$ – maduro	$\delta^{13}\text{C}$ – “nuevo”	$\Delta^{13}\text{C}$ – maduro	$\Delta^{13}\text{C}$ – “nuevo”
Especie	203.9 (1) <b>0.000*</b>	166.56 (1) <b>0.000*</b>	203.69 (1) <b>0.000*</b>	168.31 (1) <b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia	0.4 (1) 0.522	0.83 (1) 0.370	0.41 (1) 0.524	0.88 (1) 0.358
Tiempo de incubación	52.4 (2) <b>0.000*</b>	0.01 (1) 0.940	52.33 (2) <b>0.000*</b>	0.01 (1) 0.931
Especie x tratamiento de irradiancia	1.9 (1) 0.173	9.33 (1) <b>0.005*</b>	1.91 (1) 0.173	9.47 (1) <b>0.005*</b>
Especie x tiempo de incubación	0.4 (2) 0.647	3.12 (1) 0.090	0.46 (2) 0.632	3.16 (1) 0.088
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.1 (2) 0.882	1.10 (1) 0.304	0.12 (2) 0.883	1.09 (1) 0.306
Especie x tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.8 (2) 0.441	1.98 (1) 0.172	0.83 (2) 0.442	1.99 (1) 0.171

**Tabla III.19.** Resultado del análisis estadístico aplicado a cada especie por separado para la detección de las diferencias debidas a los tratamientos de irradiancia previstos en muestras de tejido foliar maduro y “nuevo”, considerando como variable la composición en isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), expresada en tanto por mil y calculada en relación con el estándar de Belemnita PeeDee (PDB) (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada efecto se muestra el valor de F, los grados de libertad (entre paréntesis) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

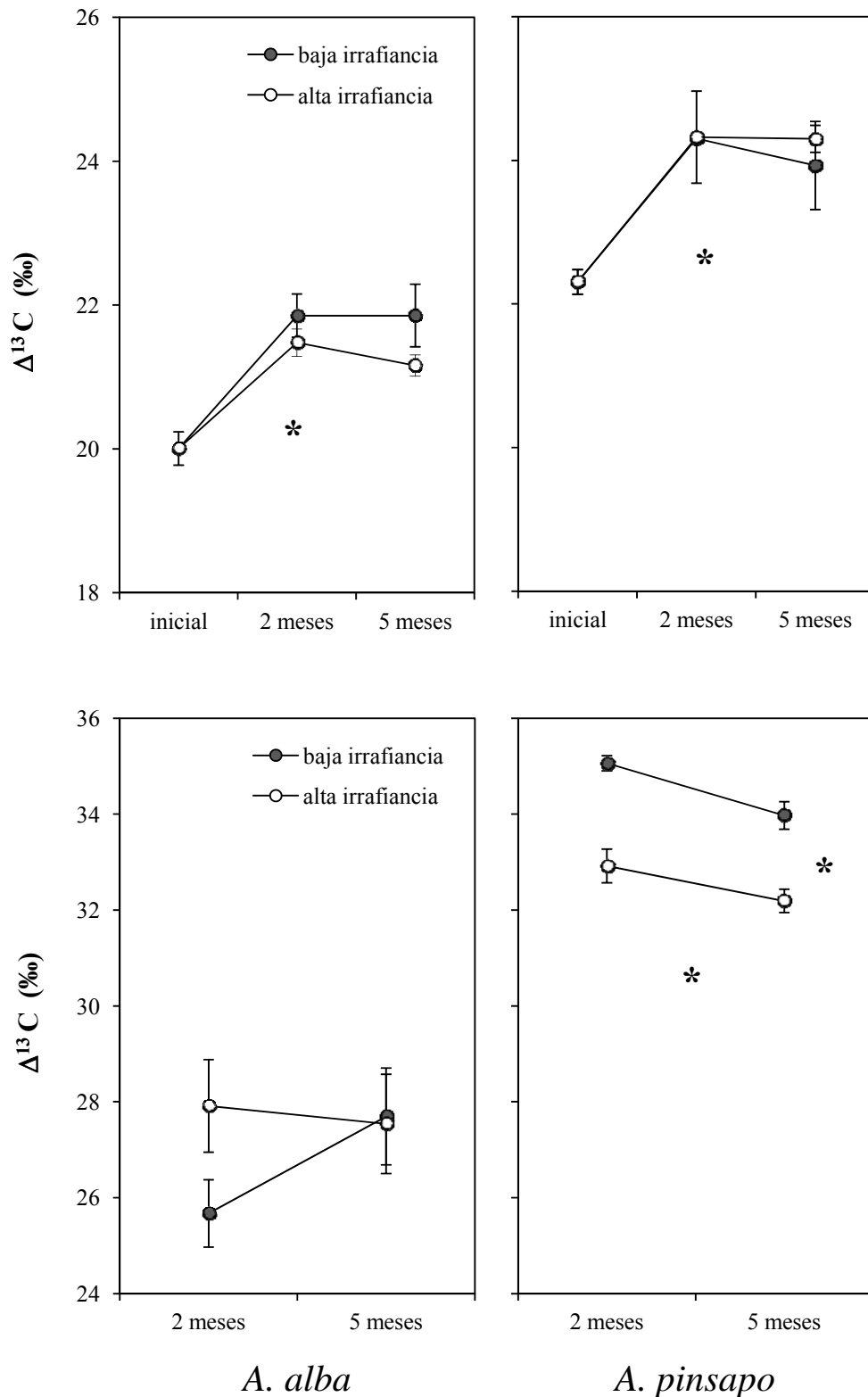
efecto	<i>A. alba</i> - maduro	<i>A. pinsapo</i> - maduro	<i>A. alba</i> - nuevo	<i>A. pinsapo</i> - nuevo
Tratamiento de irradiancia	2.50 (1) 0.127	0.23 (1) 0.634	1.24 (1) 0.287	52.7 (1) <b>0.000*</b>
Tiempo de incubación	26.25 (2) <b>0.000*</b>	26.57 (2) <b>0.000*</b>	0.77 (1) 0.397	11.4 (1) <b>0.006*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.89 (2) 0.423	0.19 (2) 0.828	1.63 (1) 0.225	0.4 (1) 0.523

**Tabla III.20.** Resultado del análisis estadístico aplicado a cada especie por separado para la detección de las diferencias debidas a los tratamientos de irradiancia previstos en muestras de tejido foliar maduro y “nuevo”, considerando como variable la discriminación contra el isótopo pesado del C ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), expresada en tanto por mil y calculada conforme a Farquhar *et al.* (1989) (GLM considerando como factores los tratamientos de irradiancia y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada efecto se muestra el valor de F, los grados de libertad (entre paréntesis) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	<i>A. alba</i> - maduro	<i>A. pinsapo</i> - maduro	<i>A. alba</i> - nuevo	<i>A. pinsapo</i> - nuevo
Tratamiento de irradiancia	2.51 (1) 0.127	0.23 (1) 0.634	1.24 (1) 0.287	52.82 (1) <b>0.000*</b>
Tiempo de incubación	26.24 (2) <b>0.000*</b>	26.51 (2) <b>0.000*</b>	0.77 (1) 0.397	11.39 (1) <b>0.005*</b>
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.89 (2) 0.422	0.19 (2) 0.829	1.63 (1) 0.225	0.44 (1) 0.520



**Figura III.23.** Composición en isótopos estables de carbono, expresada en tanto por mil y calculada respecto al estándar de Belemnita PeeDee, hallada en muestras de tejido foliar maduro parte superior) y nuevo (parte inferior), en individuos de ambas especies sometidos a los tratamientos de luz previstos en el experimento. Las muestras se recolectaron al inicio del experimento (sólo tejido maduro) y a los dos y cinco meses desde su inicio. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo o entre tratamientos. Obsérvese la diferencia de escala.



**Figura III.24.** Discriminación de isótopos estables de carbono, calculada conforme a Farquhar *et al.* (1989), hallada en muestras de tejido foliar maduro (parte superior de la gráfica) y “nuevo” (inferior), en individuos de ambas especies sometidos a los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento. Las muestras se recolectaron al inicio del experimento (sólo tejido maduro) y a los dos y cinco meses desde su inicio. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo o entre tratamientos de irradiancia. Nótese la diferencia de escala.

### **III.4. Discusión.**

#### *III.4.1. Patrones de distribución de biomasa y su relación con la estrategia vital de la especie.*

La luz afecta tanto al desarrollo y la morfología del tejido foliar como al patrón morfológico de distribución de la biomasa (Canham *et al.* 1996, Niinemets, 1998; Lambers *et al.* 1998; Fownes y Harrington, 2004), quedando sus efectos reflejados en las variables alométricas de uso común en la caracterización de especies forestales (**Tabla II.1**). Así, se ha constatado que la aplicación de niveles de irradiancia altos durante el desarrollo de las hojas puede incrementar el ratio LMA (*leaf mass per unit area*) (Givnish, 1988), dado que en este caso no es necesario intentar maximizar la captación de luz. Y sin embargo, la fracción LBR puede disminuir (Niinemets, 1998), incrementarse o mantenerse invariable (Sanford *et al.* 2003) ante cambios en los niveles de luz incidente, a pesar de que tradicionalmente se haya planteado la hipótesis de una inversión proporcionalmente mayor en el compartimento de biomasa foliar a bajos niveles de irradiancia, y menor a niveles de irradiancia altos (Givnish, 1988). En el caso de individuos juveniles de especies forestales situados en el sotobosque, la inversión de recursos en la producción de tejido foliar constituiría una estrategia para maximizar la capacidad de fijación de C, y por ende, sus probabilidades de supervivencia bajo condiciones lumínicas deficitarias. En estas condiciones de escasa irradiancia se tiende a la producción de unas hojas más finas (Reich *et al.* 1998), y tiene lugar asimismo una menor inversión en RMR (aunque se tiende hacia una morfología más gruesa de las raíces; Reich *et al.* 1998) y una mayor inversión en biomasa de tallos (SMR, *stem mass ratio*) (Reich *et al.* 1998). A niveles altos de irradiancia, por el contrario, se produce un incremento del ratio R/S (Niinemets, 1998), porque la fotosíntesis no está limitada por la luz y los individuos pueden destinar una parte proporcionalmente mayor de sus recursos a estructuras que impliquen elevados costes de respiración, como es el caso de las raíces (Givnish, 1988; Canham *et al.* 1996; Niinemets, 1998). Este patrón, no obstante, está en cualquier caso modulado por el grado de tolerancia a la sombra (Fownes y Harrington, 2004), hallándose en ocasiones una mayor inversión en biomasa foliar en especies intolerantes a la sombra (Walters y Reich, 1999).

Por otro lado, la distribución de la biomasa de cada individuo en distintos compartimentos también se encuentra muy influenciada por la edad y el porte del mismo, planteándose originariamente la hipótesis de que, a medida que se incrementa el tamaño de un individuo, se incrementa asimismo el ratio entre la biomasa de tejido no fotosintético (NPT, *non-photosynthetic tissue*) y la biomasa de tejido con capacidad fotosintética (PT) (Givnish, 1988). Esta hipótesis fue posteriormente refrendada por la teoría del modelo de tubería (Perttunen, 1998), que sostiene que cualquier incremento en el área foliar expuesta (lo que sucede a medida que un individuo en un estadio temprano crece y se desarrolla hasta convertirse en un ejemplar adulto) incrementa a su vez, y de forma exponencial, el área superficial que se necesita para el transporte de agua necesario, e incrementará por tanto en mayor medida el volumen de *NPT* frente al de *PT* (Delagrange, 2004). Así, existen trabajos de investigación en los que se ha comprobado que, a medida que aumentaba el tamaño de los individuos, se producía por lo general una disminución de la inversión en biomasa foliar y de raíces, y un incremento en proporción en la biomasa de tallos (Niinemets, 1998) o al menos el incremento del ratio *NPT/PT*, en especies de coníferas forestales (Claveau *et al.* 2002).

En nuestro caso, las diferencias halladas entre ambas especies, en lo que respecta a la distribución inicial de la biomasa en distintos compartimentos y a la distinta evolución experimentada por los individuos al ser sometidos a los mismos tratamientos de irradiancia, parecen derivar tanto del distinto grado de tolerancia a la sombra en ambas especies como de las diferencias en el porte de los individuos de las mismas. Así, dado que los individuos empleados eran de edad similar, y habían permanecido un tiempo considerable bajo las mismas condiciones lumínicas (ver **Sección II.1**), la mayor inversión en biomasa subterránea de *A. alba* y su mayor ratio *NPT/PT* parecen ser consecuencia del mayor porte de los individuos de esta especie (**Figura II.1**). Por su parte, la mayor proporción de biomasa aérea y foliar en *A. pinsapo* estaría relacionada con el menor porte de sus individuos, y con un *a priori* menor grado de tolerancia a la sombra, que explicaría asimismo el menor valor del ratio SLA encontrado en esta especie.

En general, la evolución temporal observada en *Abies pinsapo* es acorde a lo que cabría esperar del normal desarrollo del proceso de aclimatación a dos niveles de irradiancia, con una mayor inversión en biomasa aérea en el tratamiento a baja irradiancia frente a una mayor inversión en biomasa subterránea en el tratamiento a alta irradiancia. No obstante, la ruptura de la dominancia apical bajo sendos tratamientos de

luz sugeriría que ambos son percibidos por los individuos de esta especie como insuficientes, lo que promovió el incremento del grado de ramificación de tallos y ramitas en busca de otras fuentes de luz. La mayor inversión en raíces gruesas frente a finas, registrada en individuos de ambos tratamientos, además de ser característica de la aclimatación a niveles de irradiancia inferiores (Reich *et al.* 1998), indicaría asimismo que el estatus hídrico de todos los individuos de *A. pinsapo* fue adecuado y similar, sin observarse una tendencia a incrementar el volumen de suelo explorado.

En el caso de *Abies alba*, el hecho de que no se hallasen diferencias entre tratamientos, y el conjunto de resultados obtenidos (una menor inversión en biomasa de raíces y una mayor inversión en biomasa aérea, tanto foliar como de tallos; la ruptura de la dominancia apical) sugieren que ambos niveles de irradiancia no fueron lo suficientemente altos para los individuos de esta especie, por lo que se destinó una parte proporcionalmente mayor de recursos a la mejora de la captación de la luz recibida y la búsqueda de otras fuentes de luz. Estos resultados, indicativos del desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores a las condiciones de preincubación experimentadas por estos individuos, son en principio incoherentes con el mayor grado de tolerancia a la sombra de esta especie en comparación con *A. pinsapo*, y podrían ser consecuencia indirecta del mayor porte de estos individuos, que habría hecho disminuir sensiblemente la cantidad de irradiancia efectivamente recibida por cada individuo al promover un efecto de autosombreo. Por su parte, y al igual que en el caso de *A. pinsapo*, no se tendió hacia un incremento en el volumen de suelo explorado por raíces finas, lo que indicaría nuevamente que el estatus hídrico de los individuos de ambos tratamientos fue adecuado en todo momento.

#### *III.4.2. La inversión en equipo pigmentario como mecanismo de aclimatación a la luz.*

El tamaño y la composición del equipo pigmentario constituyen un rasgo característico de cada especie, que se encuentra asimismo influenciado por las condiciones lumínicas particulares que experimenten los individuos localizados en un determinado ambiente. Así por ejemplo, cuando los niveles de irradiancia son bajos, como en el sotobosque, los individuos tienden a invertir más recursos en su equipo pigmentario, para aumentarlo y diversificarlo, al objeto de maximizar la fijación de carbono a las distintas longitudes de onda que puedan recibir, toda vez que el filtrado de los rayos de sol a través del dosel hace que la luz pueda ser de hasta cinco colores distintos (Endler, 1993). Por ello, es de

esperar en hojas aclimatadas a la sombra una mayor inversión del nitrógeno foliar en pigmentos accesorios pero sobre todo en la construcción de complejos antena captadores de luz o LHCP (*light harvesting chlorophyll-binding proteins*) (Terashima y Evans, 1988), además de un menor ratio entre las concentraciones de clorofila a y b (Evans, 1988; Demmig-Adams, 1998), debido a que estas hojas tienen en proporción una mayor inversión de clorofila en estos complejos captadores de luz, y éstos contienen grandes cantidades de clorofila b (Lichtenthaler y Babani, 2004).

Por el contrario, a altos niveles de irradiancia, la luz deja de ser un factor limitante para la fotosíntesis, y ésta pasa a estar limitada por la capacidad de carboxilación del individuo (Lambers *et al.* 1998). En esta situación, los individuos pueden destinar una parte proporcionalmente mayor del nitrógeno foliar a la síntesis de Rubisco (Niinemets y Tenhunen, 1997), por lo que es de esperar un incremento en la capacidad de carboxilación, y por ende, de la tasa máxima de fotosíntesis. Además, las hojas aclimatadas a altos niveles de irradiancia tienen también una mayor capacidad de disipar el posible exceso de energía a través de la modulación del ciclo de las xantofilas (Björkman y Demmig-Adams, 1994; Demmig-Adams y Adams, 1994; Demmig-Adams *et al.* 1995). Así, las hojas de sol exhiben típicamente mayores tamaños de *pool* de los pigmentos componentes de este ciclo (violaxantina, anteraxantina y zeaxantina) (Thayer y Björkman, 1990; Demmig-Adams y Adams, 1992), además de una mayor habilidad para que las transformaciones entre estos compuestos se produzcan a gran velocidad a niveles altos de irradiancia (Demmig-Adams y Adams, 1994; Demmig-Adams *et al.* 1995).

En nuestro caso, los resultados obtenidos indican no sólo la existencia de importantes diferencias interespecíficas en lo que respecta a la composición característica del equipo pigmentario, sino también que esta composición se vio modulada por efecto tanto del tiempo de incubación como de los tratamientos de irradiancia aplicados. A este respecto, lo más destacable fue, por un lado, la gran inversión en pigmentos por parte de *A. alba*, cuya concentración de clorofila a y b fue aproximadamente el doble de la hallada en *A. pinsapo*; además, la enorme desproporción existente entre las concentraciones de clorofila b de ambas especies, el menor ratio Chl a: Chl b y la mayor concentración de luteína son consistentes con el hecho de que *A. alba* sea considerada una de las especies forestales europeas más tolerantes a la sombra (Robakowski *et al.* 2003). Por su parte, la inversión de clorofila b en *A. pinsapo*, muy inferior a la de clorofila a, y el menor contenido en pigmentos

accesorios en esta especie frente a *A. alba* sugieren que en el “diseño” de la especie no ha tenido tanta importancia la capacidad de desarrollar una tolerancia a la sombra tan acusada como en el caso de esta última especie, priorizándose la inversión de recursos en clorofila a para maximizar la captación de fotones en condiciones de menor irradiancia.

Por su parte, los resultados obtenidos en muestras de tejido foliar maduro de *A. pinsapo* parecen indicar que, aunque ambos tratamientos de irradiancia fueron percibidos por los individuos de esta especie como notablemente inferiores a los niveles de irradiancia a los que se encontraban expuestos en las instalaciones a la intemperie, éstos no fueron del todo limitantes, lo que les permitió destinar una mayor parte de N foliar a la síntesis de nuevos pigmentos. Esto explicaría el incremento registrado en las concentraciones de la mayoría de pigmentos en la primera parte del experimento. El hecho de que a alta irradiancia se ralentizase este proceso de concentración de pigmentos con el paso del tiempo, sería indicativo de que los individuos adscritos a este tratamiento comenzaran a aclimatare al mismo, lo que les permitió reducir los recursos destinados a la captación de luz. En el tratamiento a baja irradiancia, con niveles de luz característicos notablemente inferiores, la dosis de irradiancia recibida fue insuficiente en todo momento, lo que explicaría el hecho de que se haya registrado una inversión de recursos progresivamente mayor en la producción de pigmentos, al objeto de maximizar la interceptación de la escasa irradiancia recibida de cara a la fotosíntesis. Este hecho debe por su parte interpretarse como un signo de aclimatación a estos niveles de irradiancia más bajos.

En el tejido foliar nuevo las diferencias entre tratamientos de irradiancia fueron incluso más patentes, siendo evidente que la aplicación de sendos tratamientos hubo de modular el proceso de desetiología de estos tejidos. Así, la inversión de recursos en la síntesis de pigmentos fue menor a alta que a baja irradiancia. En este último tratamiento, la maduración del aparato fotosintético se dirigió hacia un mayor tamaño y eficiencia del equipo pigmentario, como demuestran los resultados obtenidos tanto para los pigmentos accesorios como para las clorofilas a y b, y el ratio entre ambas. En cualquier caso, estos resultados apuntan a una mayor plasticidad de este tejido foliar “nuevo” para el desarrollo de un proceso de aclimatación a distintos niveles de irradiancia.

En relación con este último punto, la evolución temporal experimentada por la concentración en clorofila a, así como los resultados obtenidos para el ratio entre la concentración de clorofila a y b, y entre la clorofila a y la suma del resto de pigmentos,

sugieren que, con el paso del tiempo, se tendió a potenciar la inversión de recursos en la síntesis de clorofila a sobre la inversión en pigmentos accesorios, especialmente en las acículas nuevas. Esta estrategia denota *a priori* un claro efecto de sombra neutra, es decir, el efecto puro de la disminución de la cantidad de irradiancia incidente, consecuencia de la aplicación de los tratamientos de irradiancia. Esto permitió evaluar el efecto directo de la cantidad de luz, a diferencia de lo que sucede en condiciones naturales, en las que los individuos de la parte superior del dosel, al interceptar la luz que reciben, alteran tanto la cantidad como la calidad espectral de la misma, que llega a los individuos del sotobosque con un menor ratio rojo: rojo lejano (Kasperbauer 1971; Holmes y Smith, 1977; Ballaré *et al.* 1990).

Por su parte, los resultados obtenidos con las muestras de *Abies alba* nuevamente sugieren que los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia percibieron inicialmente la dosis de irradiancia suministrada como sensiblemente inferior a la que recibían en las instalaciones del Jardín Experimental y que sin embargo, con el tiempo, el mantenimiento de esos niveles de luz permitió a los individuos disminuir la inversión de recursos en la captación de luz en las acículas maduras, y mantenerla en el tiempo en las acículas surgidas en el transcurso del experimento. En el tratamiento a baja irradiancia, la dosis de irradiancia suministrada promovió una mayor inversión de recursos en la producción de pigmentos, de forma especialmente notable en las acículas “nuevas”, para optimizar la fijación de C con los niveles de irradiancia recibidos. En este sentido, es de destacar que en esta especie también se manifestasen, en el mismo plazo de tiempo, los procesos de aclimatación a sendos niveles de irradiancia detectados en *A. pinsapo*.

La evolución temporal experimentada por el contenido en clorofilas a y b, así como por el ratio entre ambas concentraciones, sugieren que, con el paso del tiempo, se tendió a potenciar la inversión de recursos en la síntesis de clorofila a sobre la inversión en otros pigmentos, evidenciándose de nuevo el efecto de sombra neutra. No obstante, a diferencia del caso del pinsapo, en las acículas maduras de *A. alba* se mantuvo la inversión de recursos en clorofila b mientras que disminuyó la inversión en clorofila a, en línea con la composición característica del equipo pigmentario de esta especie. En las acículas “nuevas”, sin embargo, se potenció la síntesis de ambas clorofilas, de forma especialmente notable en el tratamiento a baja irradiancia, lo que explicaría el hecho de que no se hallasen diferencias entre ambas especies en lo que respecta al contenido en clorofila a en este tejido foliar surgido en el transcurso del experimento.

### *III.4.3. La discriminación de isótopos estables de carbono como indicador del estrés por falta de luz.*

Los dos isótopos estables del carbono ( $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ ) se encuentran en proporción 1:99 en la atmósfera. Los tejidos vegetales, sin embargo, se encuentran por lo general enriquecidos en el isótopo ligero respecto a ese ratio, lo que se debe a que, en los distintos procesos físicos y químicos implicados en la síntesis de estos tejidos, se discrimina en contra del isótopo pesado (Farquhar *et al.* 1989).

Los principales factores que determinan la discriminación isotópica durante la fotosíntesis C3 son la difusión en el aire (a través tanto de la capa limítrofe como de los estomas), y la carboxilación que lleva a cabo la enzima Rubisco, aproximándose el valor de esta discriminación ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) al del factor que más fuertemente limite la fotosíntesis en cada momento: por un lado, la difusión en el aire del  $^{13}\text{CO}_2$  es más lenta que la del  $^{12}\text{CO}_2$ , que penetra más fácilmente hacia el mesófilo a través de los estomas; por el otro, la enzima Rubisco reacciona más fácilmente con  $^{12}\text{CO}_2$  que con  $^{13}\text{CO}_2$ , por lo que el primero interviene en mayor medida en las reacciones del ciclo de Calvin.

La contribución de ambos procesos depende en última instancia de la relación entre la conductancia estomática y la fotosíntesis (Ferrio *et al.* 2003), por lo que, en condiciones en las que pueda variar sustancialmente la relación entre ambas variables, puede producirse un cambio notable en la discriminación de isótopos estables de carbono. Así, cuando los estomas se encuentran abiertos y el  $\text{CO}_2$  difunde con facilidad desde la atmósfera hasta los espacios intercelulares, la actividad de la enzima Rubisco no se ve limitada por el flujo de  $\text{CO}_2$ , y el valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  se aproxima a la discriminación debida a la carboxilación. En cambio, cuando la conductancia estomática se reduce y la fotosíntesis se encuentra limitada por el flujo de  $\text{CO}_2$  hacia el interior del mesófilo, el valor de  $\Delta$  se aproxima a la discriminación debida a la difusión.

Por ello, existen distintos factores ambientales que pueden modificar la composición en isótopos estables, ya sea a través de su influencia sobre la conductancia foliar, sobre la fotosíntesis o sobre ambas variables simultáneamente (Ferrio *et al.* 2003), como cambios en el suministro hídrico, el nivel de irradiancia incidente, la temperatura o la concentración de  $\text{CO}_2$  entre otros. Así, por ejemplo, cuando se produce una disminución en la cantidad de agua disponible, las especies vegetales típicamente

reaccionan limitando la apertura de los estomas para minimizar la pérdida de agua (**Figura III.25**), y aunque la tasa de carboxilación disminuye también en estas condiciones de estrés hídrico, la conductancia foliar se ve afectada en mayor medida, lo que origina una reducción en la presión parcial de CO<sub>2</sub> en los espacios intercelulares (al limitarse la renovación del aire que se encuentra en la cámara subestomática), y el consecuente incremento en  $\delta^{13}\text{C}$  (Farquhar *et al.* 1989).

En nuestro caso, no obstante, no es posible relacionar las diferencias interespecíficas halladas con el desarrollo de un proceso de estrés hídrico, dado que ambas especies se mantuvieron bajo un adecuado suministro hídrico tanto durante su estancia en el Jardín Experimental como durante su participación en el experimento. Y tampoco pueden relacionarse con cualquier otro de los factores mencionados, dado que estas diferencias en la composición isotópica del tejido foliar se hallaron incluso en el momento inicial, y se mantuvieron consistentemente en el tejido foliar maduro y “nuevo”, tanto en este experimento como en el que detalla en el **Capítulo 4** de esta memoria, en que se evaluó asimismo la evolución de esta variable (ver **Secciones IV.3.3** y **IV.4.2**). Por el contrario, estas diferencias parecen deberse al distinto grado intrínseco de control de la apertura estomática en ambas especies, pudiendo concluirse, a la vista de los resultados obtenidos, que este control es más estrecho en *A. alba*, y que el hecho de que en esta especie se hayan encontrado en todo momento mayores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (tejido foliar menos empobrecido en el isótopo pesado) sería indicativo de la existencia de menores tasas de transpiración y de un mayor ratio entre las tasas de fotosíntesis neta (fijación de carbono) y de conductancia estomática al agua en esta especie. En *A. pinsapo*, por el contrario, se produjo en todo momento una mayor discriminación contra el isótopo pesado, generándose tejidos empobrecidos en el mismo, lo que sería indicativo de una mayor transpiración, y de un menor ratio entre la tasa de fotosíntesis neta y la tasa de conductancia estomática al agua.

Por otro lado, dado que la composición isotópica del tejido foliar es indicativa en última instancia de la proporción entre ambas tasas, proporciona asimismo una medida integrada de la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE, *intrinsic water use efficiency*) durante el tiempo en que se ha asimilado el carbono que forma parte de dichos tejidos (Ehleringer, 1993). En este sentido, los resultados apuntan a una mayor eficiencia en el uso del agua por parte de *A. alba*, y a una menor eficiencia en el uso del agua por parte de *A. pinsapo*, en contra de lo que cabría esperar *a priori* de una especie

supuestamente adaptada a condiciones ambientales típicamente mediterráneas caracterizadas fundamentalmente por una marcada sequía estival.

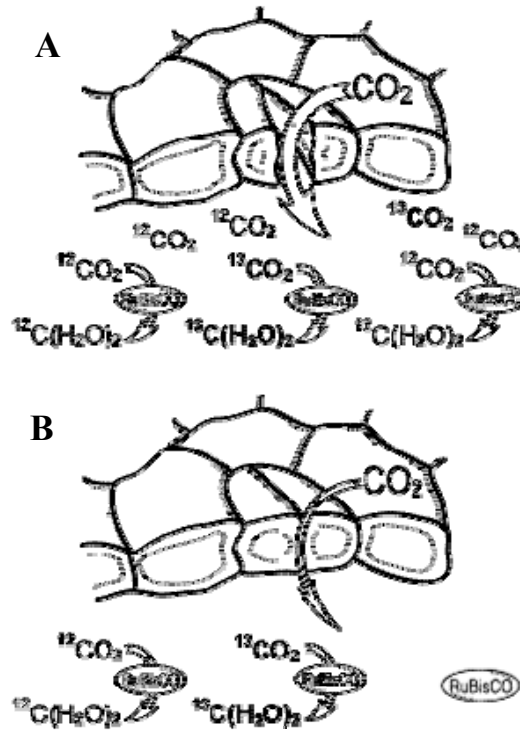
La mayor discriminación contra el isótopo pesado que tuvo lugar con el paso del tiempo (tendencia hacia una menor eficiencia en el uso del agua), además de reforzar la hipótesis de que los individuos participantes en el experimento contaron en todo momento con un adecuado suministro hídrico, revelaría que, bajo ambos tratamientos de irradiancia, tuvo lugar un descenso del ratio entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua. Esto indicaría que, en comparación con las condiciones previas al experimento, reflejadas también en la composición isotópica foliar de este tejido maduro, los niveles de irradiancia de los tratamientos aplicados constituyeron un *input* energético inferior al experimentado antes del inicio del experimento, lo que hizo reducir severamente las tasas de fotosíntesis neta. Y que, no obstante, los niveles de conductancia estomática no se vieron afectados en la misma medida y se mantuvieron en valores superiores a los que cabría esperar considerando los bajos niveles de irradiancia recibidos, poniéndose así de manifiesto que en individuos de ambas especies se dieron tasas de conductancia estomática mayores de lo que cabría esperar considerando los bajos niveles de irradiancia recibidos, maximizando la fijación de C, lo que provocó el descenso de su eficiencia en el uso del agua (**Figura III.26**).

Por su parte, la mayor discriminación hallada por lo general en el tejido sintetizado *de novo* de ambas especies, similar al efecto del tiempo de incubación sobre el tejido foliar maduro, reforzaría la hipótesis de que las condiciones de luminosidad características de ambos tratamientos, y especialmente las de baja irradiancia para *A. pinsapo*, desencadenaron un estrés por déficit energético que provocó un incremento en la eficiencia en el uso de la luz, incluso suponiendo estos cambios un descenso en la eficiencia en el uso del agua. Además, este resultado sugiere que en este tejido foliar en crecimiento existe por lo general un menor grado de ajuste entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática al agua (e.g. Fort *et al.* 1997), priorizándose la fijación de C para crecimiento sobre la aplicación de un estricto control de la apertura estomática (Field, 1987; Lambers *et al.* 1998), especialmente en condiciones de adecuado suministro hídrico, como es el caso. Por otro lado, los resultados obtenidos en estas muestras también indican, como en el caso del tejido foliar maduro, una mayor discriminación contra el isótopo pesado en *A. pinsapo*, poniéndose de nuevo de manifiesto las mayores tasas de conductancia estomática en esta especie, y en

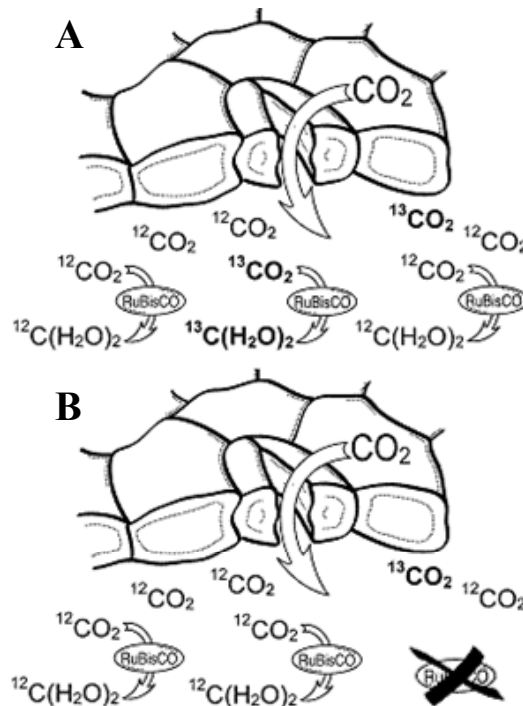
consecuencia la menor eficiencia intrínseca en el uso del agua en comparación con *A. alba*.

Por todo lo anterior, los cambios detectados en la discriminación contra el isótopo pesado, especialmente significativa en el tejido foliar “nuevo”, apuntan al desarrollo de procesos directamente relacionados con las condiciones lumínicas en que dichos individuos se encontraron, similares a los descritos en trabajos previos (ver, por ejemplo, Vogel (1978), Zimmerman y Ehleringer (1990), Broadmeadow *et al.* (1993), O'Leary (1995), o Yakir e Israeli (1995)), que evidenciaron que la luz afecta directamente a  $\delta^{13}\text{C}$ , al menos cuando este factor es limitante (Ferrio *et al.* 2003). De esta forma, las medidas de discriminación isotópica no sólo sirven para caracterizar la eficiencia en el uso del agua de los individuos y los efectos del estrés hídrico, sino que también pueden emplearse como un indicador del estrés por falta de luz, siempre que se den condiciones que permitan una buena conservación del estatus hídrico (**Figura III.26**).

Cuando se produce la aclimatación de individuos a bajos niveles de irradiancia, la respuesta que cabe esperar es una disminución en las tasas máximas de asimilación neta de carbono (fotosíntesis neta), como consecuencia del descenso en el *input* energético necesario para dicho proceso y la menor inversión de recursos en la síntesis de Rubisco frente a la construcción de complejos antena. Por el contrario, los individuos aclimatados a alta irradiancia tienden a incrementar su capacidad fotosintética, dado que la luz deja de ser un factor limitante y se aumenta la capacidad de asimilación de C mediante el incremento en la producción de Rubisco. Esto se traduce en tasas instantáneas de fotosíntesis neta superiores a las encontradas en individuos aclimatados a baja irradiancia.



**Figura III.25.** Esquema simplificado de la relación conductancia estomática -  $\delta^{13}\text{C}$  (tomado de Ferrio *et al.* 2003). En ausencia de estrés hídrico, tiene lugar una mayor discriminación contra el isótopo pesado (A). El cierre estomático provocado por la situación de estrés hídrico (B) promueve el uso del isótopo pesado.



**Figura III.26.** La posible relación entre  $\delta^{13}\text{C}$  y un déficit energético por falta de luz (modificado a partir de Ferrio *et al.* 2003). Frente a un primer caso (A), en el que las condiciones de luz son apropiadas, la falta de luz (B) ralentiza la fotosíntesis al no haber suficiente activación de la Rubisco. El individuo trata de compensar la falta de luz manteniendo los estomas abiertos aún a costa de perder una mayor cantidad de agua por unidad de C fijado, discriminando así en mayor medida en contra del isótopo pesado.

#### *III.4.4. Capacidad de fijación de C y eficiencia potencial en el uso de recursos.*

La aclimatación a distintos niveles de irradiancia también modifica los parámetros fotosintéticos, siendo de esperar en individuos aclimatados a alta irradiancia una menor eficiencia fotosintética (la pendiente inicial de la curva P-I), ya que en ellos debe ser menor la “apetencia” por el sustrato de la enzima (Larcher, 1995). Además, la tasa de respiración en oscuridad tiende a ser mayor, como consecuencia de los costes energéticos derivados de la inversión en Rubisco y la mayor inversión en biomasa de estructuras con elevados gastos respiratorios, como las raíces (Givnish, 1988; Canham *et al.* 1996; Niinemets, 1998), y el punto de compensación para la luz, más alto (Pearcy y Sims, 1994), debido a la menor inversión en complejos captadores de luz. Por el contrario, en individuos aclimatados a niveles de irradiancia bajos, para los cuales, por tanto, la luz puede convertirse en un factor limitante, cabe esperar el comportamiento inverso, siendo típica una mayor inversión del nitrógeno foliar en la construcción de complejos antena (lo que produce una disminución en el punto de compensación para la luz) y menor en Rubisco, lo que hace que la tasa de respiración en oscuridad no sea tan negativa y se produzca simultáneamente una disminución tanto del punto de saturación para la luz como de las tasas máximas de fotosíntesis neta. Por lo anterior, son notablemente distintas las curvas P-I obtenidas en especies de sol y de sombra o con distinta tolerancia a la sombra, e incluso entre individuos de la misma especie desarrollados bajo distintas condiciones lumínicas. En estos casos, la eficiencia suele mantenerse sin cambios, al ser un rasgo mucho más conservativo (Lambers *et al.* 1998).

En los resultados de este experimento las medidas de intercambio gaseoso registradas periódicamente no pueden emplearse directamente para conocer como se desarrolló el proceso de aclimatación a los niveles de irradiancia previstos. Ello se debe a que, durante el desarrollo del experimento, se produjeron dificultades logísticas asociadas al sistema de incubación y medida. Así, y únicamente de forma puntual durante la toma de estas medidas instantáneas, los niveles de CO<sub>2</sub> ambiental se mantuvieron especialmente elevados con respecto a los mantenidos en el periodo de incubación, siendo por ejemplo las tasas de fotosíntesis registradas notablemente superiores a las exhibidas típicamente por estas especies al aire libre. Esto implica que las medidas de fotosíntesis neta y conductancia estomática corresponden a condiciones de adecuado suministro hídrico y niveles de CO<sub>2</sub> saturantes. Además, estas tasas de

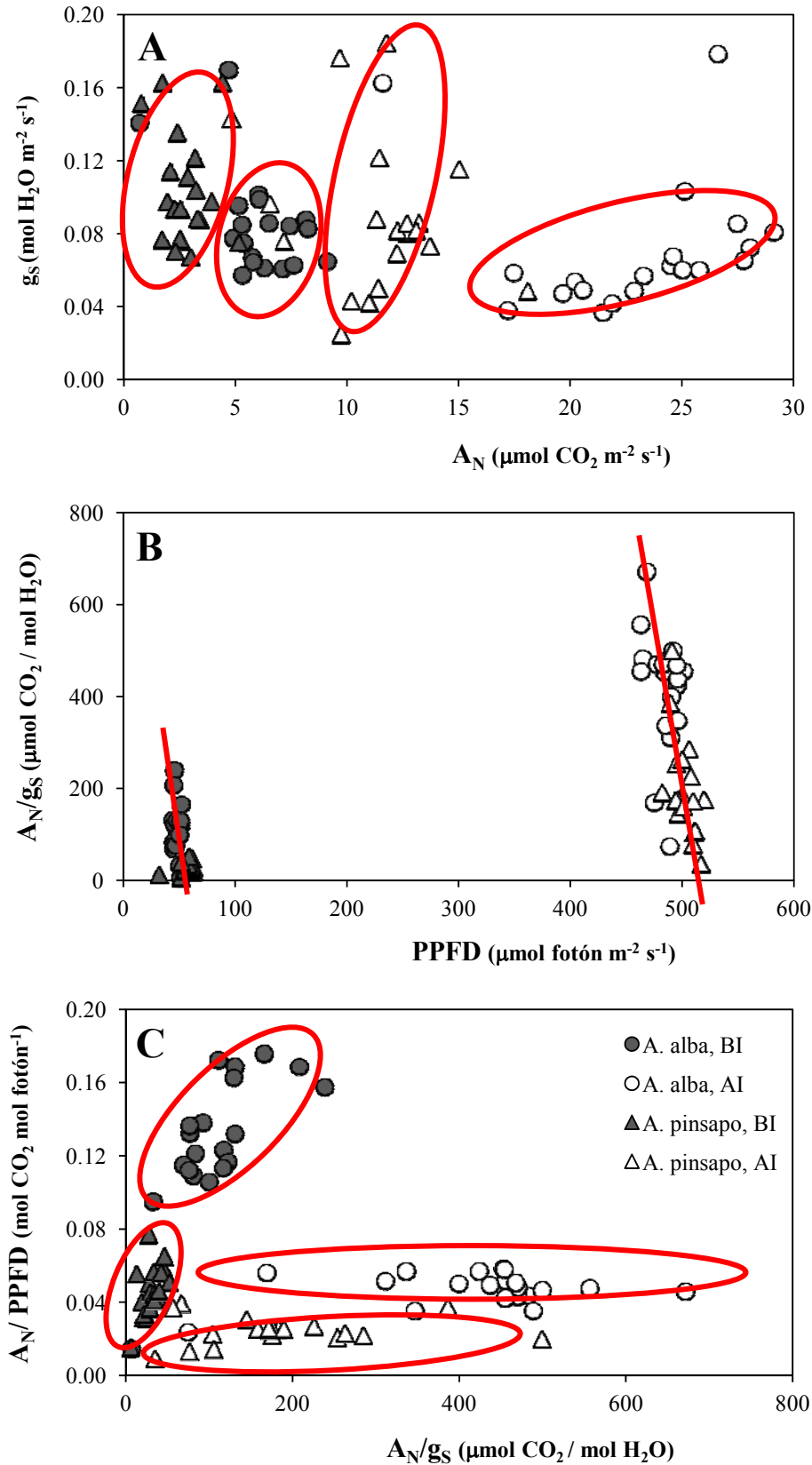
intercambio gaseoso no pudieron corregirse por el área foliar debido al extravío de los datos de dicha variable, por lo que las diferencias entre especies pueden deberse a la distinta área foliar empleada para el registro de estas variables. Así, las mayores tasas de esta fotosíntesis neta “potencial” registradas en *A. alba* serían consecuencia de la mayor área foliar empleada en esta especie. En cualquier caso, tanto las tasas de fotosíntesis como las de conductancia están afectadas, en la misma medida, por dicha área foliar, por lo que los cambios en las proporciones entre las mismas, así como el ratio entre ambas (la eficiencia “potencial” en el uso del agua), pueden considerarse útiles para evaluar diferencias entre especies. Por ello, el hecho de que en *A. pinsapo*, a pesar de ser la especie en la que se empleó una menor área foliar, se registrasen simultáneamente menores valores de fotosíntesis y en cambio valores de conductancia estomática similares a los registrados en *A. alba* (**Figura III.4**), da idea de un mayor grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua en esta última especie y, por ello, de una mayor eficiencia intrínseca en el uso del agua, además de poner de manifiesto la gran diferencia existente entre ambas especies en lo que respecta a este rasgo.

Por otro lado, y considerando distintos resultados obtenidos en este mismo capítulo, la disminución de la tasa de conductancia estomática en ambas especies y tratamientos de irradiancia no parece deberse al desarrollo de una situación de estrés hídrico (ver **Secciones III.4.1** y **III.4.3**), sino que podría derivarse únicamente de los altos niveles de CO<sub>2</sub> ambiental existentes en el momento de tomar las medidas, que indujeron un cierre parcial de los estomas como respuesta directa de las células guarda ante el incremento en la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> (Saxe *et al.* 1998). No obstante, las diferencias entre tratamientos de irradiancia halladas a este respecto, y la existencia de mayores valores de conductancia estomática en el tratamiento a baja irradiancia, son coherentes con los resultados discutidos en la citada **Sección III.4.3**. Por otro lado, el incremento en la eficiencia en el uso del agua recogido en la **Figura III.5A** no parece sino un artefacto, fruto de la sobreestimación de las tasas de fotosíntesis neta y del descenso progresivo de los valores de conductancia registrados en paralelo.

Finalmente, es de destacar que en estas condiciones “ideales” de adecuado suministro hídrico y de niveles de CO<sub>2</sub> ambiental próximos a la saturación, el comportamiento de los individuos de ambas especies adscritos a sendos tratamientos de irradiancia fuese claramente distinto (**Figura III.27A**), siendo éstos decisivos para el

desarrollo de una menor o mayor eficiencia potencial en el uso del agua (**Figura III.27B**). Al considerar conjuntamente la eficiencia potencial en el uso de ambos recursos, se aprecia el distinto rango de variación en que se desarrollaron los individuos de ambas especies y tratamientos (**Figura III.27C**), poniéndose de manifiesto una vez más las evidentes diferencias intrínsecas existentes entre ambas especies.

En lo que respecta a los parámetros fotosintéticos derivados de las curvas P-I obtenidas, es de destacar, por un lado, que las diferencias interespecíficas halladas sean consistentes con los resultados que cabría esperar, considerando el distinto grado de tolerancia a la sombra de ambas especies. Así, en *A. alba*, se halló el menor punto de compensación para la luz y de saturación para este mismo factor (**Figura III.6**), además de menores tasas de fotosíntesis potencial y neta, y unas tasas de respiración en oscuridad no tan negativas como en el caso de *A. pinsapo*. Sin embargo, no se detectaron diferencias en lo que respecta a la eficiencia en el uso de la luz, el rasgo más conservativo en las curvas P-I, lo que no es de extrañar considerando que se trata de dos especies de abetos estrechamente emparentadas desde el punto de vista filogenético. Por otro lado, la evolución temporal experimentada por estos parámetros sugiere, en consonancia con otras secciones de esta discusión, el desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores (ver **Secciones III.4.1, III.4.2 y III.4.3**), lo que explicaría el descenso experimentado por las tasas de fotosíntesis máxima y neta (**Figura III.7**), la tendencia hacia tasas de respiración en oscuridad menos negativas (**Figura III.8**) y el descenso experimentado por el punto de saturación para la luz y el punto de compensación para la luz, especialmente en *A. pinsapo* (**Figura III.9**). Para la eficiencia fotosintética, sólo se encontraron diferencias con el tiempo en los individuos de *A. pinsapo* (**Figura III.8**), la especie *a priori* menos tolerante a la sombra, que experimentaron un incremento en la misma debido a esa aclimatación a bajos niveles de irradiancia.

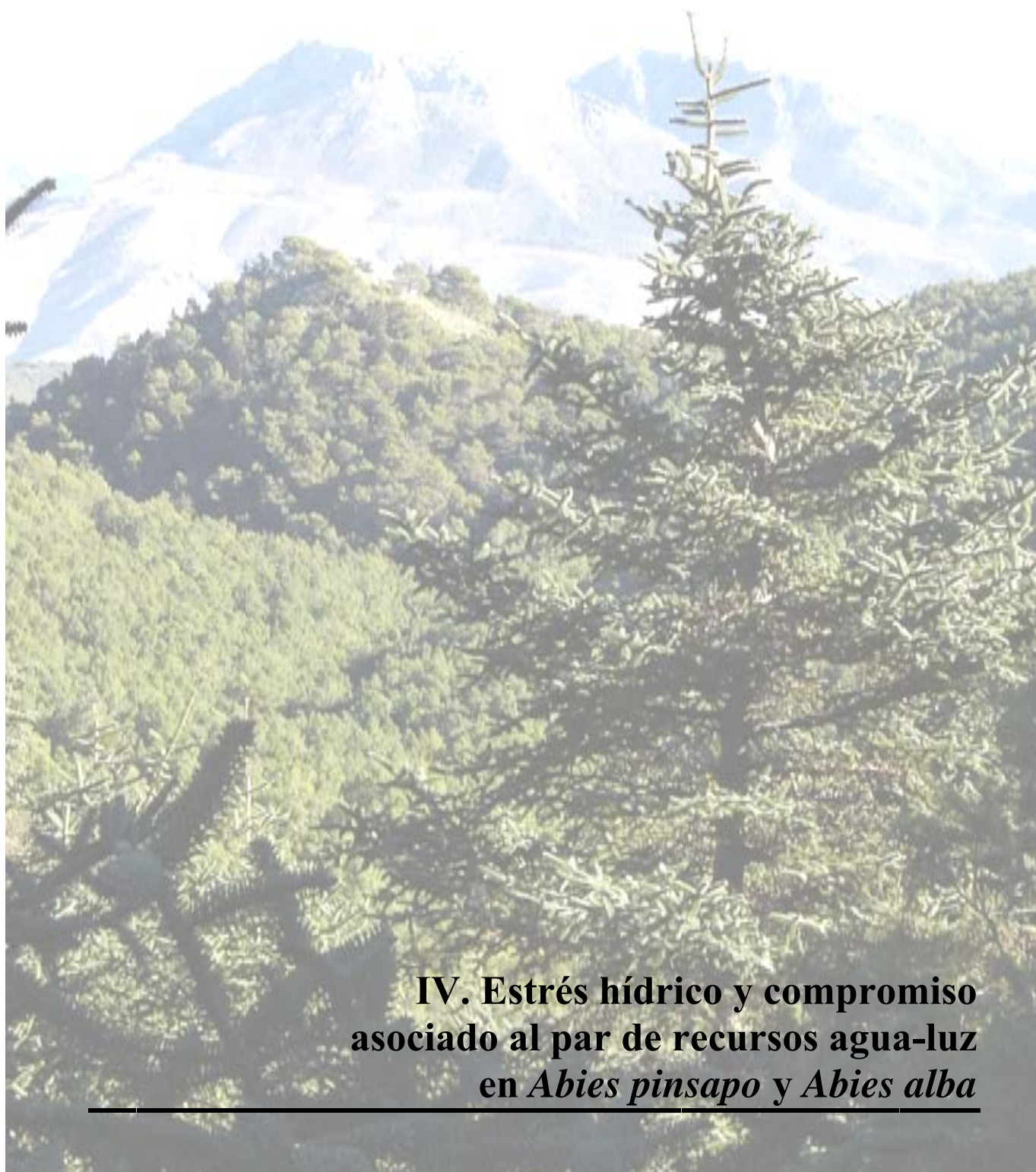


**Figura III.27.** Relación entre las tasas registradas de fotosíntesis neta “potencial” y conductancia estomática al agua (A), entre la eficiencia “potencial” en el uso del agua y la irradiancia registrada simultáneamente (B) y entre la eficiencia “potencial” en el uso de la luz y la eficiencia en el uso del agua (C), en individuos de ambas especies sometidos a los tratamientos de irradiancia de incubación previstos en el experimento.

### III.5. Conclusiones.

- El seguimiento de las tasas instantáneas de intercambio gaseoso permitió comprobar la importancia de controlar los niveles de CO<sub>2</sub> ambiental y la necesidad de incluirlos, en la medida de lo posible, en el diseño de cualquier experimento proyectado para conocer el comportamiento de las especies vegetales en el contexto del cambio global.
- Los resultados de los parámetros fotosintéticos de las curvas P-I son coherentes tanto con el distinto grado de tolerancia a la sombra mencionado en trabajos previos para ambas especies como con el desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores por parte de las mismas.
- El patrón de asignación de recursos estuvo influido en ambas especies por las diferencias iniciales en el porte de los individuos empleados en el experimento. Existió una evolución temporal similar en ambos casos en dichos patrones, que se tradujo en una mayor inversión de recursos en el compartimento de biomasa foliar.
- La mayor concentración de pigmentos y el menor ratio Chl a : Chl b hallados en *A. alba* sugieren una mayor inversión de N foliar en la construcción de complejos antena, rasgo característico de una especie típicamente de sombra.
- La evolución observada en ambas especies en su equipo pigmentario apuntaría al desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia incidente artificialmente inferiores a los experimentados previamente.
- Los resultados obtenidos en lo que respecta a las medidas de intercambio gaseoso registradas y la discriminación contra el isótopo pesado de carbono sugieren la existencia de un menor grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua en *A. pinsapo*, mostrando por ello esta especie menor eficiencia en el uso del agua que *A. alba*.
- El valor de discriminación isotópica puede ser empleado como un indicador del estrés por déficit energético, en condiciones en las que pueda garantizarse una buena conservación del estatus hídrico y siempre que el nivel de irradiancia incidente sea el único factor ambiental con carácter limitante.





**IV. Estrés hídrico y compromiso  
asociado al par de recursos agua-luz  
en *Abies pinsapo* y *Abies alba***

---



## **IV. Estrés hídrico y compromiso asociado al par de recursos agua – luz en *Abies pinsapo* y *Abies alba*.**

*Este capítulo aborda el segundo de los experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas, cuyos principales objetivos fueron dos: el seguimiento del desarrollo de un proceso de estrés hídrico severo, a fin de conocer la velocidad y forma en que los efectos del mismo se manifestaban en individuos juveniles de ambas especies; y la exploración del trade-off existente en el par de recursos agua vs. luz, mediante la aplicación de distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego. Para ello, se procedió a la evaluación de variables relacionadas con el intercambio gaseoso, el estatus hídrico y la eficiencia en el uso tanto del agua como de la luz, con la intención de poder concluir sobre si ambas especies difieren en su capacidad de respuesta frente a cambios en la disponibilidad de estos recursos clave, y si estas diferencias confirman el carácter “templado” o “mediterráneo” atribuido a estas especies.*

### **IV.1. Introducción.**

#### *IV.1.1. Marco conceptual.*

El agua es un factor ecológico clave para los organismos vegetales, no sólo por el papel crucial que juega en distintos procesos fisiológicos, como el transporte de metabolitos a través de la célula o entre distintos órganos de la planta, o por su contribución a la estructura y soporte de estos organismos, sino también porque se requiere en grandes cantidades (Lambers *et al.* 1998). Ello se debe fundamentalmente al uso ineficiente que se hace de la misma como consecuencia inevitable de la fotosíntesis (Lambers *et al.* 1998): el vapor de agua difunde de forma pasiva a través de los estomas hacia el exterior, cuando éstos se abren para permitir la entrada del CO<sub>2</sub> necesario para la realización de la fotosíntesis, hasta el punto de que, en el caso de las plantas terrestres, más del 90% del agua que necesitan a lo largo de su ciclo de vida se pierde indirectamente por transpiración (Xu *et al.* 2009). Por ello, la disponibilidad de este recurso se considera el principal factor ambiental limitante de la fotosíntesis vegetal a nivel global (Boyer, 1982).

Esta circunstancia resulta especialmente crítica en regiones áridas y semiáridas, en las que la distribución natural de las plantas leñosas está fuertemente influenciada

por la resistencia de las plántulas a la sequía (Zhang *et al.* 2005). En el caso del pinsapo, aunque la precipitación anual es elevada, las condiciones de estacionalidad mediterránea a que se encuentra sometido comprometen fuertemente la supervivencia de sus plántulas y juveniles en campo, especialmente durante el verano (Arista, 1994). Es por ello que, como parte fundamental de una aproximación ecofisiológica al estudio de la especie, se ha incluido una experiencia de estrés hídrico intenso, al objeto de conocer cómo responde el pinsapo en esta situación, cómo se manifiesta el estrés de este tipo en la especie y si la misma es capaz de manejarse con éxito o no en una situación de esta índole.

Las respuestas adaptativas y de acomodación al régimen hídrico se basan en cambios fisiológicos y morfológicos, tales como variaciones en la estructura de la planta o en su tasa de crecimiento, en el potencial osmótico de sus tejidos, en la conductancia estomática, etc. (Nilsen y Orcutt, 1996; Jones, 1992; Larcher, 1995; Lambers *et al.* 1998), pudiendo desarrollarse distintas estrategias para minimizar el impacto del estrés, como la pérdida de hojas para reducir la superficie foliar a través de la que se pierde agua (Pereira y Chaves, 1993; Gindaba *et al.* 2004) o la reducción del potencial hídrico antes de amanecer, reduciendo a su vez el intercambio gaseoso (Pereira *et al.* 1986; Kramer y Boyer, 1995; Nilsen y Orcutt, 1996; Lambers *et al.* 1998).

Uno de los primeros efectos del déficit hídrico es el descenso de la asimilación fotosintética de carbono, resultado de la limitación al intercambio gaseoso por parte de del mesófilo y de los propios estomas (Lawlor, 2002; Flexas *et al.* 2004). Sin embargo, el grado de depresión inducida por la sequía en la fotosíntesis, y sus causas subyacentes, pueden depender de la sobreimposición de otras condiciones ambientales estresantes (Chaves, 1991). Dado que, en condiciones naturales, los episodios de estrés hídrico van a menudo acompañados de niveles de irradiancia altos, numerosos estudios han investigado la relación entre la irradiancia alta y la sequía. Y aunque algunos no hallaron ningún tipo de interacción (e.g. Ögren y Öquist, 1985), la mayoría han puesto de manifiesto que las limitaciones hídricas predisponen al aparato fotosintético a la fotoinhibición, y que ésta es exacerbada cuando las hojas se encuentran deshidratadas bajo niveles de luz altos (Björkman y Powles, 1984; Masojídek *et al.* 1991; Behera *et al.* 2002).

Por otro lado, la sequía puede concurrir con niveles de irradiancia bajos si el individuo está suprimido o sujeto a elevada competencia. La literatura muestra resultados contradictorios respecto al modo en que la sombra modula la resistencia al

déficit hídrico; así, mientras algunos trabajos encuentran que la sombra tiene un efecto positivo en condiciones de déficit hídrico (Prider y Facelli, 2004; Sánchez-Gómez *et al.* 2006), otros indican lo contrario, al sugerir los resultados que la capacidad de los individuos para soportar la sequía podría verse disminuida en condiciones sombreadas, y no aumentada (hipótesis de la sombra seca) (Valladares y Pearcy, 2002; Aranda *et al.* 2005, Climent *et al.* 2006). En cualquier caso, es evidente que la disponibilidad hídrica y los niveles de irradiancia son factores ecológicos que se encuentran íntimamente ligados a lo largo de los distintos gradientes ambientales que pueden hallarse en condiciones naturales (Sack y Grubb, 2002) , por lo que no tiene sentido estudiar la respuesta de la especie ante cambios en uno de estos factores clave sin considerar cómo esta respuesta puede verse modulada por la influencia del otro factor sobre la misma.

#### IV.1.2. Antecedentes y justificación del estudio.

En trabajos de investigación previos en las instalaciones del Jardín Experimental de la Universidad de Jaén, se llevó a cabo un experimento de anulación del suministro de riego para conocer el comportamiento de individuos juveniles de *A. pinsapo* ante el estrés hídrico severo (Serichol-Escobar, 2005). Los resultados indicaron que las variables relacionadas con el intercambio gaseoso, en lugar de las relacionadas con el mantenimiento del estatus hídrico de cada planta, fueron las primeras en “responder” ante el estrés hídrico, y se concluyó que ese control de la apertura estomática contribuiría a explicar la supervivencia de esta especie en una zona con clima mediterráneo. Pero dicho experimento se desarrolló sin registrar en paralelo la evolución temporal de la humedad del sustrato, y sin someter a los individuos a distintos niveles de irradiancia. Por ello, para poder analizar la respuesta de individuos juveniles ante distintas combinaciones de disponibilidad hídrica y luminosa, se proyectó un nuevo experimento bajo condiciones controladas de irradiancia incidente y humedad en el sustrato (Sack, 2004). Éste incluyó, al igual que en el descrito en el capítulo anterior, individuos juveniles tanto de *A. pinsapo* como de *A. alba*, con el objetivo de dilucidar si la respuesta diferencial que cabe esperar entre ambas especies, en términos de su plasticidad en la utilización de ambos recursos y su capacidad de respuesta ante cambios ambientales, puede observarse también a través del *trade-off* ligado al par de recursos agua – luz.

Por otro lado, al examinar los resultados del **Capítulo 3** relacionados con la discriminación de isótopos estables de carbono, se encontró en individuos de *A. pinsapo* sometidos a baja irradiancia una mayor discriminación contra el isótopo pesado. Dado que estos individuos se encontraron en todo momento bajo condiciones controladas de irradiancia y humedad en el sustrato, los resultados sugieren que en condiciones de escasa luminosidad, y sin que sean limitantes ni el factor hídrico ni el nivel ambiental de CO<sub>2</sub>, los individuos optaron por mantener abiertos los estomas, aún a costa de un descenso en la eficiencia en el uso del agua, a fin de obtener el máximo rendimiento de la escasa luz que reciben. Por ello, es posible establecer la hipótesis de que las medidas de discriminación isotópica no sólo manifiestan el *trade-off* existente entre la fijación de carbono y la conservación del estatus hídrico y sirven para caracterizar la eficiencia en el uso del agua de los individuos, sino que también podrían emplearse como un indicador del estrés por falta de luz, cuando este factor ambiental es el principal limitante.

A la vista de estos resultados, se consideró que el siguiente paso en la comparación entre *A. pinsapo* y *A. alba* habría de ser la exploración específica del *trade-off* en el par de recursos agua – luz, mediante un experimento con tratamientos independientes de irradiancia y riego en el que se evaluase al mismo tiempo el comportamiento de ambas especies. Los resultados así obtenidos contribuirían no sólo a la elaboración del perfil ecofisiológico de *A. pinsapo*, sino también a dilucidar, nuevamente, si las especies de ambientes más méxicos presentan una mayor plasticidad en la utilización de recursos ambientales clave o si, por el contrario, son las especies sometidas al clima mediterráneo, como el pinsapo, las que, al estar sometidas a unas condiciones ambientales más estresantes, presentan por ello una mayor capacidad de respuesta ante cambios en las mismas.

#### *IV.1.3. Hipótesis.*

Considerando los resultados previos antes mencionados, así como la información que se conoce de *A. pinsapo* y de *A. alba*, es aceptable la hipótesis de que ambas especies puedan mostrar una plasticidad diferencial en el uso del par de recursos agua - luz. Y dado que, desde un punto de vista ecológico, el interés actual en la plasticidad fenotípica reside en su valor adaptativo (Chambel *et al.* 2005), en el contexto en que nos hallamos es vital concluir si una mayor plasticidad se traduce en una mayor flexibilidad y

eficiencia en el uso de los distintos recursos, en el sentido de que este uso sea lo más acorde posible a la disponibilidad con que éstos aparecen, y permita el mejor desenvolvimiento de la especie en distintas circunstancias, al asegurar la homeostasis a nivel individual (Chambel *et al.* 2005). Así, en el caso del agua, el individuo capaz de un control estomático más ajustado será el que muestre una mayor plasticidad respecto a este recurso, al lograr que la pérdida de agua adscrita a la conductancia estomática sea lo más baja posible en cada situación. Y en cuanto a la luz, la especie más plástica será aquella capaz de aprovechar mejor la irradiancia recibida para la fijación de carbono (mayores tasas máximas de fotosíntesis neta, mayor eficiencia en el uso de la luz o LUE, del inglés “*light use efficiency*”: carbono fijado por cantidad de irradiancia recibida). Pero en términos comparativos, la especie con mayor plasticidad en el uso de ambos recursos será aquella que consiga maximizar la eficiencia en el uso de ambos recursos para cada combinación concreta de disponibilidad hídrica y condiciones lumínicas.

En relación con las especies que participan en el experimento, es necesario confrontar dos puntos de vista diferentes. Por un lado, cabe pensar que *A. alba*, una especie evolutivamente más moderna (Linares, 2011), puede presentar una mayor plasticidad fenotípica: por su amplia distribución geográfica, el gran tamaño de sus poblaciones (Robakowski *et al.* 2004) y el surtido acervo genético de las mismas (Konnert y Bergmann, 1995; Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000) es posible presuponer que la especie presenta un uso de los recursos en general más eficiente y una mayor capacidad de respuesta y adaptación a cambios en las condiciones ambientales (Mueller-Starck, 1989). Del pinsapo, con poblaciones de pequeño tamaño, largamente aisladas, localizadas exclusivamente en el ámbito mediterráneo y con escasa variabilidad genética (Scaltsoyiannes *et al.* 1999), es de esperar, por el contrario, una mayor estabilidad fenotípica (*sensu* Niinemets y Valladares, 2004) y por ello una menor capacidad de respuesta ante dichos cambios. Así, no sería de extrañar que su comportamiento no experimentase variaciones notables a lo largo del proceso de estrés hídrico, al contrario que *Abies alba*, que acusaría de forma más significativa ese déficit hídrico, modificando su comportamiento y adaptándose más rápidamente a los cambios que se produzcan en la disponibilidad hídrica, siendo en estas circunstancias más competitiva que el pinsapo. Por otro lado, las poblaciones de *A. alba* se encuentran por lo general en condiciones más mésicas y estables (Robakowski *et al.* 2004), mientras que las poblaciones de pinsapo se hallan plenamente sometidas a los rigores del clima

mediterráneo, por lo que podría presuponerse que esta especie se encuentre mejor adaptado a las condiciones de limitada disponibilidad hídrica que lo caracterizan, gracias a un control estomático más ajustado y una mayor capacidad de respuesta ante cambios en el suministro hídrico.

#### *IV.1.4. Objetivos.*

Los objetivos básicos del experimento descrito en este capítulo son dos: a), evaluar la forma en que se desarrolla el proceso de estrés hídrico bajo regímenes de luz distintos en individuos juveniles de *A. alba* y de *A. pinsapo*, con el interés añadido de incluir un tratamiento a muy baja irradiancia, en el que poder detectar, en caso de que así se produjese, un estrés hídrico más severo y una menor habilidad para enfrentarse a este tipo de estrés ambiental, lo que permitiría testar comportamientos diferenciales entre ambas especies (carácter mediterráneo *versus* templado) respecto a la ya mencionada hipótesis de la sombra seca (Valladares y Pearcy, 2002); y b), explorar específicamente el *trade-off* asociado al par de recursos agua-luz en términos del comportamiento “económico” y el coste de oportunidad asociado al mismo cuando los individuos se enfrentan a la limitación en un recurso, en el otro, o en ambos a la vez.

Además de las variables ecofisiológicas convencionales para monitorizar la respuesta de las plantas (intercambio gaseoso, contenido relativo en agua de las acículas, potencial hídrico xilemático...), este experimento incluyó medidas de discriminación de isótopos estables de carbono, con la intención de confirmar los hallazgos del experimento descrito en el capítulo anterior, al ofrecer la posibilidad de comprobar los efectos del estrés por déficit energético en un plano distinto. Por otro lado, en el experimento se considera asimismo la determinación del contenido foliar en carbohidratos no estructurales, con la intención de evaluar la evolución del mismo a lo largo del proceso de estrés, para comprobar las posibles variaciones en la partición del carbono foliar que pudieran originarse por este proceso (e.g. Correia *et al.* 2006). Además, la evaluación de la concentración de carbohidratos en el contexto de este experimento ofrece la posibilidad de comprobar si los posibles cambios en la movilización de carbohidratos pueden expresarse de forma distinta y a distinta velocidad en dos especies que, *a priori*, pueden razonablemente presentar diferencias significativas en cuanto a su tolerancia a la sombra, resistencia a la sequía y plasticidad fenotípica, contribuyendo así al propósito general de este trabajo de investigación.

## IV.2. Diseño experimental. Variables dependientes y metodología de muestreo.

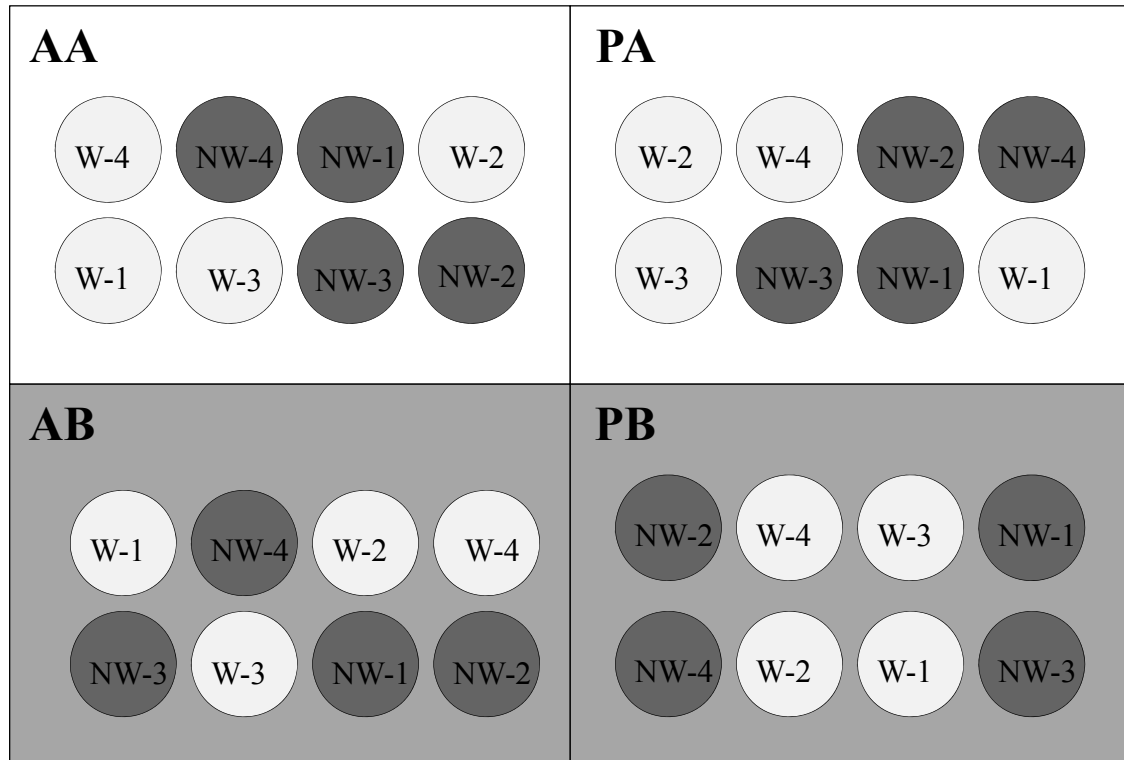
### IV.2.1. Diseño experimental.

El experimento fue llevado a cabo en el interior de una cámara de crecimiento *in vivo* de los Servicios Técnicos de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén. Las condiciones ambientales se fijaron en una temperatura media de 20-22°C, una humedad relativa del aire del 50-60% y un fotoperiodo de doce horas de luz y doce de oscuridad.

En el momento inicial, los individuos (ocho réplicas por tratamiento y especie) fueron asignados al azar a dos tratamientos de irradiancia, consistentes en una irradiancia máxima de 350  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (alta irradiancia”, “AI”) y en una irradiancia de 30-50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (baja irradiancia”, “BI”), suministrada mediante tubos fluorescentes convencionales. Para conseguir el nivel de baja irradiancia, la cantidad de luz incidente se redujo en la proporción necesaria mediante la interposición de varias capas de filtro neutro de malla gris.

Durante las primeras diez semanas del experimento, se mantuvo constante la humedad del sustrato de todos los individuos incubados. Transcurrido ese tiempo, se diferenciaron dos tratamientos distintos de riego para cada nivel de irradiancia incidente, a los que se asignaron al azar individuos de ambas especies. Así, dentro de cada nivel del tratamiento de luz y especie, se distinguió entre individuos control, que seguían convenientemente regados (“riego”), en los que se mantuvo la misma estrategia de riego seguida hasta ese momento, e individuos que dejaron de ser regados (“sin riego”), obteniéndose un juego de cuatro réplicas por especie y combinación de tratamientos: “alta irradiancia / riego”, “baja irradiancia / riego”, “alta irradiancia / sin riego” y “baja irradiancia / sin riego” (**Figura IV.1**).

Dentro de cada nivel de luz y especie, los individuos fueron rotados al azar cada 7-10 días aproximadamente, durante los cuatro meses que duró el experimento, al objeto de evitar los posibles efectos derivados de la localización de los individuos en el interior de la cámara. Los tratamientos descritos se mantuvieron hasta que los individuos sometidos a estrés mostraron tasas netas de fijación de carbono negativas, momento en que se dio por finalizado el experimento (a las seis semanas aproximadamente desde el inicio de la privación de riego).



**Figura IV.1.** Representación esquemática de la asignación de individuos de ambas especies (A, *A. alba*, y P, *A. pinsapo*) a los distintos tratamientos. En los recuadros de fondo gris claro, el tratamiento de irradiación baja (B), y en los blancos, el tratamiento de “alta” irradiación (A). Los círculos claros representan a los individuos control (regados – W), y los más oscuros, los sometidos al tratamiento de estrés (NW).

#### IV.2.2. Estrategia de muestreo y variables consideradas.

Al objeto de conocer la evolución de los individuos en el transcurso del experimento, se hizo un seguimiento de distintas variables relacionadas con el comportamiento ecofisiológico y la gestión de los recursos clave, con una frecuencia variable a lo largo de las distintas etapas del experimento (**Tabla IV.1**).

Al iniciar el experimento, se tomaron medidas de intercambio gaseoso (fotosíntesis neta y conductancia estomática al vapor de agua), se midió la humedad del sustrato de los distintos individuos y se determinó tanto el potencial hídrico xilemático como el contenido relativo en agua del tejido foliar (RWC, del inglés *relative water content*). Transcurridas diez semanas desde el inicio (momento “inicial 2”), se llevó a cabo la misma tanda de medidas. Durante el tiempo intermedio, únicamente se tomaron medidas de intercambio gaseoso, y se determinó la humedad del sustrato y el RWC, con

una frecuencia semanal. Tras el momento “inicial 2”, se comenzaron a aplicar los tratamientos de riego (“riego” y “sin riego”), además de los de irradiancia, y se tomaron medidas de intercambio gaseoso, potencial hídrico, humedad del sustrato y RWC, una vez a la semana, durante seis semanas.

Las muestras de acículas en las que midió la composición en isótopos estables de carbono se tomaron cuando habían transcurrido 4-5 días desde el inicio de la aplicación de los tratamientos de irradiancia (momento “inicial”) y al final del mismo (momento “final”). El contenido foliar en carbohidratos no estructurales, así como en los compuestos que constituyen este reservorio (azúcares libres de bajo peso molecular y almidón), se determinaron en ese momento “inicial”, justo antes del inicio de la fase de desecación (momento “inicial 2”) y transcurridas dos, cuatro y seis semanas desde ese momento, hasta la finalización del experimento.

Considerando el número de réplicas a monitorizar y la cantidad de variables a medir en cada ocasión, los individuos se distribuyeron en dos tandas distintas: un día se medían las distintas variables en los individuos asignados al tratamiento de estrés hídrico, y al día siguiente se medían en los individuos control. Así se consiguió concentrar la medida de las distintas variables en una franja horaria no demasiado extensa, entre el mediodía y las primeras horas de la tarde, evitándose los posibles efectos derivados del momento del fotoperiodo en que se tomasen las medidas (es el caso, por ejemplo, de las medidas de intercambio gaseoso, el potencial hídrico, etc.).

#### *IV.2.2.1. Tasas instantáneas de intercambio gaseoso.*

Las tasas instantáneas de fotosíntesis y de conductancia estomática, bajo los niveles de incubación de ambos tratamientos de irradiancia, se obtuvieron mediante un IRGA portátil, tal y como se describe en la **Sección II.3.6.1** de esta memoria. Estas medidas, registradas en torno al mediodía, se tomaron en tramos de un año de edad, sobre acículas maduras. Se emplearon siempre los mismos tramos a lo largo del experimento, de manera que sólo al término de éste se recolectaron de los individuos, para poder corregir los datos experimentales por el área foliar real empleada en cada caso, como se describe en la **Sección II.3.6.3** del **Capítulo 2**, dedicado a “Material y Métodos”.

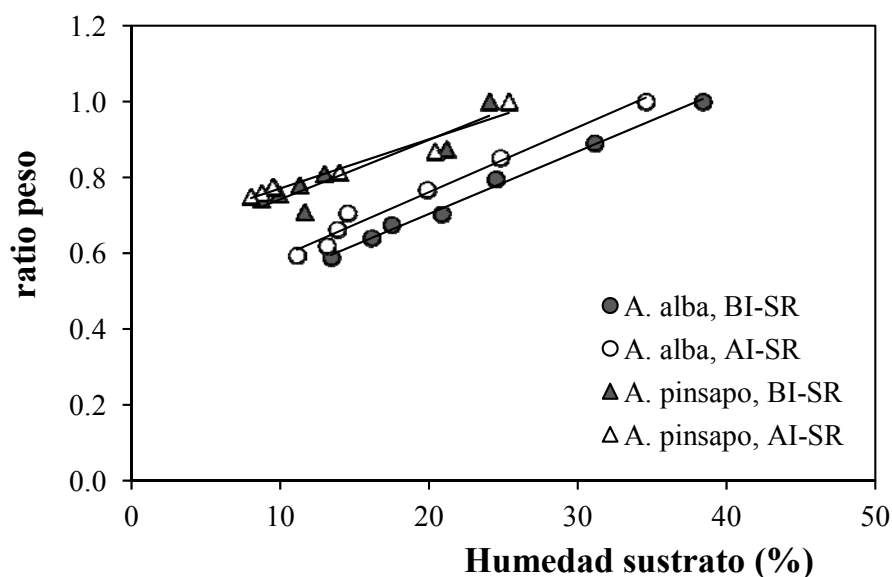
**Tabla IV.1.** Seguimiento de las variables consideradas: temporalidad de las medidas y de las distintas tomas de muestras. Las casillas sombreadas indican los momentos en que se llevaron a cabo las distintas tareas.

	Día 0 – “Inicial”	Día 7	Día 15	Día 24	Día 33	Día 41	Día 49	Día 59	Día 69	Día 77 – “inicial 2”	Día 83	Día 92	Día 98	Día 105	Día 112	Día 121 – “final”
<b>Medidas de intercambio gaseoso</b>																
<b>Humedad del sustrato</b>																
<b>RWC en tejido foliar</b>																
<b>Potencial hídrico xilemático</b>																
<b>Toma de muestras</b>	¥															
<b>Peso de los individuos</b>																

¥ La toma inicial de muestras se produjo transcurridos 4-5 días desde el inicio del experimento (ver Sección 4.2.2.)

#### IV.2.2.2. Humedad del sustrato y pérdida de agua.

Se llevó a cabo un seguimiento del agua realmente disponible para los individuos mediante dos aproximaciones: por un lado, con una sonda de humedad, se registró la humedad relativa del sustrato (ver descripción del material empleado en la **Sección II.2.1 del Capítulo 2**, dedicado a “Material y Métodos”), y por otro, a modo de “doble control”, se hizo un seguimiento del peso de las distintas unidades experimentales (individuo + sustrato + contenedor) en la segunda parte del experimento (aplicación de estrés hídrico), empleando una balanza. Este procedimiento ofrece una perspectiva integral de la cantidad de agua disponible para cada individuo en cada momento, y de la velocidad a la que se ésta se redujo en el tratamiento de estrés hídrico a que fueron sometidos individuos de ambas especies adscritos tanto a alta como a baja irradiancia. En la **Figura IV.2** se muestra la relación entre la humedad del sustrato (en porcentaje) y el ratio entre el peso (masa) de las unidades experimentales en cada momento del tiempo y su peso (masa) en el momento “inicial 2”. A pesar de existir diferencias entre especies en lo referente al porcentaje de humedad del sustrato y su rango de variación, las tasas de desecación obtenidas a partir de las medidas con sonda TDR o a partir de la pérdida de peso de las unidades experimentales fueron equivalentes. Así lo indica la ausencia de diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de regresión entre ambos tipos de datos, para cada especie y tratamiento de irradiancia (ANOVA de 1 vía,  $p > 0.05$  en todos los casos, **Tabla IV.2**).



**Figura IV.2.** Relación entre la evolución temporal del contenido en humedad del sustrato (en %) y el ratio del peso (masa) de cada unidad experimental en los distintos tiempos respecto al del momento “inicial 2”, antes de la aplicación del tratamiento de estrés hídrico. En cada combinación de especies y tratamientos de irradiancia, cada uno de los siete puntos (desde el momento “inicial 2” hasta la finalización del experimento,) representa a su vez el promedio de  $n=4$  individuos. “AA”: *A. alba*; “AP”: *A. pinsapo*; “AI”: alta irradiancia; “BI”: baja irradiancia; “SR”: tratamiento “sin riego”.

**Tabla IV.2.** Pendiente de la recta promedio ( $b$ ) y valores de  $R^2$  y de  $R$  para las rectas de regresión promedio representadas en la **Figura IV.2**. De acuerdo con los valores críticos para la  $R$  de Pearson, para  $n = 7$  hay significación a partir de  $R > 0.669$  (se indica con un asterisco).

Combinación especie – irradiancia - riego		$b$	$R^2$	$R$
<i>Abies alba</i> – baja irradiancia – sin riego	●	0.0165	0.9937	0.9968*
<i>Abies alba</i> – alta irradiancia – sin riego	○	0.0171	0.9793	0.9896*
<i>Abies pinsapo</i> – baja irradiancia – sin riego	▲	0.0156	0.8648	0.9299*
<i>Abies pinsapo</i> – alta irradiancia – sin riego	△	0.0130	0.9474	0.9733*

#### IV.2.2.3. Contenido relativo en agua y potencial hídrico xilemático.

El procedimiento seguido para la medida de ambas variables y el equipamiento empleado se encuentra descrito en las **Secciones II.3.2** y **II.3.5**, respectivamente, del **Capítulo 2** de esta memoria.

#### *IV.2.2.4. Contenido foliar en carbohidratos no estructurales y discriminación de isótopos estables de carbono.*

El contenido en carbohidratos no estructurales y la composición en isótopos estables de carbono se determinaron en todos los individuos participantes en el experimento, en muestras de acículas maduras (de un año de edad) y de acículas “nuevas”, correspondientes a brotes recién surgidos, presentes al comienzo del experimento y que terminaron de madurar durante el transcurso del mismo.

La forma en que se realizó la toma y preparación de estas muestras, así como el procedimiento empleado para el análisis de los diferentes tipos de carbohidratos y la determinación de la composición isotópica se encuentran descritos en las **Secciones II.3.3 y II.3.7** del citado **Capítulo 2**, respectivamente.

#### *IV.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.*

Para todos los análisis estadísticos se empleó el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 1984-2004). El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95%. De forma previa a cualquier análisis, se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de la homogeneidad de las varianzas de Cochran, respectivamente. En los casos en los que no cumpliesen ambas condiciones, se procedió a la transformación de los datos.

Considerando que las distintas medidas se tomaron en distintos momentos de tiempo pero sobre los mismos individuos –pseudorreplicación temporal–, para evaluar las diferencias significativas derivadas de la aplicación de los distintos tratamientos de irradiancia y riego se efectuaron análisis de tipo ANOVA de medidas repetidas. Así, se realizó un primer análisis para explorar la posible existencia de diferencias significativas derivadas de la aplicación de los tratamientos de luz, teniendo únicamente en cuenta las mediciones efectuadas entre los momentos “inicial” e “inicial 2”. A continuación, se realizó con cada variable un segundo análisis, para valorar el efecto de las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego, con las mediciones efectuadas desde el momento “inicial 2” en adelante, hasta el final del experimento. En ambos casos, el test *post-hoc* de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) se empleó para comparaciones múltiples cuando se encontraron diferencias significativas entre distintos tiempos o entre tratamientos.

Para las comparaciones efectuadas entre especies, tratamientos de irradiancia y edades del tejido foliar (relación entre las variables registradas y la pérdida de humedad en el sustrato, composición en isótopos estables de carbono, contenido en carbohidratos no estructurales, etc.) se efectuó un ANOVA de 1 vía. Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre especies relacionadas con la relación funcional entre la fotosíntesis neta y la humedad del sustrato, y entre la conductancia estomática y la humedad del sustrato, y verificar la similitud entre las pendientes de las correspondientes rectas de regresión, se realizaron comparaciones empleando un ANOVA de una vía.

### **IV.3. Resultados.**

#### *IV.3.1. Disponibilidad de agua y estatus hídrico.*

##### *IV.3.1.1. Porcentaje de humedad en el sustrato y peso de los individuos.*

Durante la primera parte del experimento, los valores registrados se hallaron en todo momento por encima de niveles notables de disponibilidad hídrica (en torno al 31% en *A. alba*, y al 24% en *A. pinsapo*, en valores promedios). Por lo general, la humedad registrada fue ligeramente inferior en *A. pinsapo*, lo que podría deberse al hecho de que el sustrato empleado para rellenar los contenedores en que se encontraban los distintos individuos fuese distinto entre ambas especies.

Los análisis estadísticos aplicados sobre los datos recogidos en esta parte del experimento revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies, así como debidas a los distintos tratamientos de irradiancia y al efecto del paso del tiempo (**Tabla IV.3**). Los mayores valores de humedad en el sustrato se recogieron sobre los individuos de *A. alba*, y en el tratamiento a baja irradiancia. Con el paso del tiempo, se consiguió que los niveles de humedad se elevasen progresivamente y se mantuviesen, lo que fue especialmente difícil en el tratamiento a alta irradiancia por la mayor evaporación desde el suelo en este tratamiento (**Figura IV.3**).

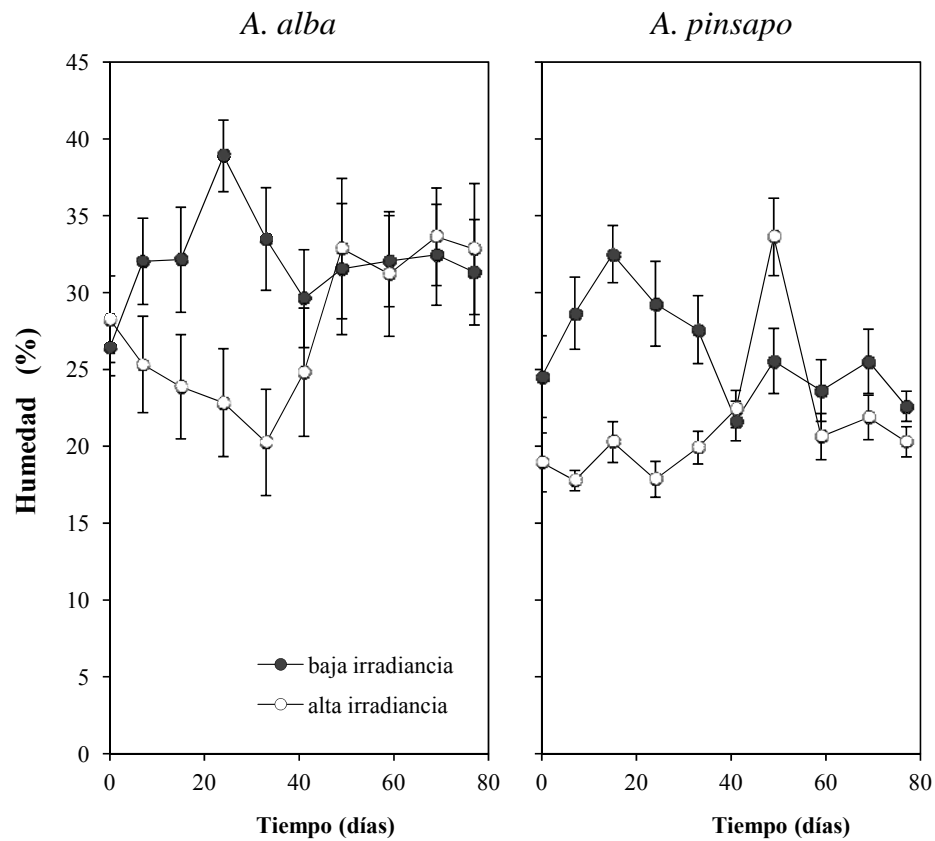
En la segunda parte del experimento, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies, y debidas al efecto de los tratamientos de riego y al paso del tiempo (**Tabla IV.4**). Así, los valores de humedad registrados se mantuvieron en el caso del tratamiento “riego”, y descendieron de forma

significativa en individuos sometidos a estrés hídrico. Al igual que en el caso anterior, los mayores valores de humedad en el sustrato se recogieron en los individuos de *A. alba* (**Figura IV.4**). También se hallaron diferencias significativas para el efecto “tiempo x irradiancia”, con los valores registrados en el tratamiento a alta irradiancia inferiores a los hallados en el tratamiento a baja irradiancia en las últimas semanas del experimento.

Por otro lado, en lo que respecta al seguimiento del peso de las unidades experimentales en la segunda parte del experimento, los resultados de los análisis estadísticos señalaron la existencia de diferencias significativas con el paso del tiempo, entre especies y como consecuencia de los tratamientos de riego (**Tabla IV.4**), como en el caso del porcentaje de humedad relativa. Sin embargo, no se hallaron tales diferencias para el efecto “tiempo x irradiancia” (**Figura IV.5**), lo que indica que la cantidad de agua disponible en el sustrato disminuyó al mismo ritmo en ambos tratamientos de irradiancia.

**Tabla IV.3.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos en el periodo de tiempo comprendido desde el inicio del experimento hasta el momento “inicial 2” para el porcentaje de humedad disponible en el sustrato (H%) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

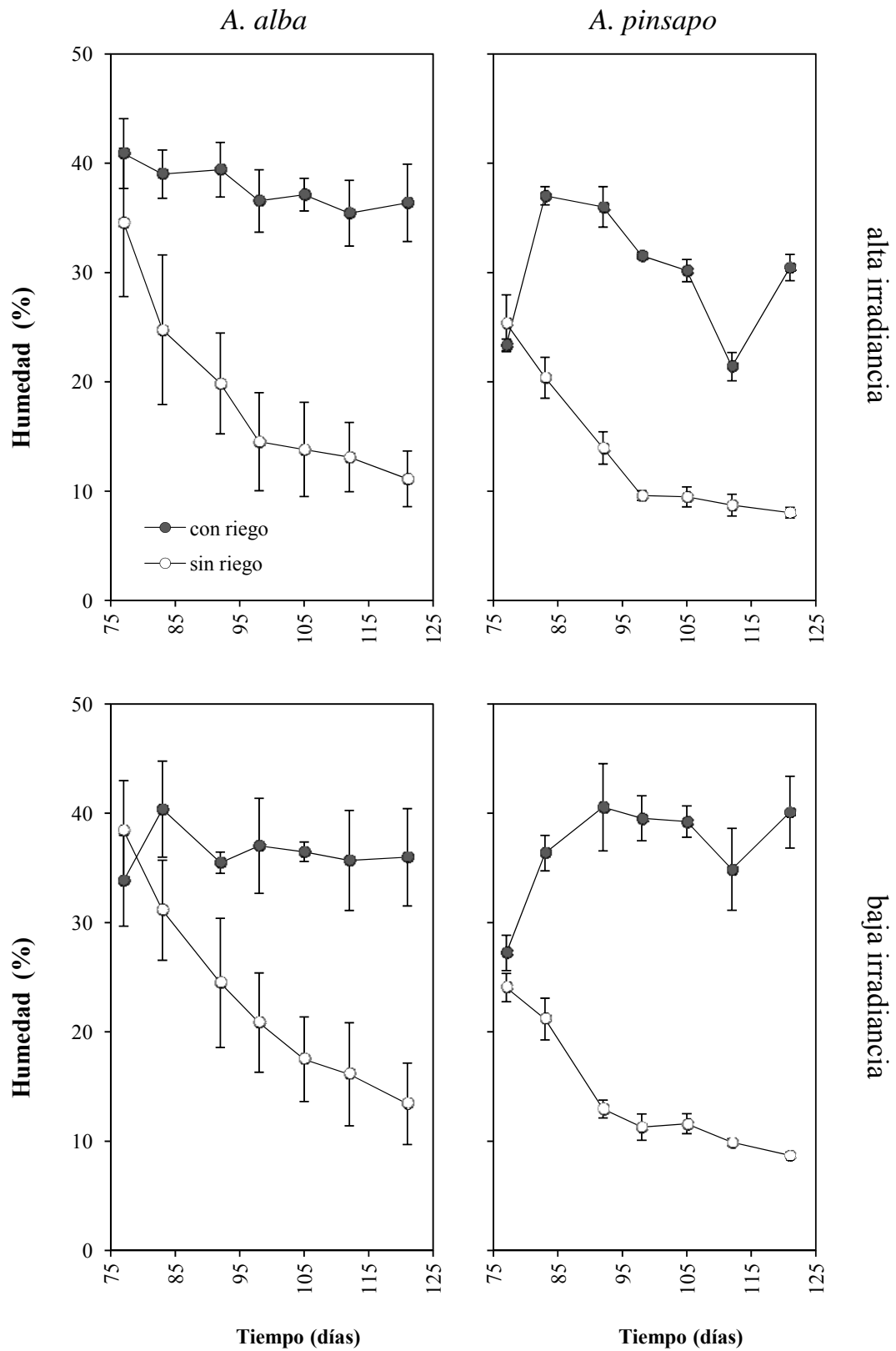
factor	H (%)
Especie	6.05 (1) <b>0.021*</b>
Irradiancia	5.54 (1) <b>0.027*</b>
Especie x irradiancia	0.00 (1) 0.991
Tiempo	8.82 (10) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	5.61 (10) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia	14.49 (10) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	3.30 (10) <b>0.000*</b>



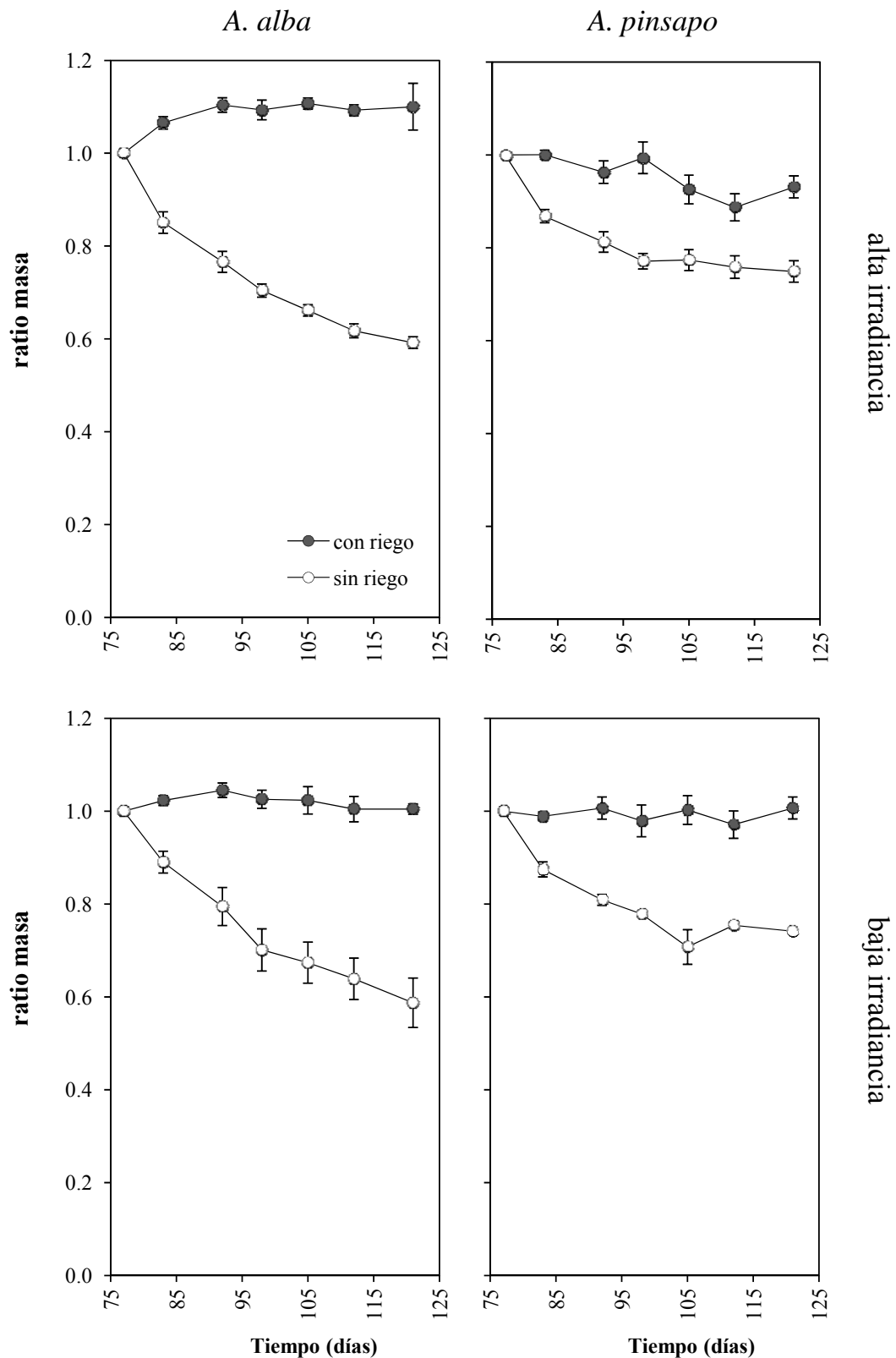
**Figura IV.3.** Evolución temporal del porcentaje de humedad disponible en el sustrato de los contenedores, entre los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar.

**Tabla IV.4.** Resultados de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos entre el momento de tiempo “inicial 2” y el final del experimento para el porcentaje de humedad disponible en el sustrato (%H), el ratio entre el peso (masa) de cada unidad experimental (contenedor + sustrato + individuo) y su masa en el momento “inicial 2” (“ratio masa”) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	H (%)	ratio masa
Especie	7.37 (1) <b>0.012*</b>	36.46 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	1.71 (1) 0.204	0.01 (1) 0.935
Riego	81.23 (1) <b>0.000*</b>	29.59 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	0.33 (1) 0.569	0.07 (1) 0.799
Especie x riego	0.72 (1) 0.406	0.19 (1) 0.667
Irradiancia x riego	0.00 (1) 0.947	0.00 (1) 0.980
Especie x irradiancia x riego	2.29 (1) 0.143	1.13 (1) 0.298
Tiempo	46.20 (6) <b>0.000*</b>	112.37 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	8.16 (6) <b>0.000*</b>	3.59 (6) <b>0.002*</b>
Tiempo x irradiancia	2.40 (6) <b>0.031*</b>	0.69 (6) 0.656
Tiempo x riego	57.45 (6) <b>0.000*</b>	101.61 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	1.98 (6) 0.072*	2.66 (6) <b>0.018*</b>
Tiempo x especie x riego	3.07 (6) <b>0.007*</b>	9.38 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia x riego	1.89 (6) 0.507	1.90 (6) 0.084*
Tiempo x especie x irradiancia x riego	0.89 (6) 0.507	3.56 (6) <b>0.003*</b>



**Figura IV.4.** Evolución temporal del porcentaje de humedad disponible en el sustrato de los contenedores, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar.



**Figura IV.5.** Evolución temporal del ratio entre la masa (peso) de las unidades experimentales de cada especie y combinación de tratamientos entre los momentos “inicial 2” y “final”, y la masa hallada para cada individuo en el momento “inicial 2”. Las barras verticales representan el error estándar.

#### IV.3.1.2. Contenido relativo en agua de las acículas (RWC) y potencial hídrico xilemático.

El contenido relativo en agua de las acículas no experimentó cambios significativos en la primera parte del experimento, salvo un momento puntual de descenso hacia el final de dicho periodo. Los resultados de los análisis estadísticos señalaron la existencia de diferencias significativas entre especies y derivadas del paso del tiempo, pero no entre ambos tratamientos de irradiancia (**Tabla IV.5**). El contenido relativo en agua fue mayor en los individuos de *A. alba* (**Figura IV.6**).

En la segunda parte del experimento, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies, con el paso del tiempo, y derivadas de la aplicación de los tratamientos de riego, sin que de nuevo se hallase efecto alguno de los tratamientos de irradiancia (**Tabla IV.6**). En el caso de *A. pinsapo*, el RWC de individuos sometidos al tratamiento de estrés hídrico, tanto a alta irradiancia como a baja, disminuyó prácticamente a la par transcurridas 2-3 semanas desde el inicio de la privación de riego, cayendo hasta valores próximos al 40% (**Figura IV.8**). En el caso de *A. alba*, sin embargo, el RWC de individuos adscritos al tratamiento “alta irradiancia / sin riego” disminuyó algo más tarde, a partir de la cuarta semana de tratamiento. En este caso, el descenso fue menos brusco que en el caso anterior, cayendo hasta el 55%. En el tratamiento “baja irradiancia / sin riego”, los individuos disminuyeron su RWC más lentamente, no llegando siquiera al 70%.

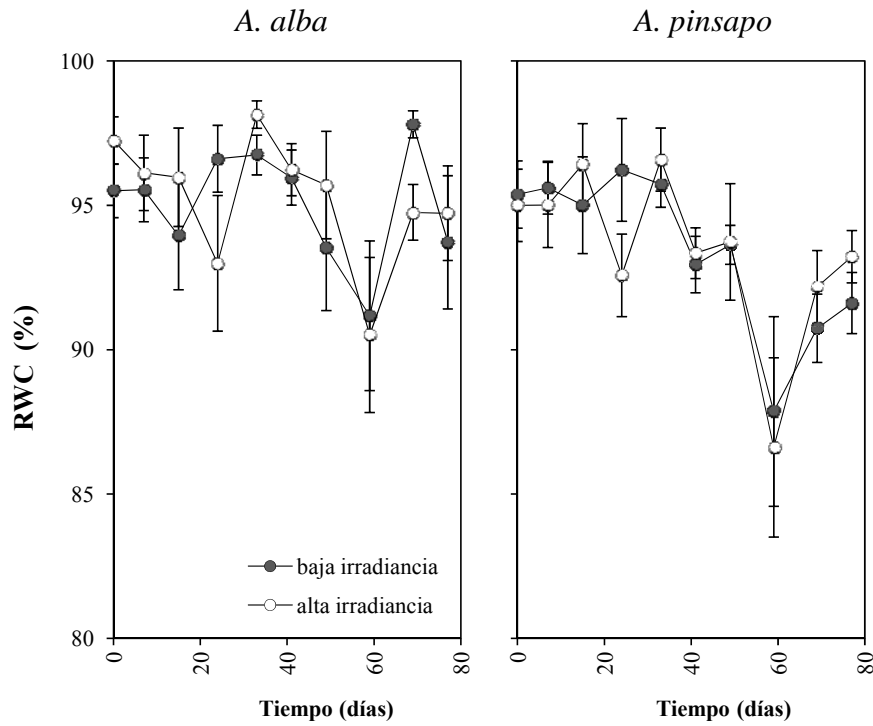
El potencial hídrico xilemático reflejó incluso las pequeñas variaciones experimentadas por la disponibilidad hídrica, fuesen éstas derivadas de los tratamientos de riego aplicados o incluso de los propios tratamientos de irradiancia. Así, en la primera parte del experimento, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies y entre tratamientos de irradiancia, y derivadas del efecto “tiempo x irradiancia” (**Tabla IV.5**), registrándose los potenciales más negativos en *A. pinsapo*, y en los individuos sometidos al tratamiento de alta irradiancia (**Figura IV.7**).

En la segunda parte del experimento, se hallaron diferencias debidas a todos los factores considerados (**Tabla IV.6**). Los valores más negativos de potencial hídrico se hallaron de nuevo entre los individuos de *A. pinsapo*, y en el tratamiento a alta

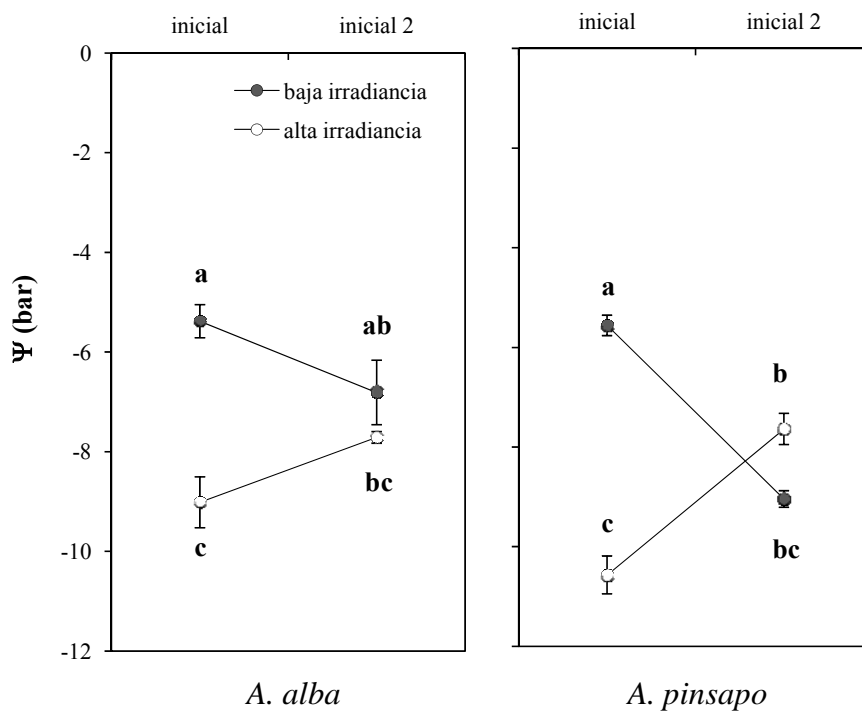
irradiancia. Con el paso del tiempo, tuvo lugar un descenso significativo del potencial hídrico en el tratamiento “sin riego”. En el caso de *A. alba*, este descenso tuvo lugar de forma muy progresiva, registrándose valores significativamente distintos transcurridas cuatro semanas de la privación del riego; en *A. pinsapo*, el potencial hídrico disminuyó de forma progresiva desde la primera semana en el tratamiento a alta irradiancia, mientras que en el tratamiento a baja irradiancia, los valores apenas variaron hasta la tercera semana, momento en que comenzaron a disminuir de forma incluso más brusca que en el otro tratamiento (**Figura IV.9**).

**Tabla IV.5.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos en el periodo de tiempo comprendido entre los momentos “inicial” e “inicial 2” para el contenido relativo en agua de las acículas (RWC), y potencial hídrico xilemático ( $\Psi$ ) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	RWC	$\Psi$
Especie	16.9 (1) <b>0.000*</b>	11.17 (1) <b>0.002*</b>
Irradiancia	0.0 (1) 0.965	49.17 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	0.0 (1) 0.882	0.64 (1) 0.430
Tiempo	7.8 (8) <b>0.000*</b>	0.52 (1) 0.475
Tiempo x especie	1.2 (8) 0.273	0.21 (1) 0.651
Tiempo x irradiancia	1.1 (8) 0.352	95.01 (1) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	0.3 (8) 0.955	15.38 (1) <b>0.001*</b>



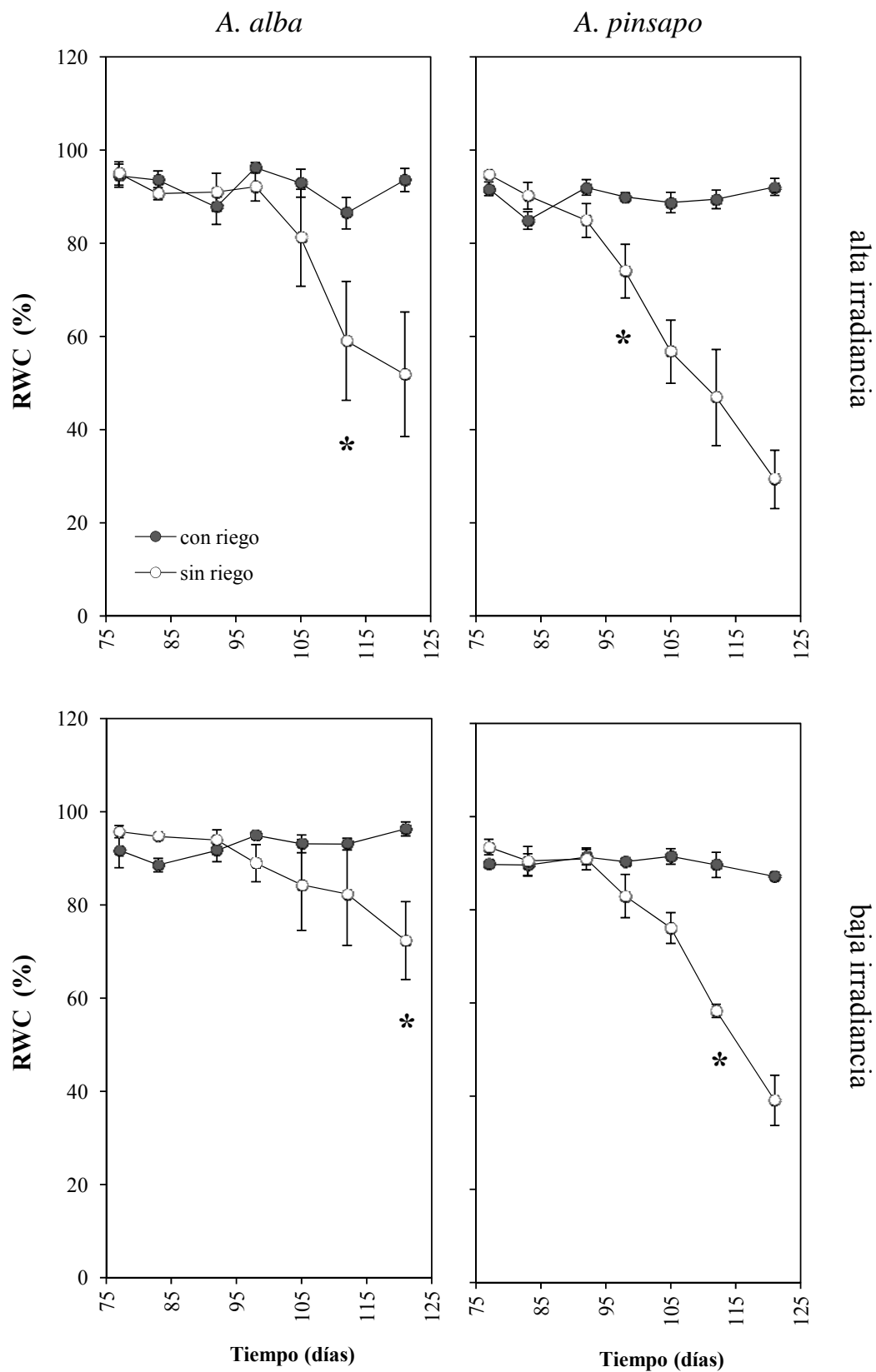
**Figura IV.6.** Evolución temporal del contenido relativo en agua de las acículas muestreadas en individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Nótese la escala.



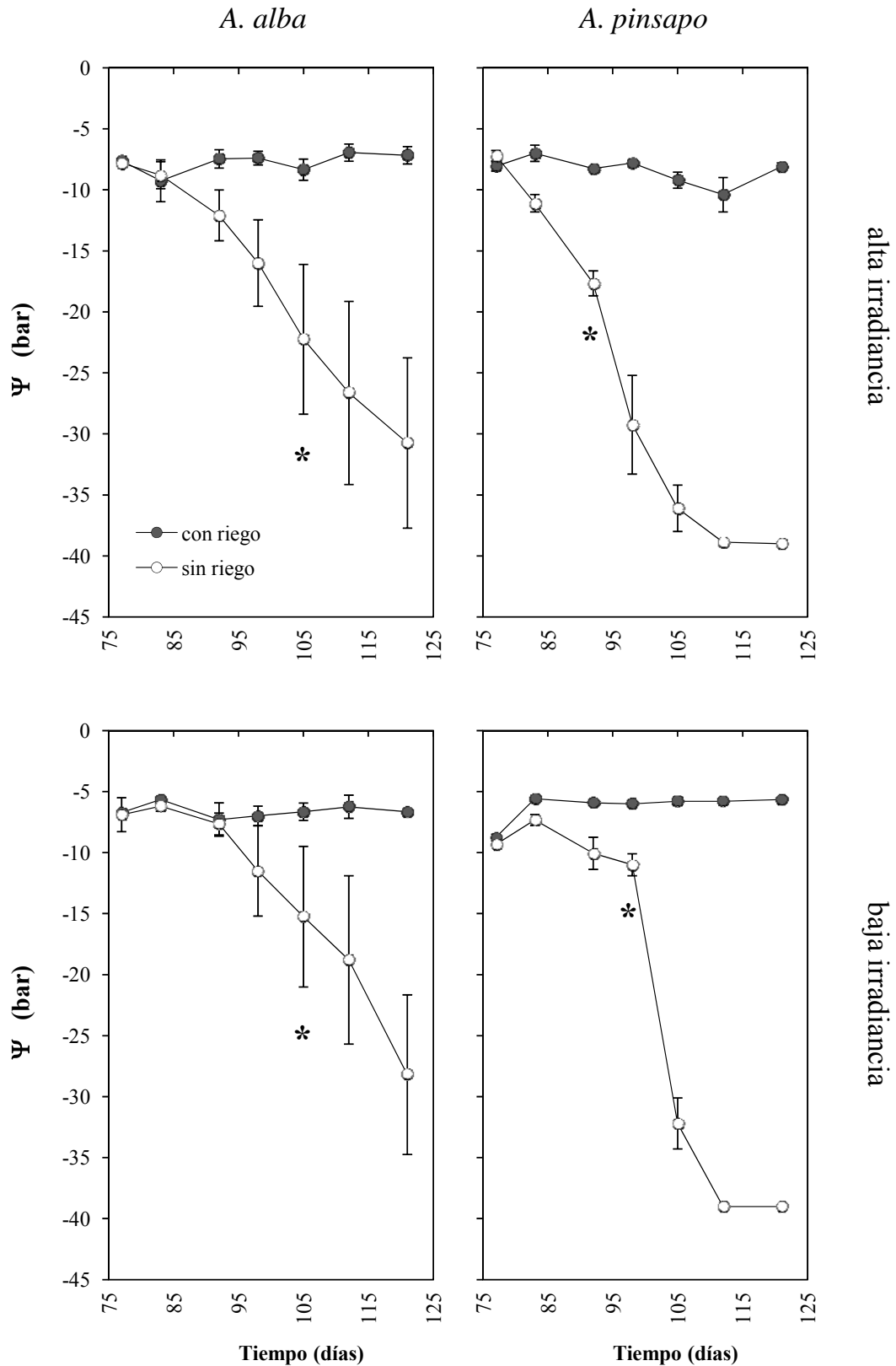
**Figura IV.7.** Potencial hídrico xilemático registrado en individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas.

**Tabla IV.6.** Resultados de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos entre el momento de tiempo “inicial 2” y el final del experimento para el contenido relativo en agua de las acículas (RWC), y el potencial hídrico xilemático ( $\Psi$ ) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	RWC	$\Psi$
Especie	14.13 (1) <b>0.001*</b>	5.80 (1) <b>0.024*</b>
Irradiancia	2.93 (1) 0.100	16.59 (1) <b>0.000*</b>
Riego	39.52 (1) <b>0.000*</b>	84.07 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	0.02 (1) 0.893	0.08 (1) 0.776
Especie x riego	4.25 (1) 0.050*	4.21 (1) 0.051*
Irradiancia x riego	2.31 (1) 0.141	0.42 (1) 0.523
Especie x irradiancia x riego	0.00 (1) 0.981	1.40 (1) 0.250
Tiempo	32.83 (6) <b>0.000*</b>	29.60 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	2.95 (6) <b>0.010*</b>	1.43 (6) 0.208
Tiempo x irradiancia	1.64 (6) 0.141	4.19 (6) <b>0.001*</b>
Tiempo x riego	34.77 (6) <b>0.000*</b>	35.92 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	2.11 (6) 0.056*	3.37 (6) <b>0.004*</b>
Tiempo x especie x riego	1.94 (6) 0.079*	1.29 (6) 0.267
Tiempo x irradiancia x riego	0.44 (6) 0.849	2.81 (6) <b>0.013*</b>
Tiempo x especie x irradiancia x riego	0.93 (6) 0.476	1.35 (6) 0.240



**Figura IV.8.** Evolución temporal del contenido relativo en agua de las acículas hallado en individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican el momento en que comienza a haber diferencias significativas entre los tratamientos “con riego” y “sin riego”.



**Figura IV.9.** Evolución temporal del potencial hídrico xilemático registrado en individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas.

### IV.3.2. Tasas instantáneas de intercambio gaseoso.

#### IV.3.2.1. Fotosíntesis neta y conductancia estomática al agua.

Los análisis estadísticos efectuados sobre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta registradas en la primera parte del experimento revelaron la existencia de diferencias significativas debidas al efecto de los tratamientos de irradiancia y al paso del tiempo, además de otros efectos (**Tabla IV.7**). En ambas especies, las mayores tasas se registraron en el tratamiento a alta irradiancia (**Figura IV.10**). En lo que respecta a la conductancia estomática, los análisis pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre especies y ligadas al paso del tiempo, pero no derivadas directamente de la aplicación de los tratamientos de irradiancia (**Tabla IV.7**). Las mayores tasas se registraron entre los individuos de *A. pinsapo* (**Figura IV.11**).

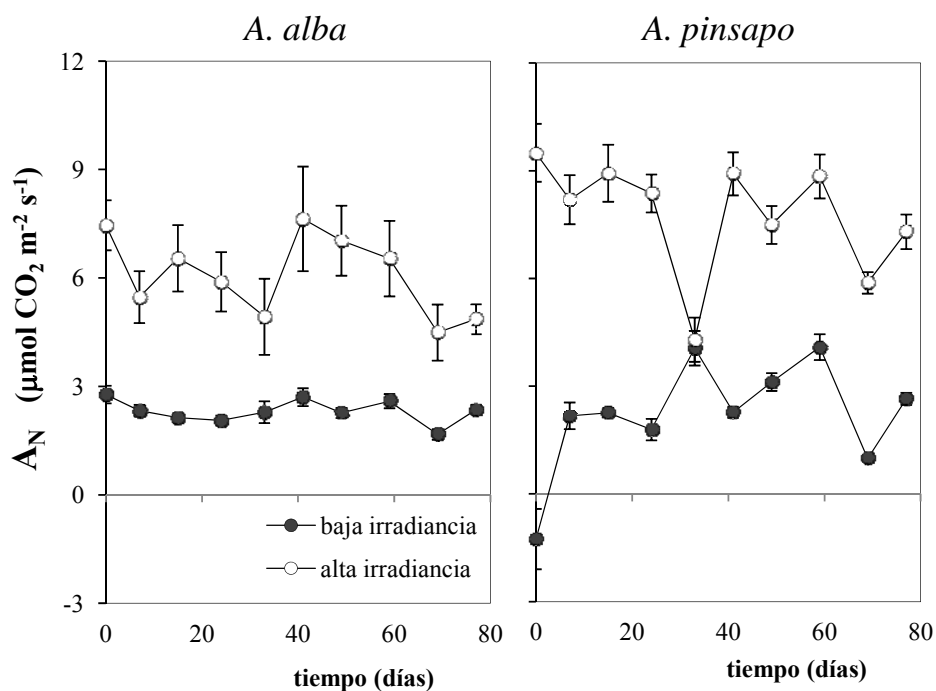
En la segunda parte del experimento, en la que se aplicaron simultáneamente los tratamientos de irradiancia y riego, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies y derivadas de la aplicación de los tratamientos de riego y del paso del tiempo para las dos variables estudiadas (**Tabla IV.8**). A pesar de hallarse múltiples efectos de interacción relacionados con la aplicación de los tratamientos de irradiancia, su efecto principal fue significativo únicamente en el caso de la fotosíntesis neta, de la misma forma que ocurría en el periodo anterior.

Las mayores tasas instantáneas de fotosíntesis neta se registraron en los individuos de *A. pinsapo*, y entre los individuos adscritos a los tratamientos de alta irradiancia y riego (**Figura IV.12**). Con el tiempo, tuvo lugar un descenso significativo de las tasas registradas en promedio, debido principalmente al efecto acumulativo del tratamiento “sin riego”.

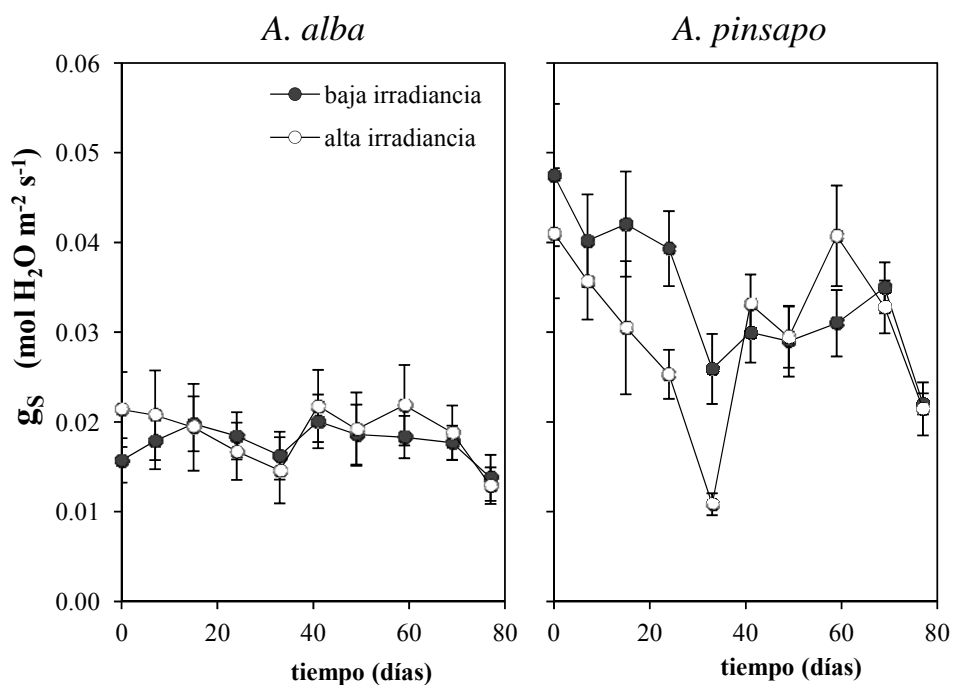
En el caso de la conductancia estomática al agua, las mayores tasas se hallaron en *A. pinsapo* y en el tratamiento de riego (**Figura IV.13**). A corto plazo, se produjo incremento en todos los tratamientos, que dio paso a un descenso generalizado, especialmente significativo en los individuos adscritos al tratamiento “sin riego”.

**Tabla IV.7.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos en el periodo de tiempo comprendido entre los momentos “inicial” e “inicial 2”, para la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ , expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la tasa de conductancia estomática al agua ( $g_s$ , en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	$A_N$	$g_s$
Especie	1.88 (1) 0.183	9.4 (1) <b>0.005*</b>
Irradiancia	83.47 (1) <b>0.000*</b>	0.4 (1) 0.526
Especie x irradiancia	4.61 (1) <b>0.042*</b>	0.2 (1) 0.637
Tiempo	10.46 (8) <b>0.000*</b>	11.8 (9) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	5.06 (8) <b>0.000*</b>	5.8 (9) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia	11.32 (8) <b>0.000*</b>	2.8 (9) <b>0.004*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	7.46 (8) <b>0.000*</b>	1.3 (9) 0.222



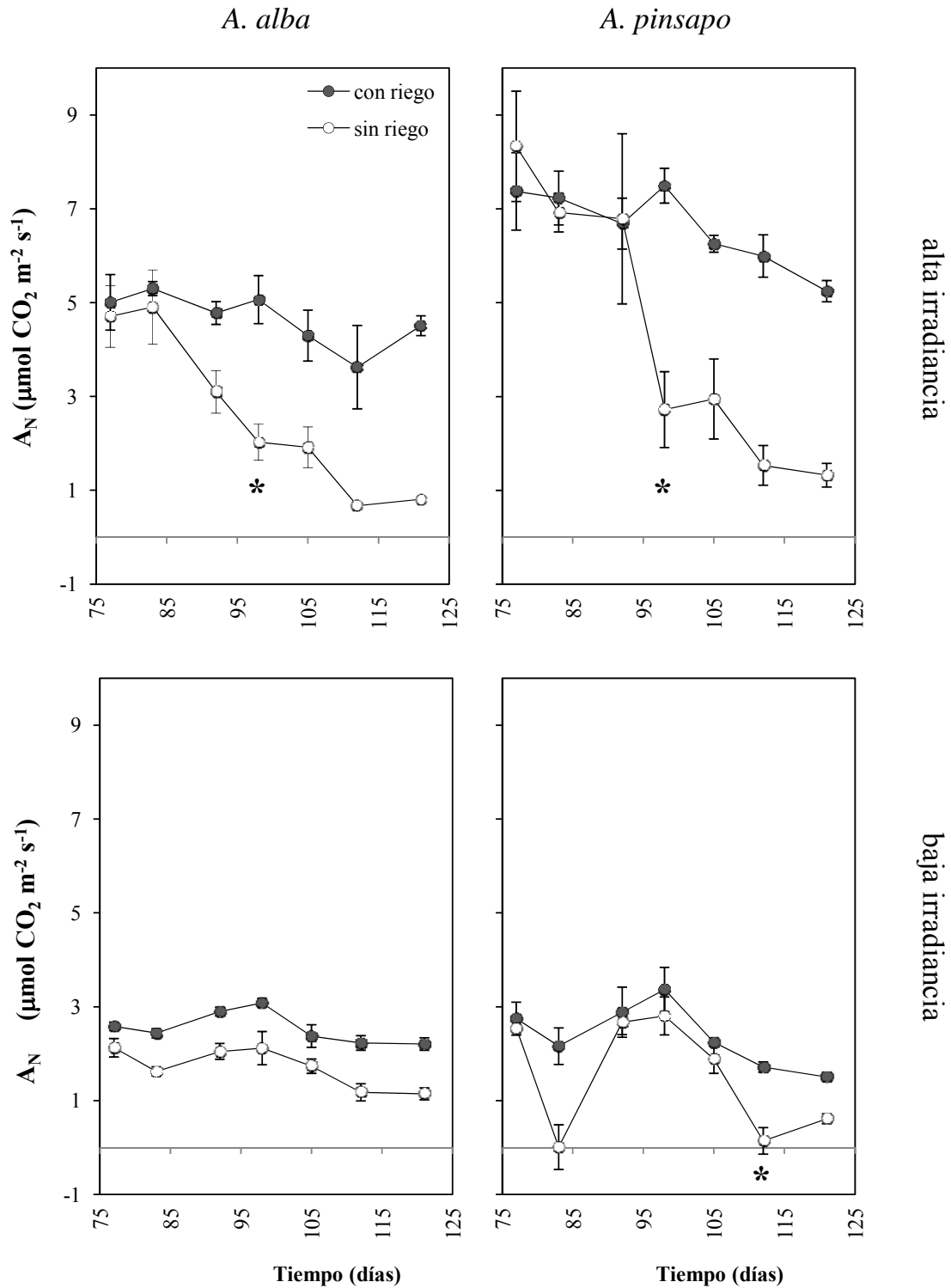
**Figura IV.10.** Evolución temporal de la tasa instantánea de fotosíntesis neta registrada en los individuos de ambas especies sometidos a los distintos tratamientos de irradiancia, entre los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar.



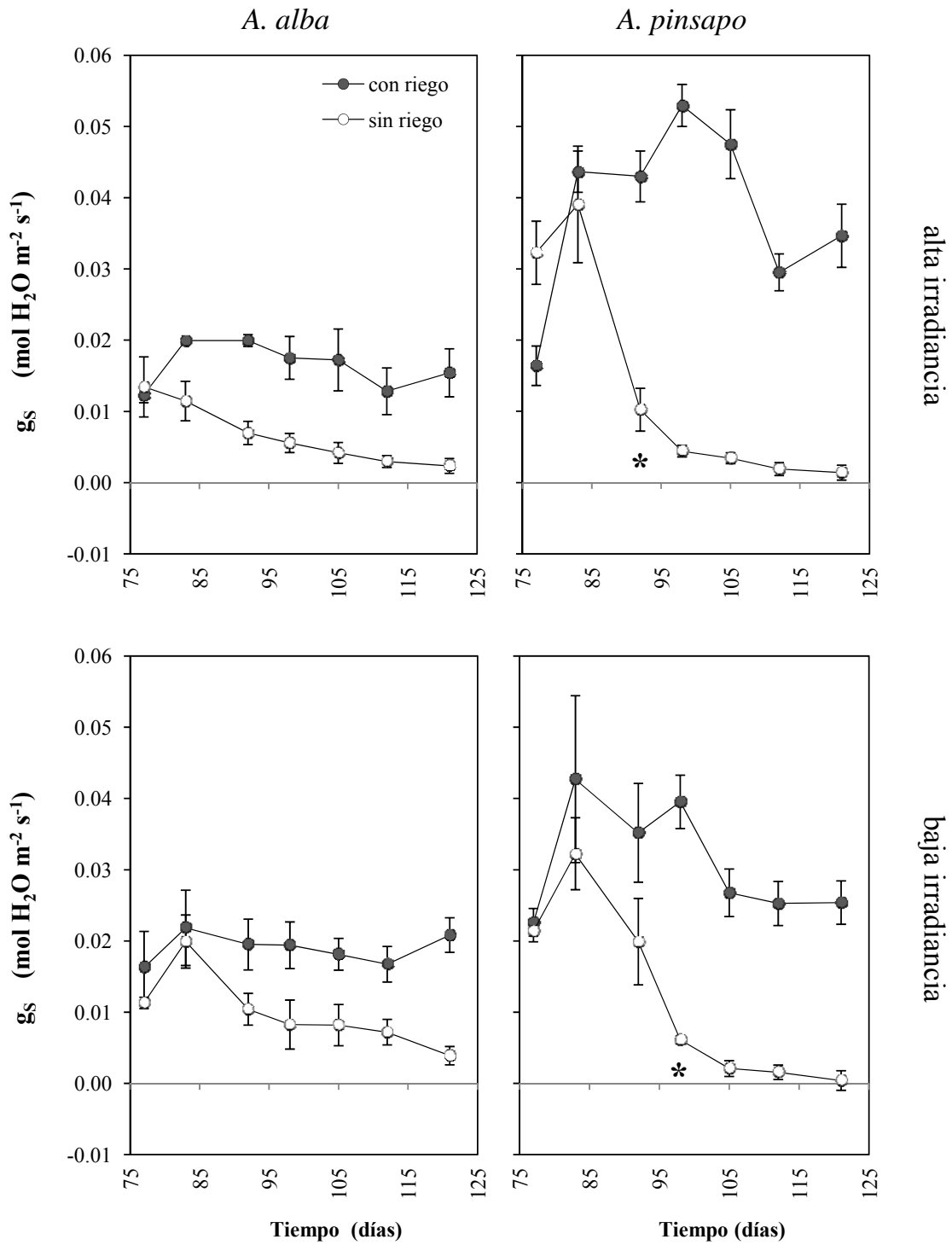
**Figura IV.11.** Evolución temporal de la tasa de conductancia estomática al agua registrada en los individuos de ambas especies sometidos a los distintos tratamientos de irradiancia, entre los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar.

**Tabla IV.8.** Resultados de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos entre los momentos “inicial 2” y “final”, para la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ , expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la tasa de conductancia estomática al agua ( $g_s$ , en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	$A_N$	$g_s$
Especie	6.75 (1) <b>0.016*</b>	54.30 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	90.43 (1) <b>0.000*</b>	0.24 (1) 0.632
Riego	44.87 (1) <b>0.000*</b>	118.97 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	14.31 (1) <b>0.001*</b>	6.00 (1) <b>0.022*</b>
Especie x riego	0.01 (1) 0.931	19.19 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia x riego	5.36 (1) <b>0.030*</b>	1.30 (1) 0.266
Especie x irradiancia x riego	0.01 (1) 0.922	0.82 (1) 0.374
Tiempo	51.47 (6) <b>0.000*</b>	25.00 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	3.57 (6) <b>0.003*</b>	6.60 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia	17.44 (6) <b>0.000*</b>	0.74 (6) 0.621
Tiempo x riego	16.87 (6) <b>0.000*</b>	21.22 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	1.34 (6) 0.243	0.89 (6) 0.507
Tiempo x especie x riego	1.63 (6) 0.144	8.22 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia x riego	10.04 (6) <b>0.000*</b>	3.10 (6) <b>0.007*</b>
Tiempo x especie x irradiancia x riego	0.74 (6) 0.621	1.88 (6) 0.089



**Figura IV.12.** Evolución temporal de la tasa instantánea de fotosíntesis neta registrada en individuos adscritos a las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas respecto al momento inicial y/o entre tratamientos de riego.



**Figura IV.13.** Evolución temporal de la tasa instantánea de conductancia estomática al agua, registrada en individuos adscritos a las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas respecto al momento inicial y/o entre tratamientos de riego.

#### IV.3.2.2. Eficiencia en el uso del agua y de la luz.

La eficiencia en el uso del agua mostrada por los individuos sometidos a los distintos tratamientos, se evaluó calculando el ratio entre la tasa de fotosíntesis neta y la tasa de conductancia estomática al agua registrada simultáneamente (eficiencia intrínseca en el uso del agua o *iWUE* (*intrinsic water-use efficiency*), Lambers *et al.* 1998). En el caso de la eficiencia en el uso de la luz, se consideró el ratio entre la tasa de fotosíntesis neta y el nivel de irradiancia incidente de la banda PAR registrado simultáneamente.

Para la eficiencia en el uso del agua, en la primera parte del experimento los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas derivadas de los efectos “especie”, “irradiancia” y “tiempo”, además de otros efectos (**Tabla IV.9**). Los mayores valores del ratio se registraron en *A. alba*, y en los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia (**Figura IV.14**). Por otro lado, en lo que respecta a la eficiencia en el uso de la luz, los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas derivadas de los efectos “irradiancia” e “irradiancia x especie”, así como debidas al paso del tiempo (**Tabla IV.9**). En ambas especies, los mayores valores del ratio se registraron en el tratamiento de baja irradiancia, si bien estas diferencias se mantuvieron a lo largo del tiempo únicamente en el caso de *A. alba*. (**Figura IV.15**).

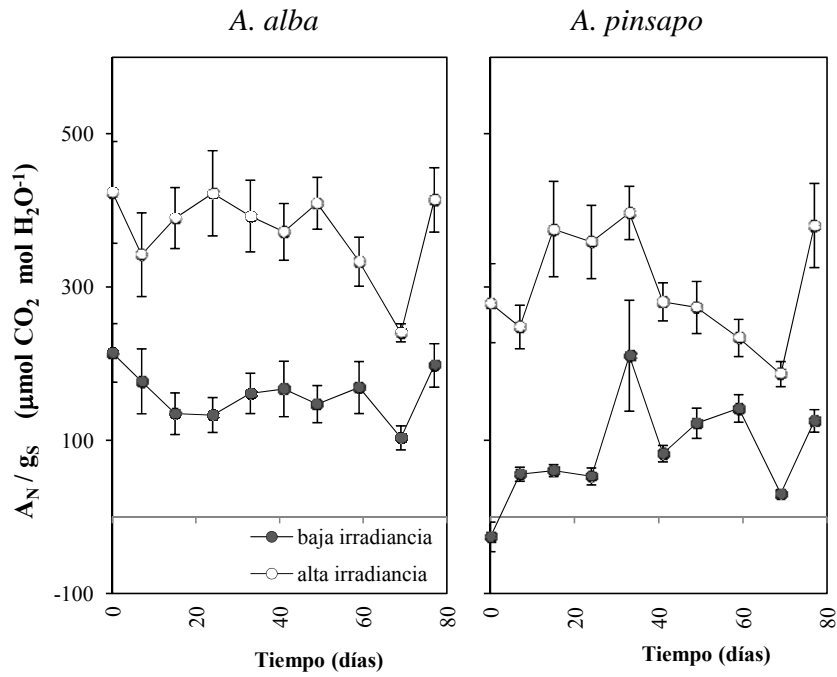
En la segunda parte del experimento, con la aplicación simultánea de los tratamientos de irradiancia y riego, los análisis estadísticos revelaron la existencia de efectos principales de todos los factores para los dos ratios considerados (**Tabla IV.10**). En el caso de la eficiencia en el uso del agua, los mayores valores se registraron en *A. alba*, y entre los individuos adscritos a alta irradiancia y al tratamiento “sin riego”. Además, se hallaron diferencias debidas al efecto “especie x riego”, derivadas del hecho de que el incremento transitorio de la *iWUE*, entre los momentos de cese del riego y de desecación, fue menor en *A. alba* que en *A. pinsapo* (**Figura IV.16**). Sin embargo, sólo se hallaron diferencias marginalmente significativas para el efecto “especie x irradiancia” ( $p = 0.054$ ).

En lo que respecta al ratio entre la tasa de fotosíntesis y los niveles de PAR registrados simultáneamente (eficiencia en el uso de la luz), los mayores valores se hallaron en *A. alba* y entre los individuos adscritos a los tratamientos de baja irradiancia y riego (**Figura IV.17**). En ambas especies, las diferencias entre tratamientos de riego fueron similares. Sin embargo, entre tratamientos de irradiancia, se hallaron mayores

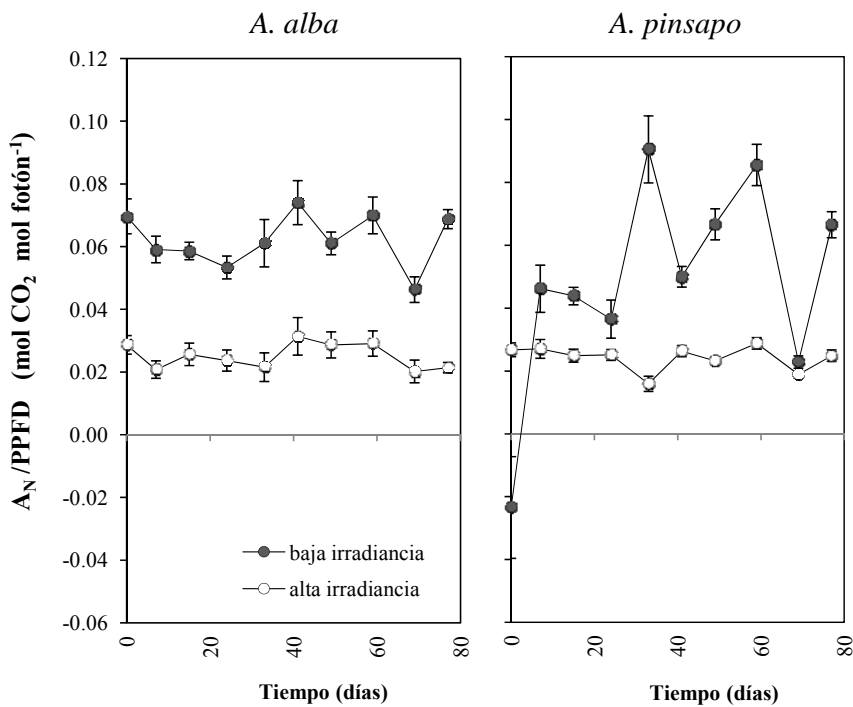
diferencias en *A. alba* que en *A. pinsapo* (diferencias significativas para el efecto “especie x irradiancia”, **Tabla IV.10**).

**Tabla IV.9.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos en el periodo de tiempo comprendido entre los momentos “inicial” e “inicial 2” para el ratio entre la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ , expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la tasa de conductancia estomática al agua ( $g_s$ , en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); y para el ratio entre la tasa de fotosíntesis neta y la irradiancia registrada simultáneamente (PPFD, del inglés *photosynthetic photon flux density*, expresada en  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	$A_N/g_s$	$A_N/PPFD$
Especie	9.63 (1) <b>0.004*</b>	1.05 (1) 0.315
Irradiancia	62.04 (1) <b>0.000*</b>	41.58 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	0.06 (1) 0.803	4.59 (1) <b>0.041*</b>
Tiempo	10.46 (9) <b>0.000*</b>	19.11 (9) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	4.86 (9) <b>0.000*</b>	15.68 (9) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia	4.35 (9) <b>0.000*</b>	18.80 (9) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	1.35 (9) 0.209	16.51 (9) <b>0.000*</b>



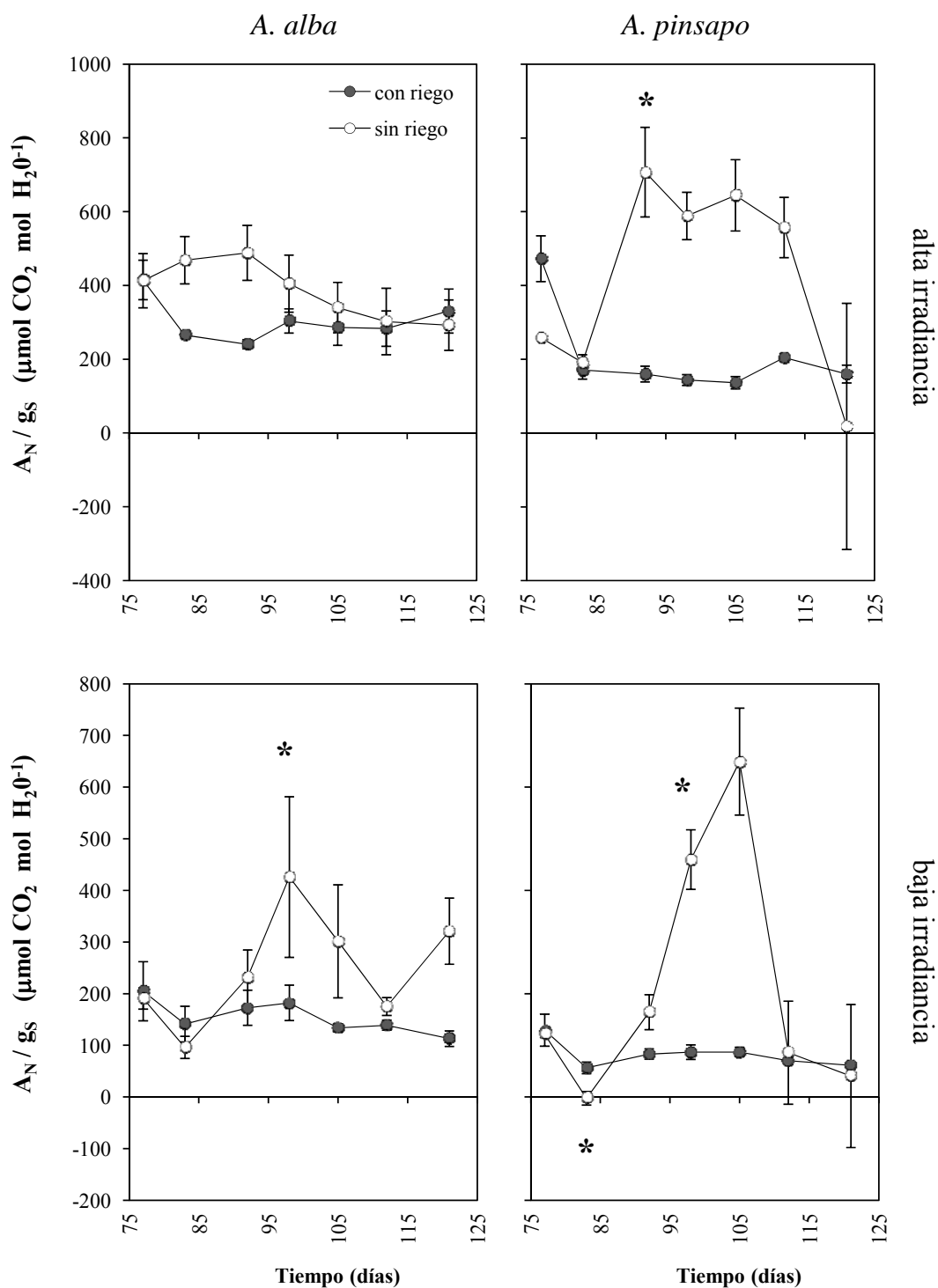
**Figura IV.14.** Evolución temporal del ratio fotosíntesis neta vs. conductancia estomática al agua, calculado conforme a las tasas de ambas variables registradas en los individuos de ambas especies sometidos a los distintos tratamientos de irradiancia, entre los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar.



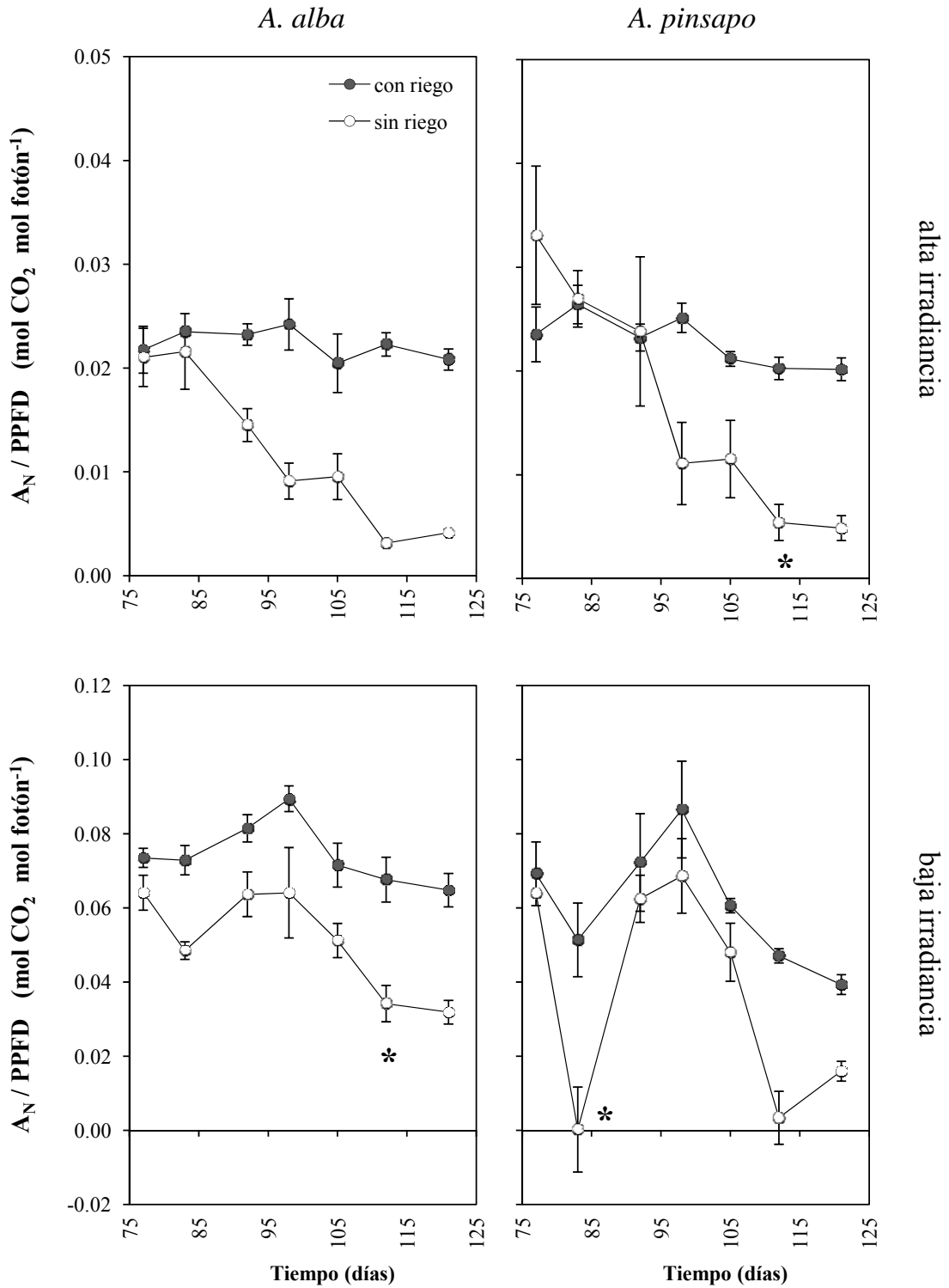
**Figura IV.15.** Evolución temporal del ratio fotosíntesis neta vs. irradiancia de medida, calculado conforme a las tasas de ambas variables registradas en los individuos de ambas especies sometidos a los distintos tratamientos de irradiancia, entre los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar.

**Tabla IV.10.** Resultados de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos entre el momento de tiempo “inicial 2” y el final del experimento para el ratio entre la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ , expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la tasa de conductancia estomática al agua ( $g_s$ , en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); y para el ratio entre la tasa de fotosíntesis neta y la irradiancia registrada simultáneamente (PPFD, expresada en  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

factor	$A_N/g_s$	$A_N/PPFD$
Especie	8.14 (1) <b>0.010*</b>	5.21 (1) <b>0.032*</b>
Irradiancia	71.86 (1) <b>0.000*</b>	264.09 (1) <b>0.000*</b>
Riego	32.38 (1) <b>0.000*</b>	45.73 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	4.17 (1) 0.054*	12.67 (1) <b>0.002*</b>
Especie x riego	10.35 (1) <b>0.004*</b>	0.16 (1) 0.697
Irradiancia x riego	0.08 (1) 0.786	10.98 (1) <b>0.003*</b>
Especie x irradiancia x riego	1.19 (1) 0.288	0.16 (1) 0.694
Tiempo	19.95 (6) <b>0.000*</b>	37.49 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	9.00 (6) <b>0.000*</b>	5.00 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x irradiancia	11.66 (6) <b>0.000*</b>	21.75 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x riego	20.56 (6) <b>0.000*</b>	7.26 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	2.36 (6) <b>0.034*</b>	4.49 (6) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x riego	9.68 (6) <b>0.000*</b>	1.45 (6) 0.201
Tiempo x irradiancia x riego	8.35 (6) <b>0.000*</b>	3.14 (6) <b>0.006*</b>
Tiempo x especie x irradiancia x riego	1.07 (6) 0.381	1.10 (6) 0.366



**Figura IV.16.** Evolución temporal del ratio fotosíntesis neta vs. conductancia estomática al agua, calculado conforme a las tasas de ambas variables registradas en individuos adscritos a las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas respecto al momento inicial y/o entre tratamientos de riego. Nótese la diferencia de escala.



**Figura IV.17.** Evolución temporal del ratio fotosíntesis neta vs. irradiancia medida, calculado conforme a las tasas de ambas variables registradas en individuos adscritos a las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas respecto al momento inicial y/o entre tratamientos de riego. Nótese la diferencia de escala.

### IV.3.3. Discriminación de isótopos estables de carbono.

La composición isotópica y la discriminación contra el isótopo pesado en acículas maduras, y en las acículas de los brotes que maduraron en el transcurso del experimento (tejido foliar “nuevo”) (**Tabla IV.1**), se analizaron sólo en muestras que se tomaron al inicio del experimento y cuando éste se dio por finalizado, casi cuatro meses después, al considerar que esta variable no iba a responder tan rápidamente como el resto de variables evaluadas.

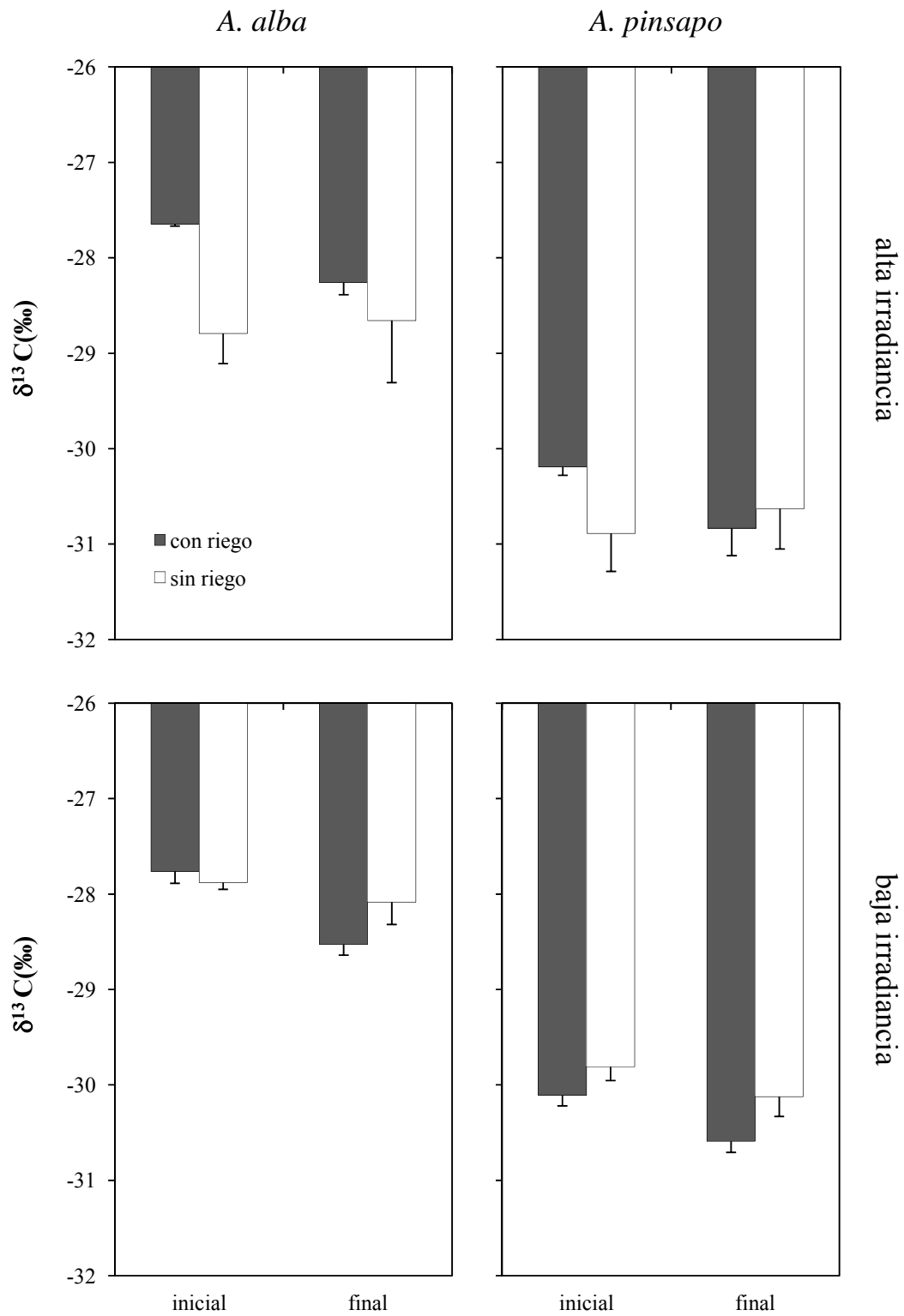
En el caso de las acículas maduras, se obtuvieron diferencias significativas entre especies, los tiempos inicial y final y entre tratamientos de irradiancia (**Tabla IV.11**). Los tejidos más enriquecidos en el isótopo pesado correspondieron a individuos adscritos al tratamiento de baja irradiancia, y a la especie *Abies alba* (**Figuras IV.18**). Con el paso del tiempo, el tejido foliar maduro se fue empobreciendo en el isótopo pesado (**Figura IV.18 y IV.19**). El efecto de los tratamientos de riego dependió del nivel de irradiancia (interacción “irradiancia x riego” significativa: el mantenimiento de riego induce los valores más negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  en plantas sujetas a baja irradiancia, pero tiene el efecto contrario a alta irradiancia). No obstante, como se deriva de la existencia de significación también para la interacción “tiempo x riego”, ese efecto a baja irradiancia es más potente que el contrario a alta irradiancia, resultando en valores medios más negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  al final del experimento en las plantas con riego que en las sometidas a sequía, independientemente del nivel de irradiancia.

En el caso de las acículas “nuevas”, los análisis estadísticos indicaron efectos significativos sobre las dos variables estudiadas por parte de los efectos principales “especie”, “irradiancia” y “tiempo” (**Tabla IV.11**), así como de la interacción “especie x irradiancia”. Como en el caso anterior, las muestras enriquecidas en el isótopo pesado correspondieron a *A. alba*, pero entre tratamientos de luz, las muestras que en esta ocasión se hallaron enriquecidas en el isótopo pesado correspondieron a los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia (**Figura IV.20**). De nuevo, el efecto de los tratamientos de riego al final del experimento fue complejo, dependiendo de su combinación con el nivel de irradiancia y la especie de que se tratara, siendo significativas las interacciones “irradiancia x riego”, “especie x irradiancia x riego” y “tiempo x especie x riego”. Con el paso del tiempo, el tejido foliar analizado se fue empobreciendo progresivamente en el isótopo pesado, al tenderse hacia una mayor discriminación contra éste, en los individuos de ambas especies adscritos al tratamiento

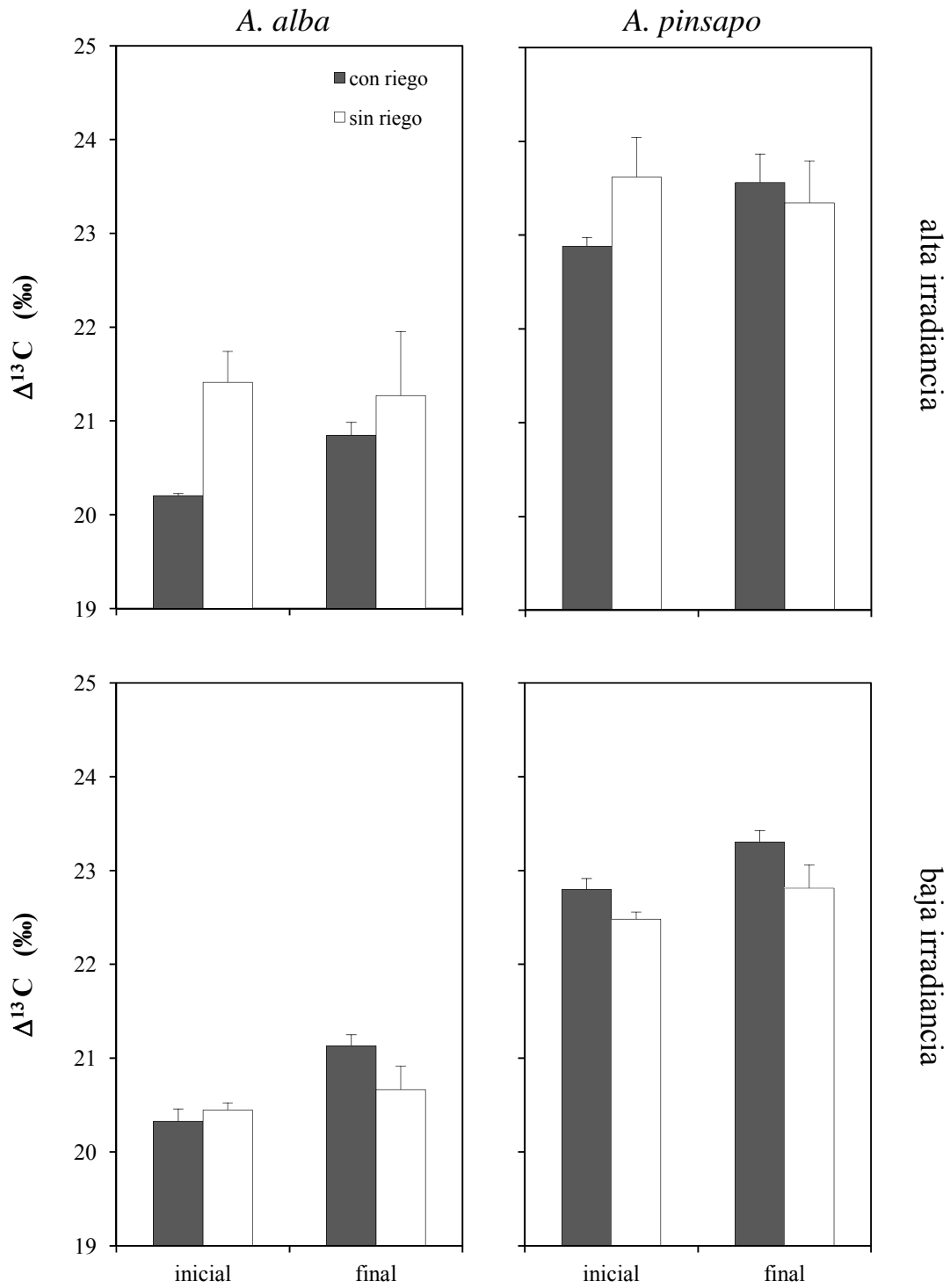
de baja irradiancia, y a “alta irradiancia / sin riego” (**Figura IV.21**). Las muestras de individuos del tratamiento “alta irradiancia / riego”, por el contrario, se enriquecieron en el isótopo pesado, porque en su caso se tendió a discriminar menos contra este isótopo. El patrón temporal en *A. alba* fue similar en ambos tratamientos de irradiancia; en cambio, en *A. pinsapo*, se hallaron diferencias notables entre ambos tratamientos de irradiancia, registrándose un acusado descenso (empobrecimiento en el isótopo pesado, mayor discriminación) en el tratamiento a baja irradiancia. Finalmente, dentro de cada combinación de especie y tratamiento de luz, únicamente se hallaron diferencias *a posteriori* entre tratamientos de riego en los individuos de *A. pinsapo* adscritos al tratamiento de baja irradiancia. En este caso, con el tiempo, el tejido foliar de los individuos regados mostró un progresivo empobrecimiento en el isótopo pesado (**Figura IV.20**).

**Tabla IV.11.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos obtenidos entre los momentos inicial y final del experimento, para la composición en isótopos estables de carbono, expresada en tanto por mil y calculada en relación con el estándar de Belemnita PeeDee (PDB) ( $\delta^{13}\text{C}$ ), y para la discriminación contra el isótopo pesado del carbono, expresada en tanto por mil y calculada conforme a Farquhar *et al.* (1989) ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) en muestras de tejido foliar maduro y “nuevo” (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

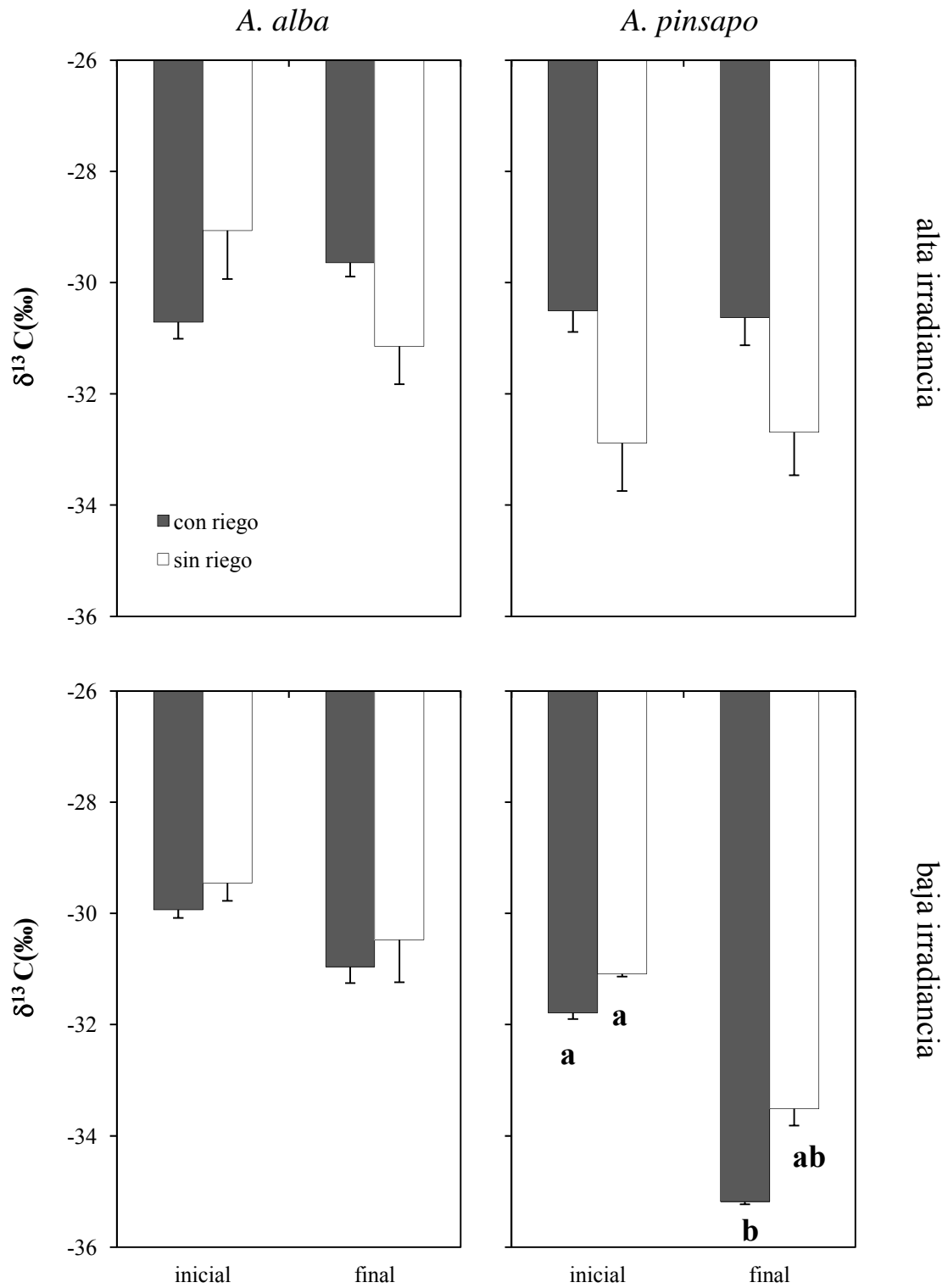
efecto	$\delta^{13}\text{C}$ - maduro	$\Delta^{13}\text{C}$ - maduro	$\delta^{13}\text{C}$ - “nuevo”	$\Delta^{13}\text{C}$ - “nuevo”
Especie	194.4 (1) <b>0.000*</b>	194.20 (1) <b>0.000*</b>	67.03 (1) <b>0.000*</b>	67.21 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	5.7 (1) <b>0.025*</b>	5.71 (1) <b>0.025*</b>	6.14 (1) <b>0.021*</b>	6.17 (1) <b>0.020*</b>
Riego	0.6 (1) 0.459	0.57 (1) 0.459	0.22 (1) 0.645	0.22 (1) 0.643
Especie x irradiancia	0.4 (1) 0.532	0.41 (1) 0.529	4.96 (1) <b>0.036*</b>	4.99 (1) <b>0.035*</b>
Especie x riego	1.4 (1) 0.248	1.39 (1) 0.249	2.35 (1) 0.139	2.33 (1) 0.140
Irradiancia x riego	6.2 (1) <b>0.020*</b>	6.20 (1) <b>0.020*</b>	13.69 (1) <b>0.001*</b>	13.77 (1) <b>0.001*</b>
Especie x irradiancia x riego	0.2 (1) 0.626	0.24 (1) 0.629	8.42 (1) <b>0.008*</b>	8.48 (1) <b>0.008*</b>
Tiempo	9.8 (1) <b>0.005*</b>	9.78 (1) <b>0.005*</b>	20.54 (1) <b>0.000*</b>	20.68 (1) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie	0.1 (1) 0.745	0.10 (1) 0.751	1.93 (1) 0.177	1.98 (1) 0.172
Tiempo x irradiancia	1.2 (1) 0.291	1.16 (1) 0.293	12.65 (1) <b>0.002*</b>	12.77 (1) <b>0.002*</b>
Tiempo x riego	8.1 (1) <b>0.009*</b>	8.06 (1) <b>0.009*</b>	0.91 (1) 0.349	0.89 (1) 0.354
Tiempo x especie x irradiancia	0.0 (1) 0.926	0.01 (1) 0.928	6.25 (1) <b>0.020*</b>	6.33 (1) <b>0.019*</b>
Tiempo x especie x riego	0.1 (1) 0.782	0.07 (1) 0.789	5.20 (1) <b>0.032*</b>	5.23 (1) <b>0.031*</b>
Tiempo x irradiancia x riego	1.2 (1) 0.281	1.21 (1) 0.282	3.83 (1) 0.062*	3.84 (1) 0.062*
Tiempo x especie x irradiancia x riego	0.4 (1) 0.517	0.44 (1) 0.516	1.67 (1) 0.208	1.66 (1) 0.210



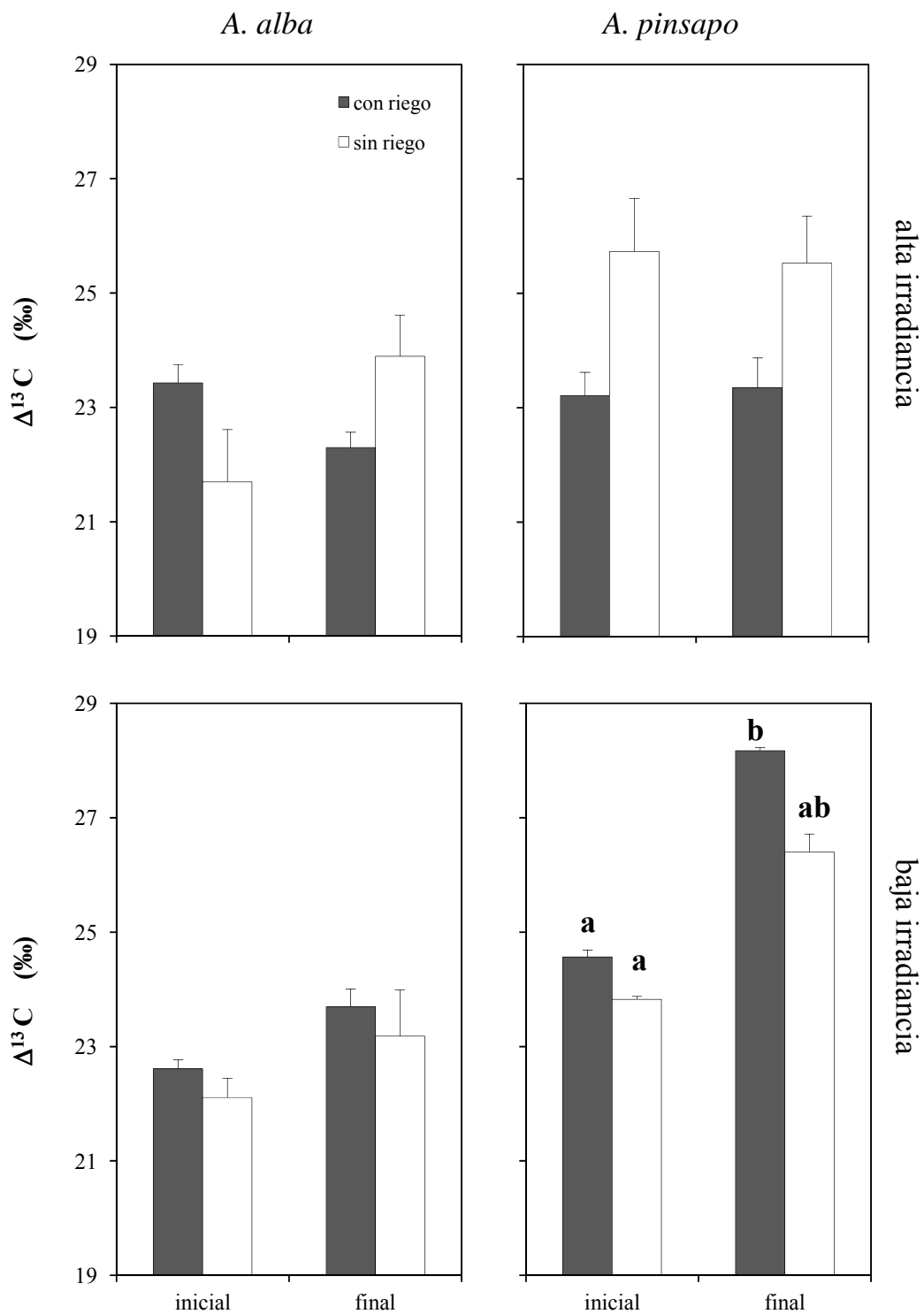
**Figura IV.18.** Composición en isótopos estables de acículas maduras, medida en individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” y “final” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. En ningún caso se hallaron diferencias significativas.



**Figura IV.19.** Discriminación contra el isótopo pesado en acículas maduras, hallada en individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” y “final” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. En ningún caso se hallaron diferencias significativas.



**Figura IV.20.** Composición en isótopos estables de acículas “nuevas”, medida en individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” y “final” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas.



**Figura IV.21.** Discriminación contra el isótopo pesado en acículas “nuevas”, hallada en individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” y “final” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas.

#### IV.3.4. Determinación de carbohidratos no estructurales en tejido foliar.

##### IV.3.4.1. Contenido en carbohidratos no estructurales en tejido foliar maduro.

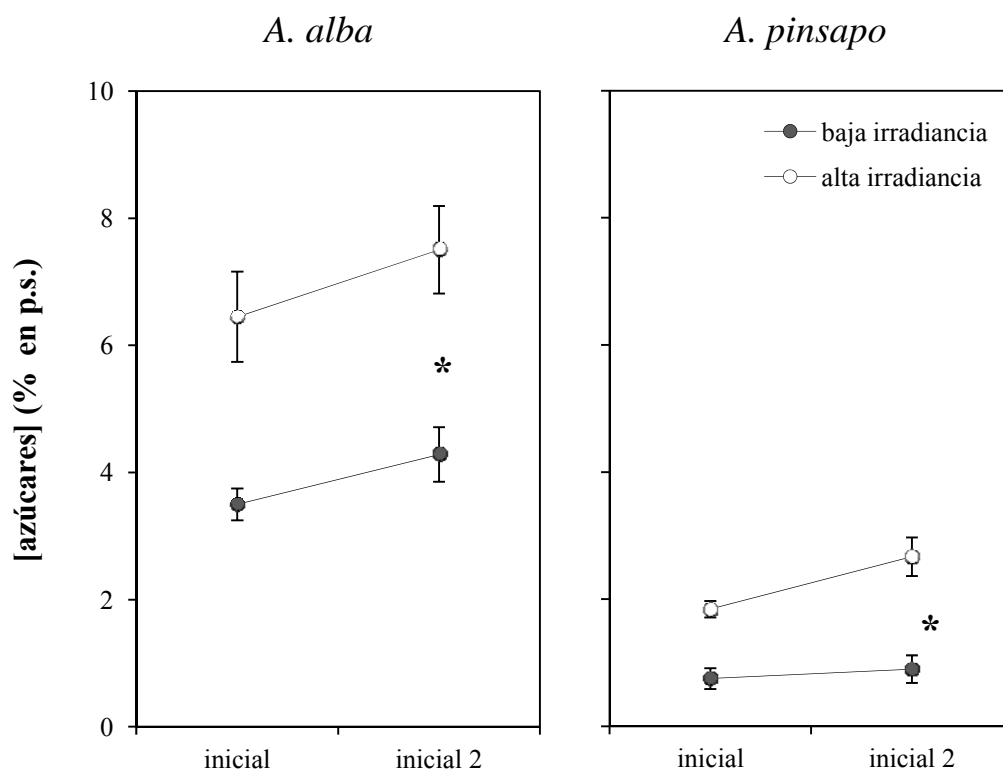
Durante la primera parte del experimento se obtuvieron diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de irradiancia y con el tiempo en lo que respecta al contenido en azúcares libres del tejido foliar maduro (**Tabla IV.12**). La mayor concentración de estos azúcares se halló en *A. alba*, y en los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia. Con el tiempo, tuvo lugar un incremento en la concentración de estos compuestos (**Figura IV.22**).

En el caso del almidón, se hallaron diferencias significativas debidas a los tratamientos de irradiancia y al paso del tiempo, pero no entre especies (**Tabla IV.12**). Los mayores niveles se registraron nuevamente en el tratamiento a alta irradiancia. Con el tiempo, se produjo una disminución en la concentración de este compuesto, salvo en los individuos de pinsapo sometidos a baja irradiancia (**Figura IV.23**). Esta evolución temporal es similar a la hallada en el caso del total de carbohidratos no estructurales (**Figura IV.24**), para los que se hallaron diferencias significativas entre especies, derivadas de la aplicación de los tratamientos de irradiancia, y debidas al paso del tiempo (**Tabla IV.12**). Al igual que para los azúcares totales, las mayores concentraciones se hallaron en *A. alba* y en el tratamiento a alta irradiancia.

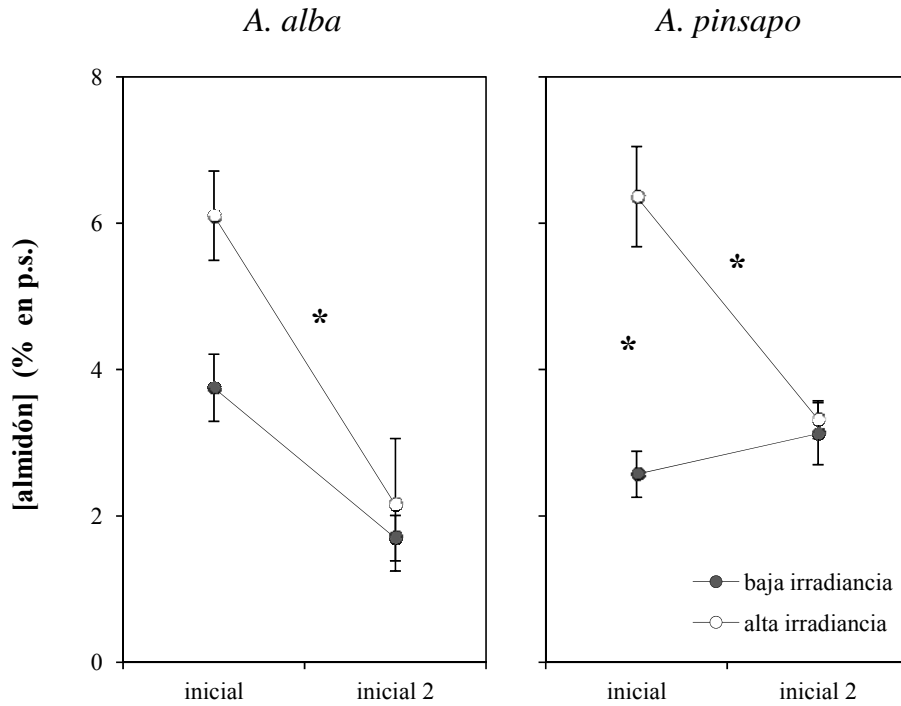
En la segunda parte del experimento (inclusión del tratamiento de desecación), se obtuvieron diferencias significativas entre especies (para las tres variables estudiadas) y entre tratamientos de irradiancia (sólo en el caso de los azúcares libres y del total de carbohidratos), sin que en ningún caso se hallasen diferencias entre los tratamientos de riego (**Tabla IV.13**). Tampoco se hallaron diferencias significativas con el paso del tiempo. El contenido en azúcares fue superior en *A. alba* y en los individuos sometidos a alta irradiancia, como en la primera parte del experimento. Con el tiempo, la concentración se mantuvo prácticamente constante, salvo en el caso de los individuos de *A. pinsapo* a baja irradiancia, en los que se produjo un leve incremento (**Figura IV.25**). En el caso del almidón, las mayores concentraciones se hallaron en *A. pinsapo*, aunque los valores fueron muy similares a los hallados en *A. alba* (**Figura IV.26**). El contenido total en carbohidratos no estructurales fue superior en *A. alba* y en el tratamiento a alta irradiancia, como en la primera parte del experimento (**Figura IV.27**).

**Tabla IV.12.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos obtenidos en el periodo de tiempo comprendido entre los momentos “inicial” e “inicial 2” para las variables “[azúcares]”, “[almidón]” y “[NSC]” (contenido foliar en azúcares libres de bajo peso molecular, en almidón y en carbohidratos no estructurales totales, respectivamente, expresado como porcentaje en peso seco). Estas variables se midieron en muestras de tejido foliar maduro (de un año de edad) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

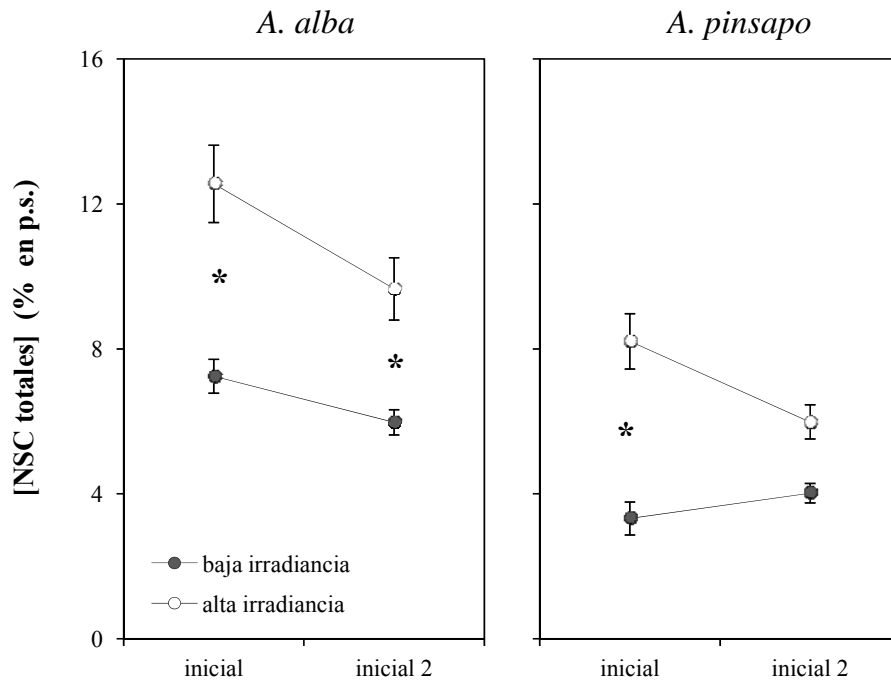
factor	[azúcares]	[almidón]	[NSC]
Especie	171.26 (1) <b>0.000*</b>	1.13 (1) 0.297	69.13 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	55.02 (1) <b>0.000*</b>	18.64 (1) <b>0.000*</b>	84.13 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	0.67 (1) 0.422	0.56 (1) 0.462	0.90 (1) 0.351
Tiempo	10.91 (1) <b>0.003*</b>	33.69 (1) <b>0.000*</b>	5.97 (1) <b>0.021*</b>
Tiempo x especie	0.01 (1) 0.945	5.76 (1) <b>0.023*</b>	2.54 (1) 0.122
Tiempo x irradiancia	0.87 (1) 0.360	14.09 (1) <b>0.001*</b>	6.92 (1) <b>0.014*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	1.04 (1) 0.316	1.36 (1) 0.253	3.57 (1) 0.069*



**Figura IV.22.** Contenido foliar en azúcares libres, de bajo peso molecular (expresado como porcentaje en peso seco.) hallado en acículas maduras de individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia.



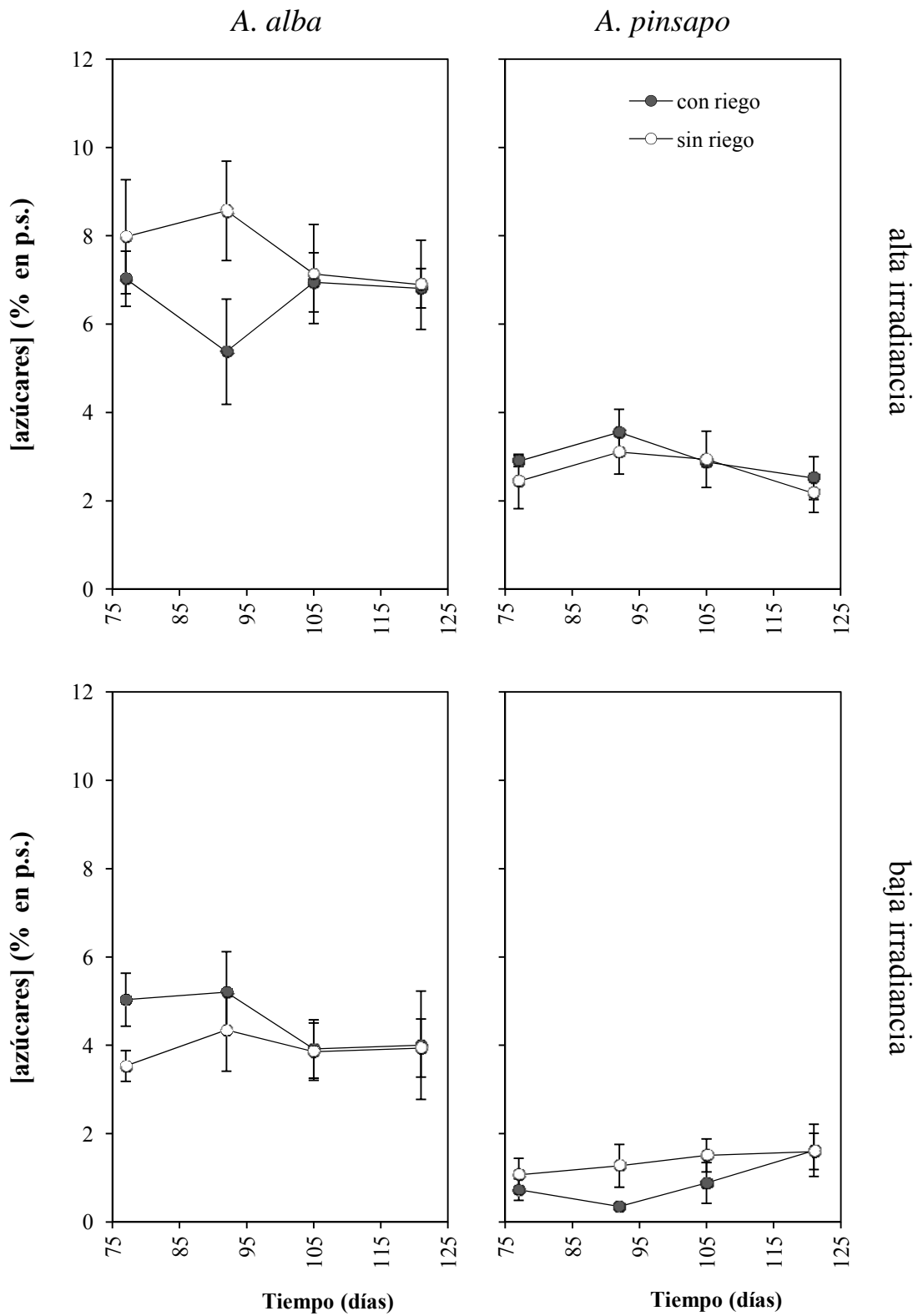
**Figura IV.23.** Contenido foliar en almidón (expresado como porcentaje en peso seco.), hallado en acículas maduras de individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia y momentos del tiempo.



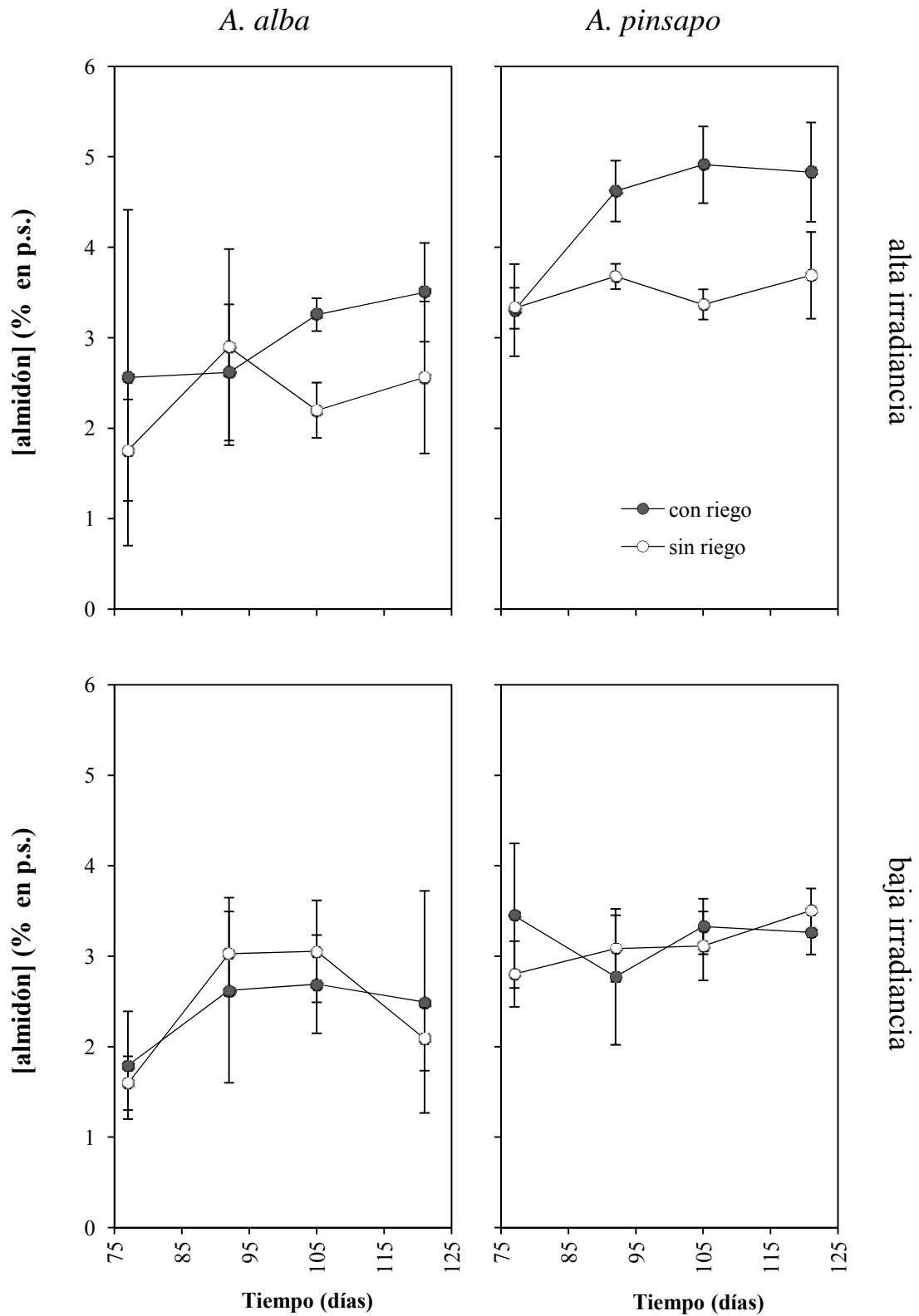
**Figura IV.24.** Contenido foliar total en carbohidratos no estructurales (expresado como porcentaje en peso seco.), hallado en acículas maduras de individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia

**Tabla IV.13.** Resultados de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos obtenidos entre el momento de tiempo “inicial 2” y el final del experimento para las variables “[azúcares]”, “[almidón]” y “[NSC]” (contenido foliar en azúcares libres de bajo peso molecular, en almidón y en carbohidratos no estructurales totales, respectivamente, expresado como porcentaje en peso seco). Estas variables se midieron en muestras de tejido foliar maduro (de un año de edad) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

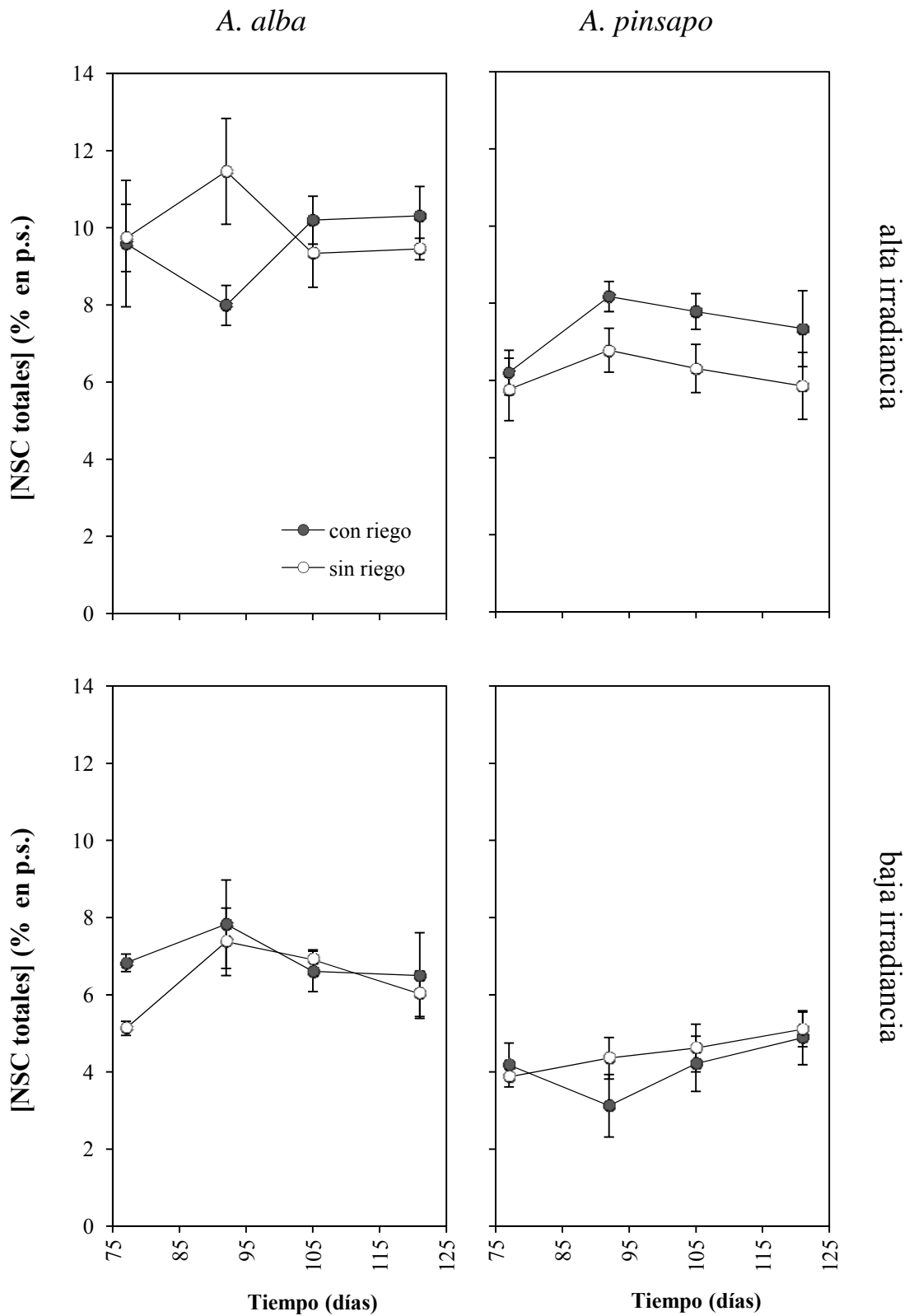
factor	[azúcares]	[almidón]	[NSC]
Especie	91.79 (1) <b>0.000*</b>	10.94 (1) <b>0.003*</b>	49.10 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	37.76 (1) <b>0.000*</b>	2.88 (1) 0.103	53.92 (1) <b>0.000*</b>
Riego	0.27 (1) 0.607	1.61 (1) 0.217	0.16 (1) 0.696
Especie x irradiancia	1.02 (1) 0.322	0.81 (1) 0.377	0.26 (1) 0.618
Especie x riego	0.10 (1) 0.757	0.10 (1) 0.753	0.03 (1) 0.859
Irradiancia x riego	0.13 (1) 0.724	1.46 (1) 0.238	0.50 (1) 0.487
Especie x irradiancia x riego	2.63 (1) 0.118	0.02 (1) 0.900	3.47 (1) 0.075
Tiempo	0.04 (3) 0.990	2.70 (3) 0.052	1.95 (3) 0.129
Tiempo x especie	1.45 (3) 0.237	0.41 (3) 0.748	1.04 (3) 0.381
Tiempo x irradiancia	1.61 (3) 0.195	0.30 (3) 0.822	0.47 (3) 0.707
Tiempo x riego	1.51 (3) 0.220	0.52 (3) 0.669	2.20 (3) 0.096
Tiempo x especie x irradiancia	5.48 (3) <b>0.002*</b>	0.89 (3) 0.452	5.24 (3) <b>0.003*</b>
Tiempo x especie x riego	0.42 (3) 0.743	0.35 (3) 0.791	0.18 (3) 0.912
Tiempo x irradiancia x riego	0.44 (3) 0.725	0.57 (3) 0.640	1.61 (3) 0.196
Tiempo x especie x irradiancia x riego	2.62 (3) 0.057	0.47 (3) 0.704	1.87 (3) 0.142



**Figura IV.25.** Evolución temporal del contenido en azúcares libres hallado en acículas maduras de individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras de error representan el error estándar.



**Figura IV.26.** Evolución temporal del contenido en almidón hallado en acículas maduras de individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar.



**Figura IV.27.** Evolución temporal del contenido total en carbohidratos no estructurales hallado acículas maduras de individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar.

#### IV.3.4.2. Contenido en carbohidratos no estructurales en tejido foliar “nuevo”.

En la primera parte del experimento, los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas en la concentración de azúcares libres entre especies, tratamientos de irradiancia y los distintos momentos del tiempo considerados (**Tabla IV.14**). Los mayores valores se hallaron en *A. alba* y en el tratamiento de alta irradiancia. De forma general, independientemente de la combinación de irradiancia y riego, la concentración de azúcares libres se incrementó con el paso del tiempo (**Figura IV.28**).

Para el almidón, se hallaron diferencias significativas entre especies, tratamientos de irradiancia y momentos de tiempo (**Tabla IV.14**). Los mayores niveles de este compuesto se hallaron asimismo en *A. alba* y a alta irradiancia (**Figura IV.29**). Con el tiempo se produjo una disminución en el contenido de almidón, salvo en los individuos de pinsapo sometidos a baja irradiancia, en los que se mantuvo prácticamente constante.

En lo que respecta al contenido en carbohidratos totales no estructurales, se hallaron diferencias significativas entre especies y entre tratamientos de irradiancia, pero no con el paso del tiempo (salvo por el efecto “tiempo x especie x irradiancia”) (**Tabla IV.14**). Los mayores valores se hallaron de nuevo en *A. alba*, y en el tratamiento a alta irradiancia. Con el tiempo, el contenido en este tipo de compuestos se mantuvo prácticamente constante en los individuos de *A. alba* adscritos a ambos tratamientos de irradiancia, y para *A. pinsapo* bajo alta irradiancia, experimentándose un ligero incremento en individuos de esta última especie sometidos al tratamiento de baja irradiancia (**Figura IV.30**).

En la segunda parte del experimento, en lo que respecta al contenido en azúcares libres, se hallaron diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia (mayores concentraciones a alta irradiancia) y con el tiempo (**Tabla IV.15**) (incremento paulatino de las concentraciones) (**Figura IV.31**). Si bien apenas hubo diferencias entre los individuos de *A. pinsapo* adscritos a ambos tratamientos de irradiancia, sí que las hubo en el caso de *A. alba*, con las mayores concentraciones registradas en el tratamiento a alta irradiancia.

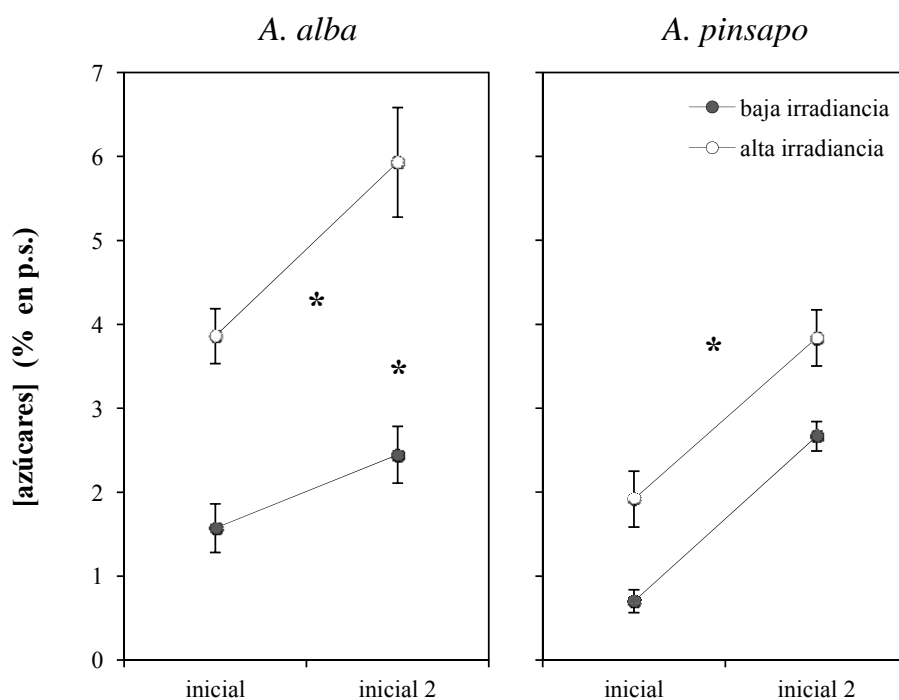
Para el contenido en almidón, se hallaron diferencias significativas entre especies, con el tiempo y derivadas de la aplicación de los distintos tratamientos de luz y de riego (**Tabla IV.15**). Las mayores concentraciones de este compuesto se hallaron en *A. alba*, y en los individuos adscritos a los tratamientos de alta irradiancia y riego.

Con el tiempo se produjo, en primer lugar, un leve incremento en las concentraciones, para posteriormente descender, de forma especialmente marcada en los individuos de ambas especies sometidos al tratamiento “alta irradiancia / sin riego” (**Figura IV.32**). Para este compuesto, apenas hubo diferencias entre las concentraciones registradas a alta y a baja irradiancia en individuos de *A. alba*. Sí las hubo, en cambio, en el caso de *A. pinsapo*, para el que se hallaron las mayores concentraciones a alta irradiancia. Asimismo, se hallaron diferencias para el efecto “irradiancia x riego”, encontrándose concentraciones similarmente bajas a baja irradiancia (con y sin riego) y a “alta irradiancia / sin riego”. Las mayores concentraciones se registraron en el tratamiento “alta irradiancia / riego”.

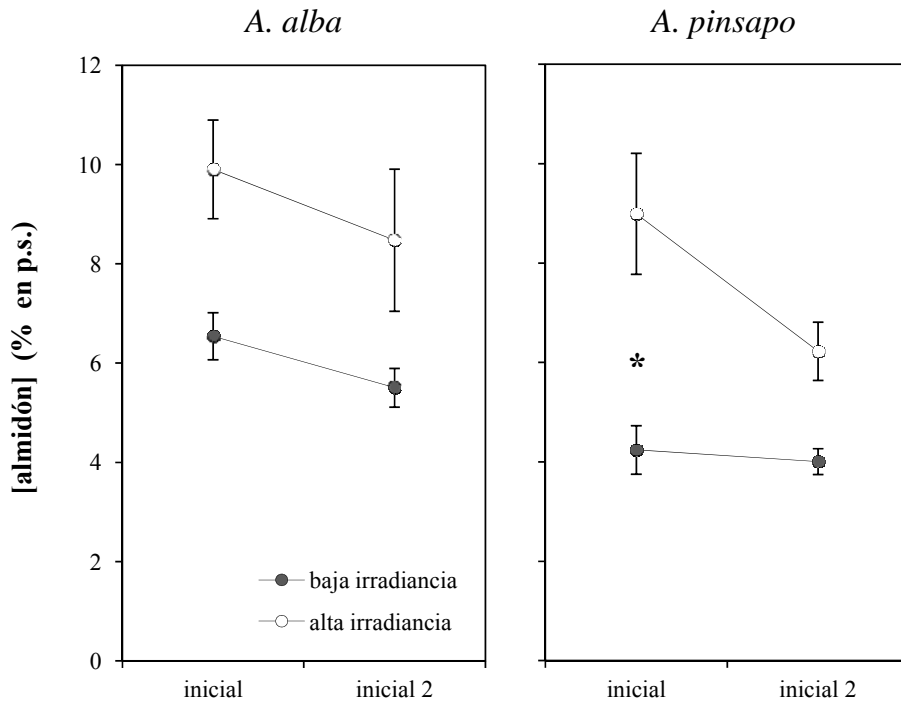
Respecto al contenido total en carbohidratos no estructurales, los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de irradiancia y con el paso del tiempo, sin encontrarse diferencias derivadas directamente de la aplicación de los tratamientos de riego (**Tabla IV.15**). Las mayores concentraciones se hallaron nuevamente en *A. alba*, y en los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia. Al igual que en el caso del almidón, con el paso del tiempo tuvo lugar, en un primer momento, un incremento en la concentración de estos compuestos, para posteriormente decaer hasta valores similares a los registrados inicialmente. Este descenso fue, de nuevo, especialmente marcado para los individuos de ambas especies adscritos al tratamiento “alta irradiancia / sin riego” (**Figura IV.33**).

**Tabla IV.14.** Resultado de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos recogidos en el periodo de tiempo comprendido entre los momentos “inicial” e “inicial 2” para las variables “azúcares”, “almidón” y “NSC” (contenido foliar en azúcares libres de bajo peso molecular, en almidón y en carbohidratos no estructurales totales, respectivamente, expresado como porcentaje en peso seco). Estas variables se midieron en muestras de acículas de brotes que se abrieron en el transcurso del experimento (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

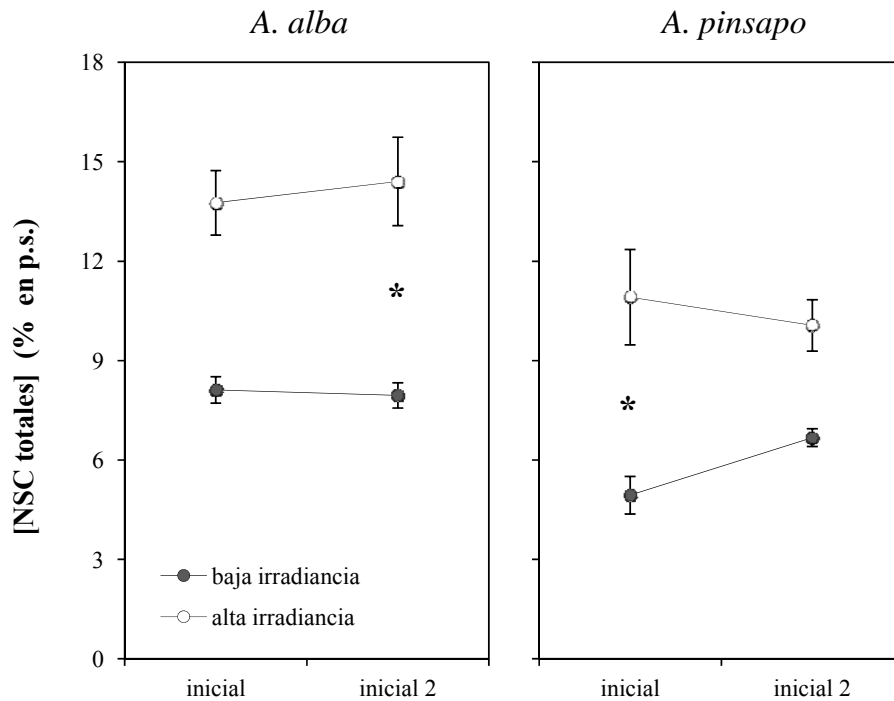
factor	[azúcares]	[almidón]	[NSC]
Especie	17.14 (1) <b>0.000*</b>	12.20 (1) <b>0.002*</b>	25.62 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	51.99 (1) <b>0.000*</b>	35.94 (1) <b>0.000*</b>	77.44 (1) <b>0.000*</b>
Especie x irradiancia	8.94 (1) <b>0.006*</b>	1.30 (1) 0.264	0.03 (1) 0.863
Tiempo	64.19 (1) <b>0.000*</b>	7.29 (1) <b>0.012*</b>	2.04 (1) 0.164
Tiempo x especie	1.22 (1) 0.279	0.00 (1) 0.996	1.56 (1) 0.222
Tiempo x irradiancia	1.81 (1) 0.189	1.65 (1) 0.210	2.42 (1) 0.131
Tiempo x especie x irradiancia	2.13 (1) 0.156	1.09 (1) 0.306	4.58 (1) <b>0.041*</b>



**Figura IV.28.** Contenido foliar en azúcares libres, de bajo peso molecular (expresado como porcentaje en peso seco) hallado en acículas “nuevas” de individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre momentos del tiempo y/o tratamientos de irradiancia.



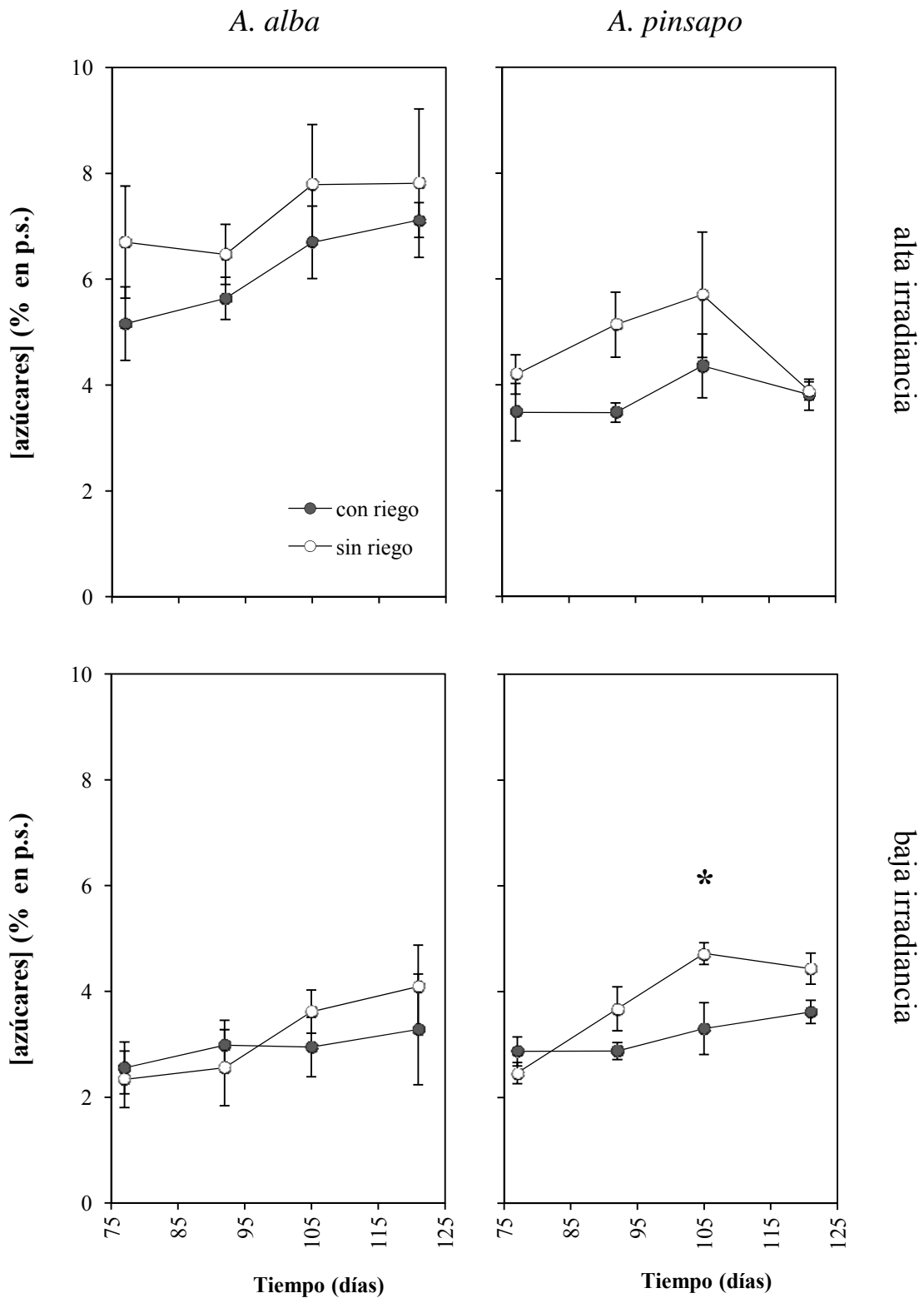
**Figura IV.29.** Contenido foliar en almidón (expresado como porcentaje en peso seco), hallado en acículas “nuevas” de individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. El asterisco indica la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia.



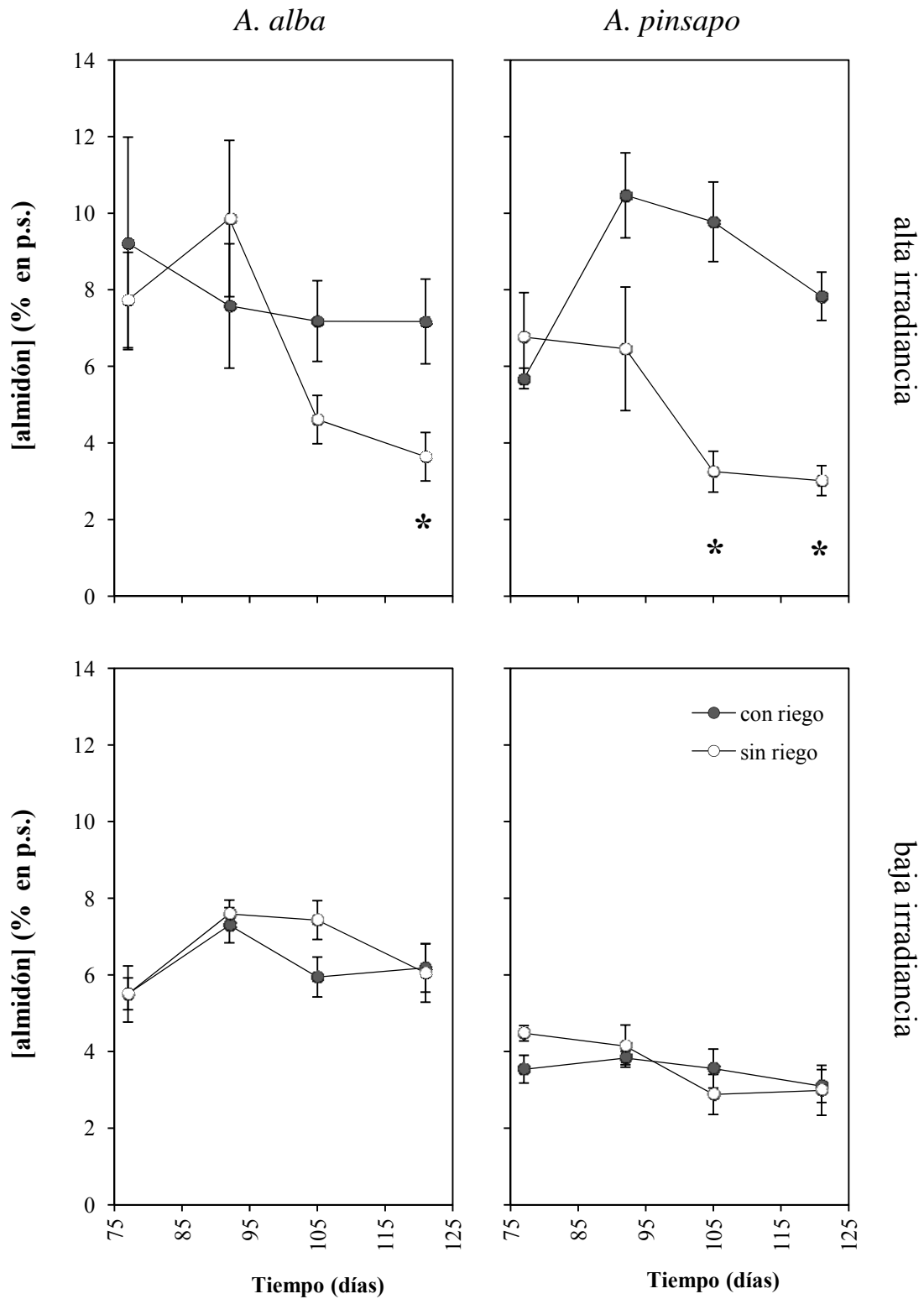
**Figura IV.30.** Contenido foliar total en carbohidratos no estructurales (expresado como porcentaje en peso seco), hallado en acículas “nuevas” de individuos de ambas especies, en los momentos “inicial” e “inicial 2” del experimento. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos de irradiancia.

**Tabla IV.15.** Resultados de los análisis estadísticos efectuados sobre los datos obtenidos entre el momento de tiempo “inicial 2” y el final del experimento para las variables “[azúcares]”, “[almidón]” y “[NSC]” (contenido foliar en azúcares libres de bajo peso molecular, en almidón y en carbohidratos no estructurales totales, respectivamente, expresado como porcentaje en peso seco. Estas variables se midieron en acículas de brotes que se abrieron en el transcurso del experimento (tejido foliar “nuevo”) (GLM y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*).

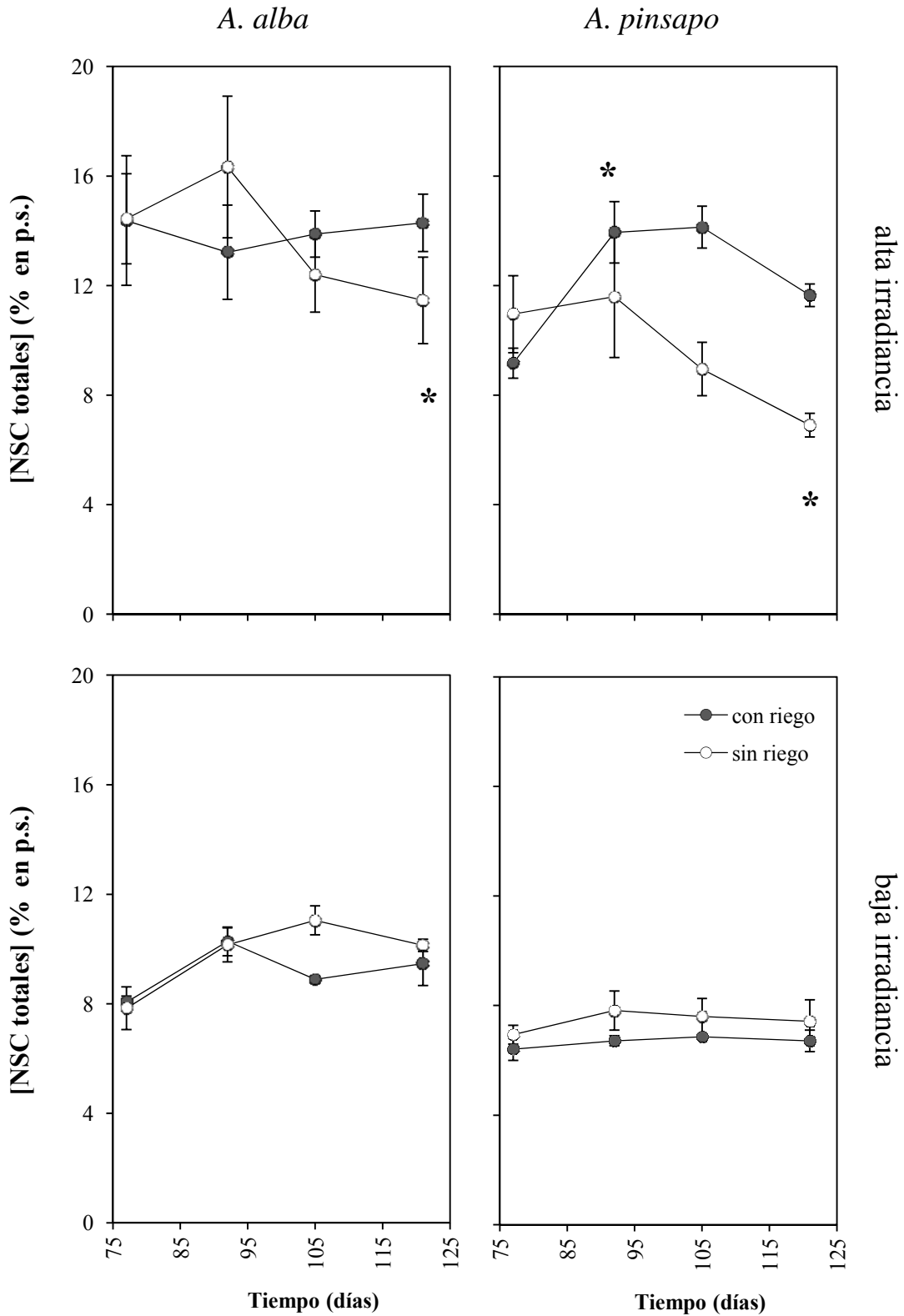
factor	[azúcares]	[almidón]	[NSC]
Especie	3.99 (1) 0.057	22.93 (1) <b>0.000*</b>	28.32 (1) <b>0.000*</b>
Irradiancia	44.06 (1) <b>0.000*</b>	16.90 (1) <b>0.000*</b>	57.76 (1) <b>0.000*</b>
Riego	3.68 (1) 0.067	8.35 (1) <b>0.008*</b>	0.55 (1) 0.466
Especie x irradiancia	17.21 (1) <b>0.000*</b>	13.51 (1) <b>0.001*</b>	0.16 (1) 0.697
Especie x riego	0.32 (1) 0.575	2.44 (1) 0.132	0.86 (1) 0.362
Irradiancia x riego	0.20 (1) 0.659	11.06 (1) <b>0.003*</b>	5.29 (1) <b>0.030*</b>
Especie x irradiancia x riego	0.02 (1) 0.885	1.40 (1) 0.249	1.71 (1) 0.203
Tiempo	11.51 (3) <b>0.000*</b>	11.58 (3) <b>0.000*</b>	6.55 (3) <b>0.001*</b>
Tiempo x especie	0.94 (3) 0.426	0.14 (3) 0.937	0.76 (3) 0.522
Tiempo x irradiancia	1.61 (3) 0.195	1.97 (3) 0.126	3.95 (3) <b>0.012*</b>
Tiempo x riego	0.97 (3) 0.411	6.71 (3) <b>0.000*</b>	3.28 (3) <b>0.026*</b>
Tiempo x especie x irradiancia	0.70 (3) 0.555	3.00 (3) <b>0.036*</b>	2.95 (3) <b>0.038*</b>
Tiempo x especie x riego	1.31 (3) 0.279	3.79 (3) <b>0.014*</b>	2.27 (3) 0.088
Tiempo x irradiancia x riego	2.93 (3) <b>0.039*</b>	3.85 (3) <b>0.013*</b>	6.82 (3) <b>0.000*</b>
Tiempo x especie x irradiancia x riego	0.09 (3) 0.966	0.99 (3) 0.402	1.43 (3) 0.241



**Figura IV.31.** Evolución temporal del contenido en azúcares libres hallado acúlas “nuevas” de individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. El asterisco indica la existencia de diferencias significativas.



**Figura IV.32.** Evolución temporal del contenido en almidón hallado acículas “nuevas” de individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas.



**Figura IV.33.** Evolución temporal del contenido total en carbohidratos no estructurales hallado acículas “nuevas” de individuos de ambas especies, entre los momentos “inicial 2” y “final”. Las barras verticales representan el error estándar. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas.

#### IV.4. Discusión.

##### IV.4.1. Diferencias interespecíficas en respuesta a la combinación de estrés hídrico y déficit energético. Evaluación del trade-off en el par de recursos agua – luz.

La respuesta ecofisiológica a la desecación del sustrato incluyó, conforme a lo esperado, un descenso del potencial hídrico xilemático (Larcher, 1995; Lambers *et al.* 1998), y del RWC de las acículas, más pronunciado y precoz en *A. pinsapo* que en *A. alba*, independientemente del nivel de irradiancia (**Figuras IV.8 y IV.9, Tabla IV.16**). Ese comportamiento diferencial puede interpretarse en términos de variación interespecífica en la evolución experimentada por mecanismos relacionados con el intercambio gaseoso. Así, la conductancia estomática mostró menos variabilidad y niveles por lo general inferiores en *A. alba* para las distintas combinaciones de irradiancia y riego (**Figura IV.13**). Por el contrario, en *A. pinsapo* se detectaron cambios notables tras la primera semana de exclusión del riego en el tratamiento de alta irradiancia, y tras dos semanas a baja irradiancia (**Tabla IV.16**). Respecto a la fotosíntesis neta, la respuesta a la desecación fue simultánea en ambas especies a alta irradiancia (**Tabla IV.16, Figura IV.12**). Sin embargo, a baja irradiancia, solo hubo tasas significativamente menores respecto al control con riego en *A. pinsapo*, aunque de modo tardío, dos semanas después que a alta irradiancia (**Tabla IV.16**).

*A priori*, estos resultados apuntarían a una mayor sensibilidad a cambios en la humedad del sustrato en *A. pinsapo*, dado que esta especie modificó su comportamiento (intercambio gaseoso) en mayor grado y de forma más rápida. Sin embargo, aunque *A. alba* no experimentó cambios tan notables, sí tuvo una respuesta más modulada a corto y a largo plazo tras la aplicación del tratamiento de estrés hídrico. Desde esta perspectiva, *A. alba* parece tener una mayor capacidad homeostática, desarrollando ajustes fisiológicos tendentes a conseguir una mayor independencia de las variaciones experimentadas en las condiciones ambientales, mientras que *A. pinsapo* experimenta en mayor medida las consecuencias del estrés aplicado en su estatus hídrico (potencial hídrico y RWC del tejido foliar). Estas diferencias interespecíficas radican fundamentalmente en el control de la apertura estomática, aparentemente deficitario en *A. pinsapo*, lo que explicaría que en los individuos control de esta especie se registrasen por lo general tasas de conductancia estomática que prácticamente doblaban las registradas en *A. alba*. En los individuos sometidos al tratamiento “sin riego”, por su

parte, al principio se registraron tasas similares a las del tratamiento de riego, pero a medida que avanzaba el proceso de estrés, las tasas registradas en ambas especies descendieron a valores similares, especialmente a alta irradiancia. Dadas las diferencias existentes en las tasas registradas en ambas especies, el descenso observado se produjo progresivamente en *A. alba*, pero de forma brusca en *A. pinsapo*.

Por otro lado, el hecho de que a “alta irradiancia / riego” se registrasen mayores tasas de fijación de C en individuos de *A. pinsapo* que de *A. alba* y que, sin embargo, a “baja irradiancia / riego”, se hallasen tasas de fijación de C similares en ambas especies, a pesar de las diferencias registradas en las tasas de conductancia estomática, podría deberse a las diferencias observadas en el equipo pigmentario, mayor y más eficiente en *A. alba* (ver **Sección III.4.3**). Así, la estrategia seguida por los individuos de *A. pinsapo* adscritos al tratamiento “baja irradiancia / riego” (ya detectada previamente, ver **Sección III.4.4**), resultado de una menor capacidad de su equipo pigmentario, consistiría en suplir esta carencia manteniendo los estomas más abiertos, en un intento de maximizar la fijación de carbono con la escasa irradiancia recibida aún a costa de que se produzca, consecuentemente, un descenso en la eficiencia en el uso del agua.

En cuanto a la conductancia estomática, se encontró en todos los casos una relación significativa con la pauta de desecación del sustrato, apreciándose fundamentalmente una segregación por especies pero no por tratamientos de irradiancia (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ) (**Tabla IV.17, Figura IV.35**). Sin embargo, el efecto limitador sobre la fijación de C de este empeoramiento del estatus hídrico de los individuos no es aparente cuando concurre una limitación por baja irradiancia. Así, la fotosíntesis neta a baja irradiancia no mostró en ninguna de las dos especies el alto grado de dependencia de la humedad en el sustrato que sí experimenta la conductancia estomática (**Tabla IV.17, Figura IV.34**). Sin embargo, a alta irradiancia, ambas variables muestran una clara dependencia de la humedad, especialmente fuerte en *A. pinsapo* (comparación de las pendientes de la relación funcional; ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ).

Los cambios más notables frente al estrés hídrico se manifestaron siempre con mayor prontitud en el tratamiento a alta irradiancia. Dado que la humedad en el sustrato disminuyó a una velocidad similar en ambos tratamientos de irradiancia (**Figura IV.2**), este hecho sólo puede explicarse considerando el efecto que la señal lumínica tuvo sobre los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia donde, a diferencia del otro tratamiento, los niveles de irradiancia fueron lo suficientemente altos como para

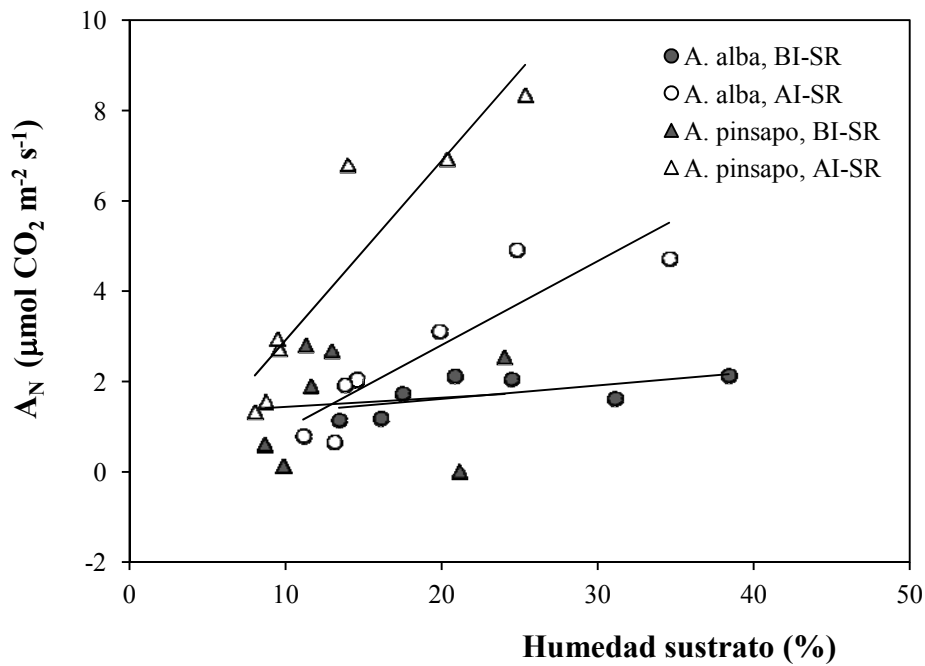
activar la fijación de C. Así, en los individuos del tratamiento “alta irradiancia / riego” se registraron tasas de fijación de C positivas en todo momento y superiores a las halladas en individuos del tratamiento “baja irradiancia / riego”. En el tratamiento “alta irradiancia / sin riego”, si bien con el tiempo tuvo lugar un notable descenso en las tasas de fotosíntesis neta, en un primer momento se registraron asimismo mayores valores que en “baja irradiancia / sin riego”. Y la misma evolución temporal experimentaron las tasas de conductancia estomática, por lo que, en términos generales, las diferencias entre tratamientos de irradiancia radicaron en una mayor cantidad de C fijado vía fotosíntesis, y sobre todo en una mayor cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática en el tratamiento a alta irradiancia. Por ello, el efecto del tiempo transcurrido hasta la aparición de los cambios mencionados se manifestó fundamentalmente en la cantidad de agua transpirada, que fue notablemente mayor y se “perdió” a mayor velocidad a alta irradiancia, lo que contribuiría a deteriorar más rápidamente el estatus hídrico de los individuos adscritos a este tratamiento. A su vez, el hecho de que estos cambios se manifestasen más tardíamente en *A. alba* estaría relacionado con las menores tasas de conductancia estomática registradas en esta especie, que contribuirían a que la cantidad de agua perdida lo hiciese a un ritmo menor.

**Tabla IV.16.** Tiempo de respuesta de las variables ecofisiológicas relacionadas con el estatus hídrico y el intercambio gaseoso ante la variación de la humedad del sustrato, para las distintas combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia. Se indica el número de semanas transcurridas en el momento en el que se hallaron diferencias significativas respecto al momento inicial o el tratamiento de riego. “BI”: baja irradiancia. “AI”: alta irradiancia. “SR”: sin riego (tratamiento de estrés hídrico).

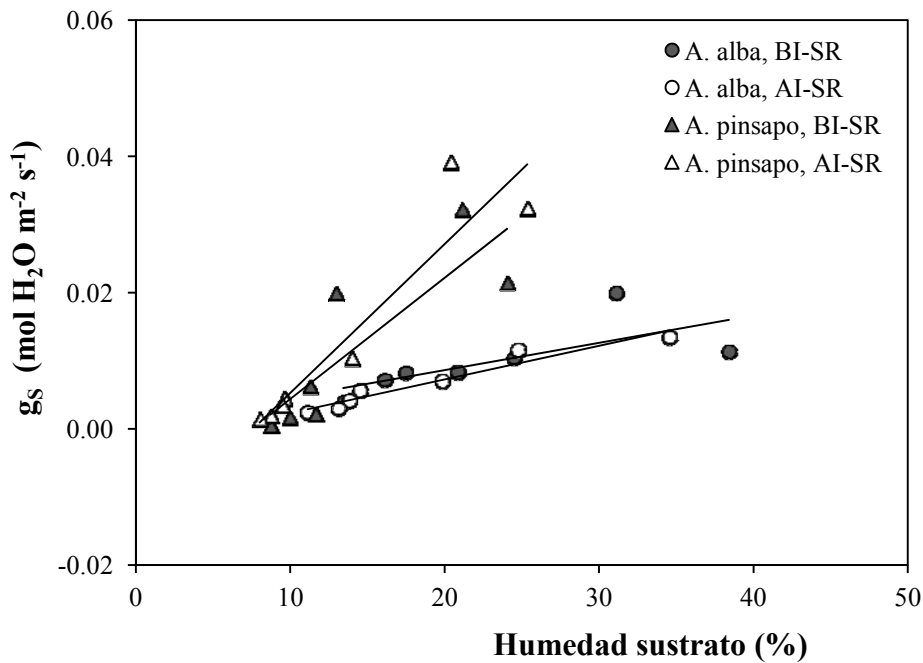
Especie, tratamiento de irradiancia, sin riego	RWC	$\Psi$	$A_N$	$g_s$	WUE	LUE
<i>A. alba</i> – BI – SR	6	4	--	--	3	5
<i>A. alba</i> – AI – SR	5	4	3	--	--	--
<i>A. pinsapo</i> – BI – SR	5	3	5	3	1	1
<i>A. pinsapo</i> – AI – SR	3	2	3	2	2	5

**Tabla IV.17.** Valores de pendiente (b) y de  $R^2$  para las rectas de regresión de los datos promedio ( $n = 7$ ) representadas en las Figuras IV.X y IV.X. Se indican con un asterisco los ajustes lineales significativos ( $p < 0.05$ ). “BI”: baja irradiancia. “AI”: alta irradiancia. “SR”: sin riego (tratamiento de estrés hídrico). Los símbolos de las distintas combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia y riego son los mismos que aparecen en las figuras citadas.

Variable correlacionada		b	$R^2$
Fotosíntesis neta	<i>A. alba</i> – BI – SR ●	0.0299	0.3992
	<i>A. alba</i> – AI – SR ○	0.1859	0.8197*
	<i>A. pinsapo</i> – BI – SR ▲	0.0205	0.0096
	<i>A. pinsapo</i> – AI – SR △	0.397	0.8551*
Conductancia estomática	<i>A. alba</i> – BI – SR ●	0.0004	0.5109*
	<i>A. alba</i> – AI – SR ○	0.0005	0.9392*
	<i>A. pinsapo</i> – BI – SR ▲	0.0018	0.7124*
	<i>A. pinsapo</i> – AI – SR △	0.0022	0.8780*



**Figura IV.34.** Relación funcional entre la tasa de fotosíntesis neta registrada y la pérdida de humedad en el sustrato conforme avanzaba el proceso de estrés hídrico. “BI”: baja irradiancia. “AI”: alta irradiancia. “SR”: sin riego (tratamiento de estrés hídrico).



**Figura IV.35.** Relación funcional entre la tasa de conductancia estomática al agua y la pérdida de humedad en el sustrato conforme avanzaba el proceso de estrés hídrico. “BI”: baja irradiancia. “AI”: alta irradiancia. “SR”: sin riego (tratamiento de estrés hídrico).

En lo que respecta a las cuatro variables mencionadas puede concluirse que, por un lado, el comportamiento exhibido por *A. pinsapo* supuso por lo general una mayor dependencia de la humedad del sustrato, siendo en los individuos de esta especie donde se registraron mayores cambios en las variables estudiadas que en *A. alba*, que fue la especie que mostró un mayor control de la apertura estomática frente a los cambios registrados en la humedad del sustrato, y una mayor capacidad de modificar su respuesta a fin de evitar un mayor deterioro de su estatus hídrico. Así, los cambios exhibidos por *A. pinsapo* son fruto de un uso en general menos eficiente de este recurso y de un control menos fino de la apertura estomática. En *A. alba*, en cambio, la capacidad de modular su respuesta derivaría de un uso más eficiente de este recurso, un control más fino de la apertura estomática y un mayor grado de ajuste entre la cantidad de C fijado y la de agua perdida en ambos tratamientos de irradiancia.

Por otro lado, el momento en que se manifiestan los cambios más notables en las variables citadas está marcado por la pérdida de una cierta cantidad de agua, que induce el deterioro del estatus hídrico de cada individuo hasta un determinado valor umbral, a partir del cual ambas especies reaccionan para evitar que ese deterioro vaya a más. A alta irradiancia, la rapidez con que se manifiestan estos cambios se debe fundamentalmente al efecto de la propia señal lumínica, que no sólo estimula la fijación de C sino también la apertura estomática. Esto origina a su vez un ritmo de transpiración mayor, que hace que el estatus hídrico se deteriore con mayor rapidez. La diferencia entre ambas especies radica también en las mayores tasas de conductancia estomática que presenta por lo general *A. pinsapo*, que hacen que los individuos de esta especie pierdan agua vía estomática a un ritmo mayor, y que se precipiten tanto el deterioro del estatus hídrico como la aparición de los cambios evaluados.

Estas diferencias interespecíficas en lo que respecta al tiempo necesario para que se produzcan cambios en las variables estudiadas, y en la forma y la velocidad a la que se producen esos cambios influyeron asimismo en la evolución temporal de la eficiencia en el uso del agua exhibida por ambas especies (**Figura IV.16**). Así, en lo que respecta a esta variable, las mayores diferencias entre ambos tratamientos de irradiancia parecen hallarse en *A. pinsapo*, lo que indicaría que en esta especie la eficiencia en el uso del agua se ve influenciada, de nuevo, en mayor medida por la señal lumínica. A medida que avanzó el proceso de estrés hídrico, se produjo un incremento notable en esta variable en *A. pinsapo*, tanto a alta como a baja irradiancia, y sólo a baja irradiancia en *A. alba*, tendiéndose a alcanzar en los individuos de “baja irradiancia / sin riego” valores

de eficiencia en el uso del agua similares a los registrados en “alta irradiancia / sin riego”. A juzgar por los resultados antes comentados, este incremento no se debió a un incremento en las tasas de fijación de C, que descendieron en los individuos del tratamiento de estrés, sino al descenso experimentado en las tasas de conductancia estomática, que fue mayor en proporción. Así, en *A. pinsapo*, el gran incremento en la eficiencia en el uso del agua observado se debió fundamentalmente al igualmente notable descenso experimentado en las tasas de conductancia estomática, mayor que en *A. alba*, y cuya magnitud se debió a que los valores de conductancia de partida, tanto a alta como a baja irradiancia, fueron superiores a los exhibidos por *A. alba*. El hecho de que esta última especie incrementase su eficiencia en el uso del agua a baja irradiancia, aunque de una forma no tan llamativa, se debió a un mayor decremento relativo de las tasas de conductancia estomática respecto a las de fijación de C, que nuevamente podría explicarse por la composición del equipo pigmentario de esta especie a baja irradiancia, que permite una mayor eficiencia en la fijación de C. Los individuos de esta especie adscritos a “alta irradiancia / sin riego” mostraron una tendencia similar aunque sin cambios significativos en el tiempo, alcanzándose con el tiempo una eficiencia en el uso del agua similar a la exhibida por los individuos regados. La ausencia de cambios significativos en este caso se debería a que la fijación de C y la conductancia estomática se vieron afectados por el estrés hídrico de forma similar. En lo que respecta a la eficiencia en el uso de la luz, los mayores valores de este ratio se registraron en ambas especies en el tratamiento a baja irradiancia y en los individuos regados. Conforme avanzaba el proceso de estrés hídrico, se produjo una disminución de esta variable, especialmente en *A. pinsapo*, como consecuencia de la depresión en la fotosíntesis inducida por el estrés hídrico (Tezara *et al.* 1999; Cornic, 2000; Lawlor, 2002; Lawlor y Cornic, 2002; Flexas *et al.* 2006).

Por lo anterior, puede concluirse que el estrés hídrico no solo afectó a las variables relacionadas con el intercambio gaseoso y el estatus hídrico de cada individuo, sino que también influyó notablemente en la eficiencia con que los individuos sometidos a este tipo de estrés usaron tanto el agua como la luz disponible. En lo que respecta a la eficiencia en el uso del agua, es de destacar que las mayores diferencias entre tratamientos de irradiancia y de riego se produjeron en *A. pinsapo*, que mostró así ser la especie cuya eficiencia en el uso del agua se vio más afectada por la falta de agua y de luz. La eficiencia en el uso de la luz, por su parte, se vio afectada por los tratamientos de riego de forma similar en ambas especies, pero de forma distinta por los

tratamientos de irradiancia, entre los que se hallaron mayores diferencias en *A. alba*. Estas diferencias radicaron en la mayor eficiencia en el uso de la luz que presentó esta especie a baja irradiancia, lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta que es considerada como una de las especies forestales europeas más tolerantes a la sombra (Robakowski *et al.* 2003).

Finalmente, es necesario destacar que tanto en *A. pinsapo* como en *A. alba*, la escasa disponibilidad hídrica y luminosa actuaron en sentidos opuestos sobre la eficiencia en el uso del agua y sobre la eficiencia en el uso de la luz. Así, los niveles de irradiancia bajos provocaron un incremento en la eficiencia en el uso de la luz, pero también llevaron aparejado un descenso en la eficiencia en el uso del agua. Por su parte, el estrés hídrico hizo que los individuos incrementasen su eficiencia en el uso del agua, pero al mismo tiempo disminuyeran su eficiencia en el uso de la luz. Por ello, puede concluirse que existe un claro *trade-off* entre la eficiencia en el uso del agua y la eficiencia en el uso de la luz en estas especies de manera que, en la medida en que exista un único factor limitante, los individuos tratarán de optimizar la eficiencia en el uso de ese recurso (Berendse y Aerts, 1987), aun a costa de ver comprometida la eficiencia con que usan otro (Fownes, 1995; Fownes y Harrington, 2004), (**Figura IV.36**, parte superior). De esta forma, los individuos de ambas especies adscritos al tratamiento “baja irradiancia / riego” mantuvieron una cierta eficiencia en el uso de la luz, a costa de ver muy restringida su capacidad de modular la eficiencia en el uso del agua. Esos niveles altos de LUE son imprescindibles para la fijación de C a unos niveles de irradiancia tan bajos, y dado que el agua no es un recurso limitante, pueden permitirse el “lujo” de funcionar con unos valores de WUE bajos. Los individuos del tratamiento “alta irradiancia / riego”, por su parte, optaron por una eficiencia en el uso de la luz muy limitada, lo que les permitió en comparación alcanzar una mayor eficiencia en el uso del agua, necesaria en caso de que los niveles de luz sean lo suficientemente altos como para que la fotosíntesis y la conductancia estomática se estimulen hasta el punto de que la disponibilidad hídrica empiece a ser el factor limitante de la fijación de C. En los individuos sometidos al tratamiento de estrés hídrico, sin embargo, se observaron cambios en los rangos de variación de ambas eficiencias (**Figura IV.36**, parte inferior). Así, los individuos del tratamiento “baja irradiancia / sin riego” siguieron mostrando valores de eficiencia en el uso de la luz superiores a los hallados a alta irradiancia, pero incrementaron su eficiencia en el uso del agua a costa de perder parte de esa eficiencia en el uso de la luz. Del mismo modo,

los individuos del tratamiento “alta irradiancia / sin riego”, que ya de por sí presentaban menor eficiencia en el uso de la luz que los individuos a baja irradiancia, también perdieron eficiencia en el uso de este recurso, lo que significó un incremento en su eficiencia en el uso del agua con respecto a la de los individuos regados.

Es posible afirmar que el citado *tradeoff* fue resuelto por ambas especies de forma similar, aunque con diferencias entre las distintas combinaciones de irradiancia y riego (**Figura IV.37**). Los niveles más altos de eficiencia en el uso de la luz se hallaron en los individuos de ambas especies sometidos a baja irradiancia, que fueron los que mostraron asimismo menores valores de eficiencia en el uso del agua. Los mayores valores de este ratio se hallaron en el tratamiento a alta irradiancia, que fue donde lógicamente se registraron menores valores de eficiencia en el uso de la luz. La aplicación del tratamiento de estrés hídrico hizo que los individuos de ambas especies y tratamientos de irradiancia incrementasen su eficiencia en el uso del agua, a costa de un descenso en la eficiencia en el uso de la luz, incluso en el tratamiento a baja irradiancia (**Figura IV.37**). Por su parte, la eficiencia en el uso de la luz fue superior en los individuos de ambas especies adscritos al tratamiento de baja irradiancia, con independencia del tratamiento de riego aplicado. En cualquier caso, la variación que experimentaría la eficiencia en el uso de un recurso al pasar de unas condiciones ambientales a otras no sería proporcional a la que experimentaría simultáneamente la eficiencia en el uso del otro, registrándose además variaciones de distinta magnitud entre ambas especies y entre las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego (**Figuras IV.37 y IV.38**). Estas variaciones en WUE y LUE se deberían a cambios en la apertura estomática relacionados con la disponibilidad hídrica y luminosa. Teniendo en cuenta que WUE y LUE son los ratios entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática y los niveles de PAR incidente respectivamente, y conociendo la variación experimentada por los niveles de PAR cuando éstos se redujeron para la aplicación del estrés por déficit energético (un 90%, aproximadamente), fue posible calcular también la variación promedio en porcentaje que experimentarían las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua a partir de las variaciones en WUE y LUE (**Figura IV.38**). Los resultados obtenidos sugieren que el hecho de tener los estomas más o menos abiertos tendría distinto grado de influencia sobre las tasas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua, y por ello, las variaciones experimentadas por WUE y LUE serían distintas y ambas variables no guardarían una relación lineal.

Los cambios en la eficiencia del uso del agua se deberían a variaciones en la disponibilidad hídrica pero también en las condiciones de iluminación, ya que las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática se ven afectadas por ambos factores. Cuanto mayor fuese el cambio registrado en este ratio, menor parecería ser el grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática, lo que indicaría que ambas variables se verían afectadas de forma distinta por cambios en los niveles de irradiancia y humedad en el sustrato. Por su parte, las variaciones en LUE serían reflejo de cambios en las tasas de fotosíntesis neta, pero también en los niveles de PAR incidente. En lo referente a las variaciones que experimentarían las tasas de intercambio gaseoso, es de destacar, en primer lugar, que las mayores variaciones en las tasas de fotosíntesis neta se producirían en las situaciones de estrés energético en ambas especies, con independencia del régimen de riego, y las mayores variaciones en las tasas de conductancia estomática al agua se producirían con la aplicación del estrés hídrico, con independencia de los niveles de irradiancia aplicados. Y por otro lado, que las mayores diferencias entre los respectivos porcentajes se hallarían siempre en *A. pinsapo*, lo que apuntaría de nuevo a que esta especie sería la que presenta un peor grado de ajuste entre ambas variables.

La magnitud del cambio que se produciría a nivel de intercambio gaseoso no sería proporcional a la variación (en porcentaje) experimentada en WUE y en LUE, por lo que no concluirse sobre la intensidad del estrés aplicado a partir de los cambios que se observarían en WUE y en LUE. Estos cambios serían mayores en aquellas situaciones en las que los individuos experimentasen limitación en la disponibilidad de un único recurso, ya fuese éste la humedad del sustrato o los niveles de irradiancia incidente. En estas condiciones, los individuos incrementarían su eficiencia en el uso del recurso limitante, aun a costa de perder eficiencia en el uso de otro recurso para el que no hubiese ningún tipo de limitación. Así, las mayores variaciones en WUE en respuesta al estrés hídrico se hallarían a alta irradiancia, donde las condiciones de iluminación no serían limitantes, mientras que las mayores variaciones en LUE en respuesta al estrés por déficit energético (aplicación de niveles de irradiancia bajos) se hallarían en los individuos regados, exentos por tanto de estrés hídrico (**Figura IV.38**). Por el contrario, los menores cambios en WUE y en LUE se hallarían en aquellas situaciones en las que no hubiese un único factor de estrés (hídrico o luminoso) sino la interacción entre ambos. Por ello, la cantidad de cambio que se hallaría en WUE y LUE reflejaría la capacidad exhibida por los individuos de ambas especies adscritos a las

distintas combinaciones de tratamientos para modificar su comportamiento ante el estrés experimentado. Así, esta capacidad sería mayor ante un único factor de estrés, a juzgar por las mayores variaciones que se registrarían en estas circunstancias en WUE o LUE (según fuese el factor de estrés la disponibilidad hídrica o luminosa, respectivamente). Por el contrario, la menor variación en WUE o en LUE que se hallaría en situaciones en las que existiesen distintas fuentes de estrés debería interpretarse como indicativa de una menor capacidad de respuesta, que derivaría del hecho de que la eficiencia en la gestión de un recurso se vería comprometida por la eficiencia en el uso de otro recurso que también fuese limitante (ver, por ejemplo, Fownes y Harrington, 2004). De hecho, estas menores tasas de cambio en la eficiencia en el uso de un factor, que se hallarían en individuos sometidos a un factor de estrés previo (baja irradiancia o privación de riego), fueron irían acompañadas a su vez de las mayores variaciones en la eficiencia en el uso del recurso limitante *a priori*, apuntando así a que la respuesta ante el nuevo elemento de estrés comprometería en mayor medida la eficiencia con que se hubiese venido gestionando el primer recurso limitante. Esta disparidad entre las variaciones que experimentarían WUE y LUE simultáneamente sería indicativa de la intensidad con que se manifestaría el *tradeoff* entre ambos recursos, siendo éste más intenso a baja irradiancia y/o en el tratamiento de privación de riego, como era de esperar. Así, las constricciones impuestas por los bajos niveles de luz impedirían que los individuos de ambas especies pudiesen responder de forma más eficiente ante variaciones de la humedad en el sustrato. Y del mismo modo, la necesidad de responder ante el estrés hídrico aplicado mermaría la capacidad de responder de forma más eficiente ante variaciones en los niveles de irradiancia incidente.

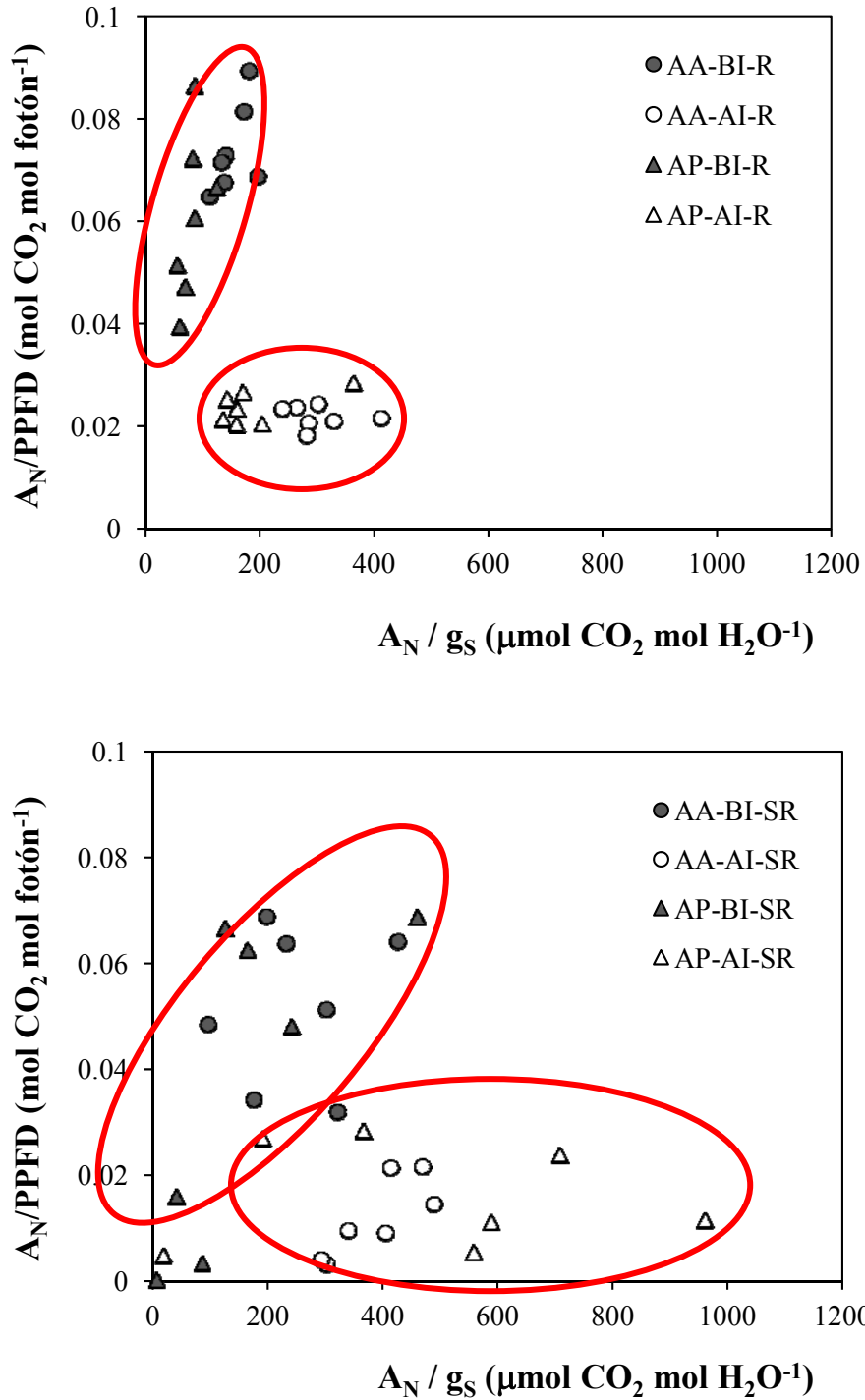
Al examinar en detalle la respuesta que exhibirían individuos de ambas especies, se observarían diferencias que derivarían del distinto grado de eficiencia en el uso simultáneo de ambos recursos por parte de cada una de las especies. Así, en el caso de *A. alba*, el efecto de la aplicación del estrés hídrico sería similar a alta y a baja irradiancia, ya que en ambos tratamientos se experimentarían variaciones en WUE similares (+23% y +24% respectivamente, **Figura IV.38**), lo que indicaría que la especie mostraría la misma capacidad de respuesta a cambios en la humedad del sustrato, independientemente de las condiciones de iluminación a que se viesen sometidos sus individuos. Es decir, que su eficiencia en el uso de la luz, aunque diferiría entre los tratamientos de alta y baja irradiancia, no comprometería los cambios necesarios en las tasas de intercambio gaseoso para responder con igual eficiencia ante

un proceso de estrés hídrico. No obstante, esta respuesta supondría una mayor pérdida de eficiencia en el uso de la luz a baja irradiancia, indicando una mayor intensidad del *tradeoff* mencionado a niveles bajos de irradiancia. Por otro lado, la variación que se observaría en WUE, además de ser similar en ambos tratamientos de irradiancia, no sería de gran magnitud, lo que indicaría que esta especie exhibiría un grado de ajuste razonablemente bueno entre las tasas de fotosíntesis y las de conductancia estomática, y que ambas variables se verían afectadas de forma similar por la aplicación del estrés hídrico. En lo que respecta al estrés por déficit energético (resultado de la aplicación de niveles de irradiancia bajos), se hallaría una mayor variación de la eficiencia en el uso de la luz en los individuos regados que en los individuos sometidos al tratamiento de estrés hídrico, lo que indicaría que en éstos, la eficiencia en el uso del agua comprometería la eficiencia en el uso de la luz, que no podría incrementarse en la misma medida que en el tratamiento de riego.

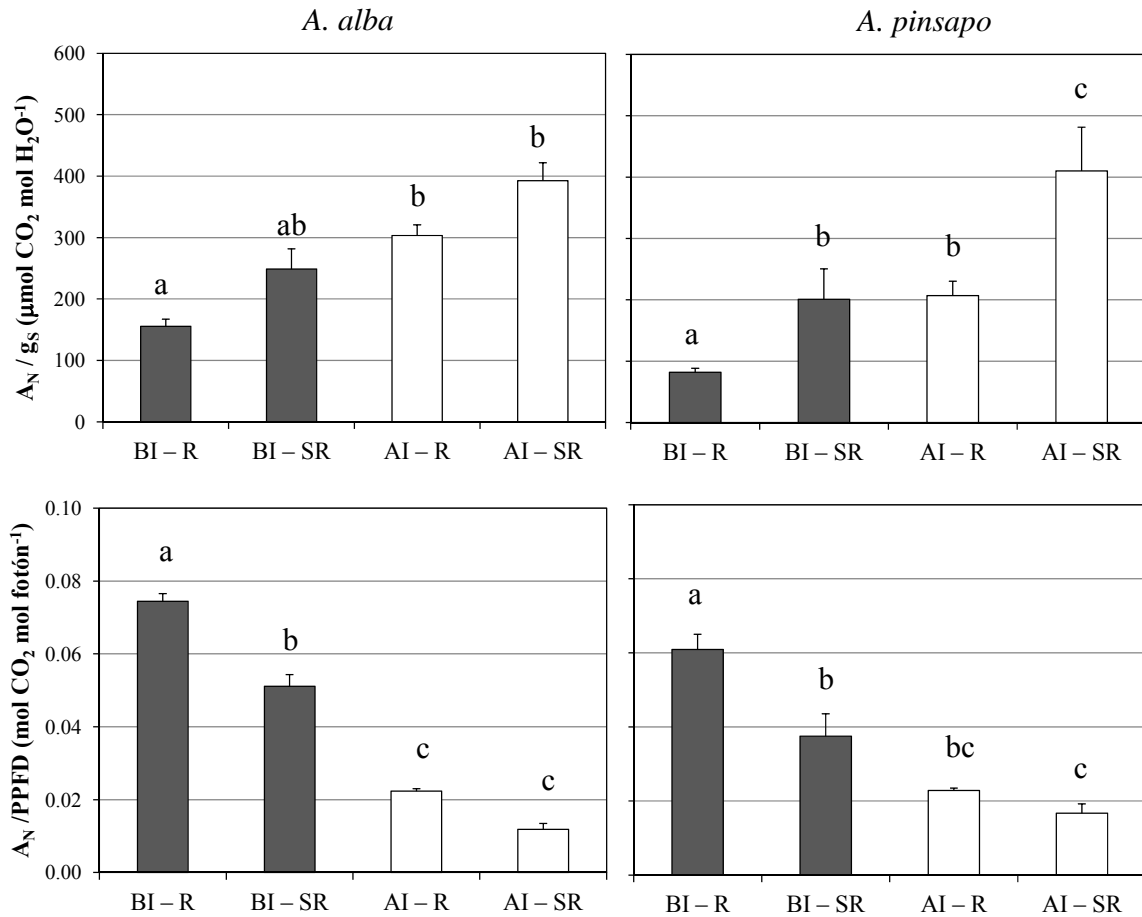
En *A. pinsapo*, por su parte, la aplicación del estrés hídrico provocaría una menor variación en WUE a baja irradiancia (+29%) que a alta irradiancia (+50%), lo que indicaría una mayor capacidad de respuesta ante este tipo de estrés en este último tratamiento. Además, esta menor variación en WUE a baja irradiancia llevaría aparejada la mayor pérdida de eficiencia en el uso de la luz. En comparación con *A. alba*, esto denotaría que la especie se desenvolvería mejor a alta irradiancia (donde tendría mayor LUE que *A. alba*) que a baja irradiancia (donde tendría menor LUE), y que en estas condiciones, el desarrollo de una mayor eficiencia en el uso del agua ante una situación de estrés hídrico se vería comprometido por la necesidad de mantener una mayor eficiencia en el uso de la luz (Fownes, 1995). Por otro lado, las variaciones en WUE que se experimentarían en *A. pinsapo* serían mayores que en *A. alba*, lo que denotaría un menor grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua. En lo que respecta al estrés por déficit energético, al igual que en *A. alba* se produciría un mayor incremento en LUE entre los individuos regados (+63%) que entre los individuos sometidos a estrés hídrico (+34%), y sería en éstos donde se hallaría asimismo una mayor pérdida de WUE (51%, frente al 31% en los individuos regados), lo que indicaría una mayor intensidad del *tradeoff* entre ambos recursos en el tratamiento de estrés hídrico, ya que el desarrollo de una mayor eficiencia en el uso de la luz comprometería en mayor medida la eficiencia en el uso del agua, fundamental para los individuos sometidos a un estrés de esas características.

En *A. alba*, las situaciones de estrés energético llevarían aparejados mayores cambios en WUE y en LUE que en caso de estrés hídrico, lo que indicaría que la especie mostraría una mayor capacidad de respuesta frente a reducciones en la disponibilidad lumínica que frente al estrés hídrico, en coherencia con la elevada tolerancia a la sombra característica de esta especie. En *A. pinsapo*, por el contrario, se hallaría una capacidad de respuesta similar ante el estrés hídrico y el energético, estando ésta fundamentalmente limitada por la presencia del *tradeoff* derivado de la interacción entre ambos recursos en aquellas situaciones en las que existiese más de un factor de estrés. Todo esto indicaría que la intensidad del *tradeoff* que se experimentaría sería mayor en *A. pinsapo* que en *A. alba*, y que esta última especie resultaría así ser la más eficiente en la gestión de ambos recursos.

En lo que respecta al efecto simultáneo de ambos factores de estrés (**Figura IV.38**), se observa por el signo de las variaciones que se experimentarían en WUE y LUE que la respuesta de ambas especies en este caso se acercaría más a la que mostrarían cuando la principal fuente de estrés fuesen los bajos niveles de irradiancia (descenso en WUE, incremento en LUE) que a la que exhibirían cuando el principal factor de estrés fuese la reducción de la disponibilidad hídrica en el sustrato (incremento en WUE, descenso en LUE), lo que apuntaría hacia el nivel de irradiancia incidente como principal factor ambiental determinante del comportamiento de ambas especies. Además, esta aplicación simultánea de ambos tipos de estrés originaría en ambas especies menores variaciones en WUE y en LUE que ante la aplicación de un único factor de estrés o de dos factores de estrés consecutivamente, lo que denotaría una mayor intensidad del *tradeoff* entre la tolerancia a la sombra y la capacidad de respuesta frente al estrés hídrico en este tipo de situaciones.

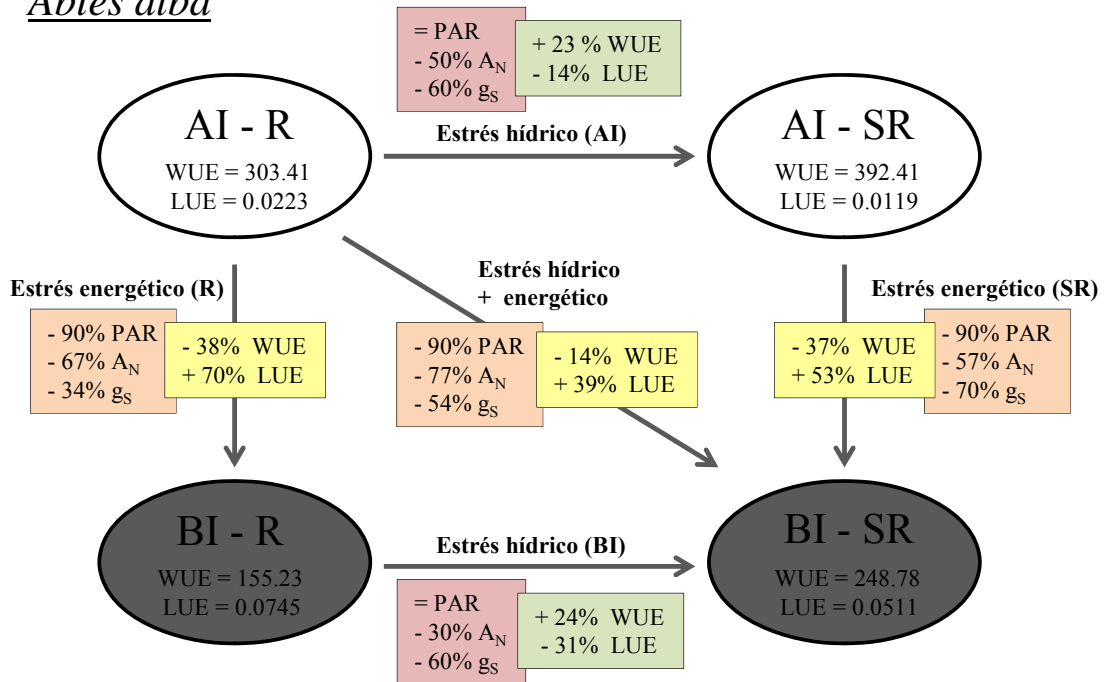


**Figura IV.36.** Eficiencia en el uso del agua (WUE, el ratio entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática al agua, en el eje X) y en el uso de la luz (LUE, el ratio entre las tasas de fotosíntesis neta y los niveles de irradiancia registrados simultáneamente, en el eje Y) mostrada por los individuos participantes en el experimento durante la segunda parte del mismo. En la parte superior se muestra el comportamiento respecto de estas variables de los individuos control de ambas especies y tratamientos de irradiancia, que fueron convenientemente regados. En la parte inferior, los individuos sometidos al tratamiento de estrés hídrico. “AA”: *Abies alba*. “AP”: *Abies pinsapo*. “AI”: alta irradiancia. “BI”: baja irradiancia. “R”: riego (individuos control). “SR”: sin riego (tratamiento de estrés hídrico).

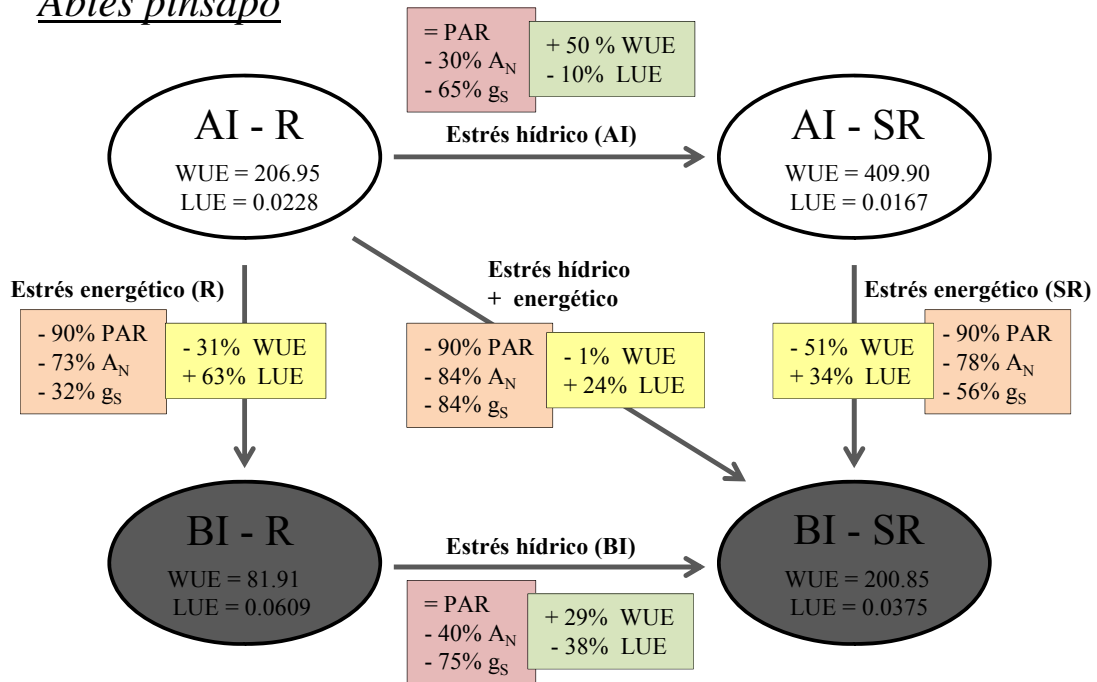


**Figura IV.37.** Valores promedio de eficiencia en el uso del agua (WUE, parte superior) y eficiencia en el uso de la luz (LUE, inferior) hallados en los individuos de ambas especies en las distintas combinaciones de irradiancia y riego, a lo largo de la segunda parte del experimento. “BI – R”: baja irradiancia, riego. “BI – SR”: baja irradiancia, sin riego. “AI – R”: alta irradiancia, riego. “AI – SR”: alta irradiancia, sin riego.

*Abies alba*



*Abies pinsapo*



**Figura IV.38.** Valores promedio de WUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) y LUE ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol fotones}^{-1}$ ) en las distintas combinaciones de irradiancia y riego. Los porcentajes indican la variación que se experimentaría en estas variables, así como en los niveles de irradiancia y en las tasas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua, al pasar de unas situaciones a otras. Nótese que el descenso en los niveles de irradiancia supuso siempre un incremento en LUE y un descenso en WUE, al contrario que la aplicación del estrés hídrico. “BI - R”: baja irradiancia, riego. “BI - SR”: baja irradiancia, sin riego. “AI - R”: alta irradiancia, riego. “AI - SR”: alta irradiancia, sin riego.

IV.4.2. La discriminación de isótopos estables de carbono como indicador del estrés por déficit hídrico y energético.

La discriminación contra el isótopo pesado del carbono, además de variar entre especies, puede verse afectada por distintos factores con influencia sobre las tasas de conductancia estomática, las de fotosíntesis o ambas variables simultáneamente, como cambios en los niveles de irradiancia, la temperatura, la concentración de CO<sub>2</sub>, la presencia de contaminantes o el estatus hídrico de cada individuo (ver, por ejemplo, Ferrio *et al.* (2003), para una revisión de todos estos factores). En nuestro caso, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  fueron en todo momento menores (más negativos) en *A. pinsapo* que *A. alba* (Tabla IV.11, Figuras IV.18 y IV.20), lo que es coherente con el hecho de que esta última especie sea la que haya mostrado una mayor eficiencia en el uso del agua (Ferrio *et al.* 2003), y un mayor grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua. Por otro lado, la posición dentro de la planta y la edad de la hoja son factores que también influyen sobre la señal isotópica del tejido foliar (Waring y Silvester, 1994). En este estudio, los menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se obtuvieron en el tejido foliar “nuevo” de ambas especies (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), lo que sería indicativo por lo general de una menor eficiencia en el uso del agua. Este hecho puede resultar llamativo si consideramos que dicho tejido se desarrolló a lo largo de un experimento en el que los individuos estuvieron en parte sometidos a un proceso de estrés hídrico, por lo que cabría esperar que la respuesta de éstos a ese tipo de estrés (un incremento en la eficiencia en el uso del agua, a juzgar por los resultados obtenidos en variables relacionadas con el intercambio gaseoso medidas en tejido foliar maduro) se viese reflejada en la composición isotópica de este tejido nuevo. No obstante, este resultado sería coherente con la existencia de un menor grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática en un tejido extremadamente activo, en crecimiento, en el que el control estomático no sea tan fino como en el tejido foliar maduro, y en el que prime más la necesidad de fijar carbono a cualquier nivel de irradiancia que la posibilidad de adoptar un comportamiento que le permita hacer frente a eventuales condiciones de estrés hídrico.

En lo que respecta al tejido foliar maduro, se observaron diferencias entre tratamientos de irradiancia, hallándose los mayores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  a baja irradiancia, indicativos de una menor eficiencia en el uso de la luz, y de una mayor eficiencia en el

uso del agua. Esto, en cierto modo, contravendría los patrones de WUE y LUE discutidos en la sección anterior. Para explicar esta incoherencia es necesario recordar que la composición isotópica del tejido foliar maduro reflejaría no sólo las condiciones ambientales características del experimento, sino también, e incluso en mayor medida, las condiciones ambientales previas al mismo, a diferencia del tejido madurado durante el experimento. Así, los mayores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  hallados a baja irradiancia (-29.1‰) sólo podrían explicarse considerando que la aplicación de este tratamiento supuso un déficit energético de tal magnitud que no fue posible la activación de la maquinaria fotosintética, al menos durante gran parte del experimento. La escasa fijación de carbono en este tratamiento explicaría la gran similitud entre los valores iniciales (-29.15‰) y los registrados entre los individuos adscritos a este tratamiento. En el tratamiento de alta irradiancia los individuos fueron sometidos a niveles de luz que permitieron la activación de la maquinaria fotosintética, aunque lo cierto es que estos niveles fueron considerablemente inferiores a los experimentados de forma previa al experimento. Por ello, los individuos adscritos a este tratamiento tendieron a incrementar su LUE, lo que produjo una modificación de la señal isotópica del tejido foliar, hallándose menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (-29.5‰). Este comportamiento sugiere el desarrollo de un proceso de aclimatación tendente a maximizar la fijación de carbono en el nuevo ambiente lumínico, siempre que se exista una señal lumínica suficiente.

Con el paso del tiempo, en los individuos sometidos al tratamiento de riego se tendió hacia menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , es decir, hacia una menor eficiencia en el uso del agua, lo que resulta coherente con el hecho de que estos individuos, con un adecuado estatus hídrico, se viesen sometidos a niveles de irradiancia más bajos que los propios de las condiciones ambientales en las que se encontraban previamente. Así, estos individuos reflejaron en su composición isotópica un incremento en la eficiencia en el uso de la luz, aún a costa de una pérdida de eficiencia en el uso del agua, como resultado de la necesidad de intentar maximizar la fijación de C en unas condiciones de luminosidad *a priori* deficitarias. El hecho de que no se observen estos menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en los individuos sometidos al tratamiento “sin riego” es indicativo del efecto indirecto del estrés hídrico, que comprometió la capacidad de aclimatación de los individuos a los nuevos niveles de luz. En este sentido, queda de nuevo puesta de manifiesto la existencia de un *trade-off* entre la eficiencia en el uso del agua y la

eficiencia en el uso de la luz, en un plano distinto: la imposición de un proceso de estrés hídrico comprometería la capacidad de aclimatación a niveles de irradiancia más bajos respecto a las condiciones de iluminación de partida. Estos resultados son plenamente coherentes con los discutidos en la sección anterior, hallándose valores de WUE en el tratamiento “baja irradiancia / riego” notablemente inferiores a los hallados en “alta irradiancia / riego” (condiciones de partida previas a la incubación) (**Figura IV.37**). La falta de diferencias significativas en el tratamiento de privación del riego en lo que respecta a  $\delta^{13}\text{C}$  no es sino el reflejo de la similitud existente entre los valores de WUE hallados en “alta irradiancia / riego” y “baja irradiancia / sin riego” (**Figura IV.37 y IV.38**).

En el tejido foliar “nuevo”, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  hallados sí son plenamente coherentes con lo que cabría esperar, a la vista de los resultados obtenidos en lo que respecta a las eficiencias en el uso del agua y de la luz. Así, los mayores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se hallaron en las muestras tomadas en individuos sometidos a alta irradiancia, que fueron los que mostraron una mayor eficiencia en el uso del agua y por ende una menor eficiencia en el uso de la luz (**Figura IV.39.A y IV.39.C**). Esto podría interpretarse nuevamente como un indicio de que los individuos experimentaron un proceso de aclimatación a la luz, apostando por una mayor eficiencia en el uso de la luz en el tratamiento a baja irradiancia, y por una mayor eficiencia en el uso del agua a alta irradiancia, cuyos niveles de luz característicos ya no constituyeron un recurso limitante para este tejido “nuevo” ya aclimatado a ellos. Esta diferencia entre tratamientos de irradiancia se debió fundamentalmente al hecho de que en *A. pinsapo* se tendió con el paso del tiempo hacia una mayor discriminación en el tratamiento de baja irradiancia, lo que tendría su origen en un peor desempeño de este tejido nuevo en dicho tratamiento. Así, y con el objeto de incrementar su eficiencia en el uso de este recurso, la estrategia seguida por los individuos de esta especie consistiría en mantener los estomas abiertos en condiciones de baja luminosidad, a fin de maximizar el C fijado con la escasa irradiancia recibida, aún a costa de disminuir su eficiencia en el uso del agua como consecuencia de las mayores pérdidas por transpiración (ver **Figura IV.13**). Este comportamiento fue especialmente notable entre los individuos de esta especie adscritos al tratamiento de riego (**Figura IV.39.B**). En *A. alba*, sin embargo, que mostró en todo momento mayores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que *A. pinsapo*, no se halló esta diferencia entre tratamientos, lo que apuntaría nuevamente a que el grado de control de la apertura

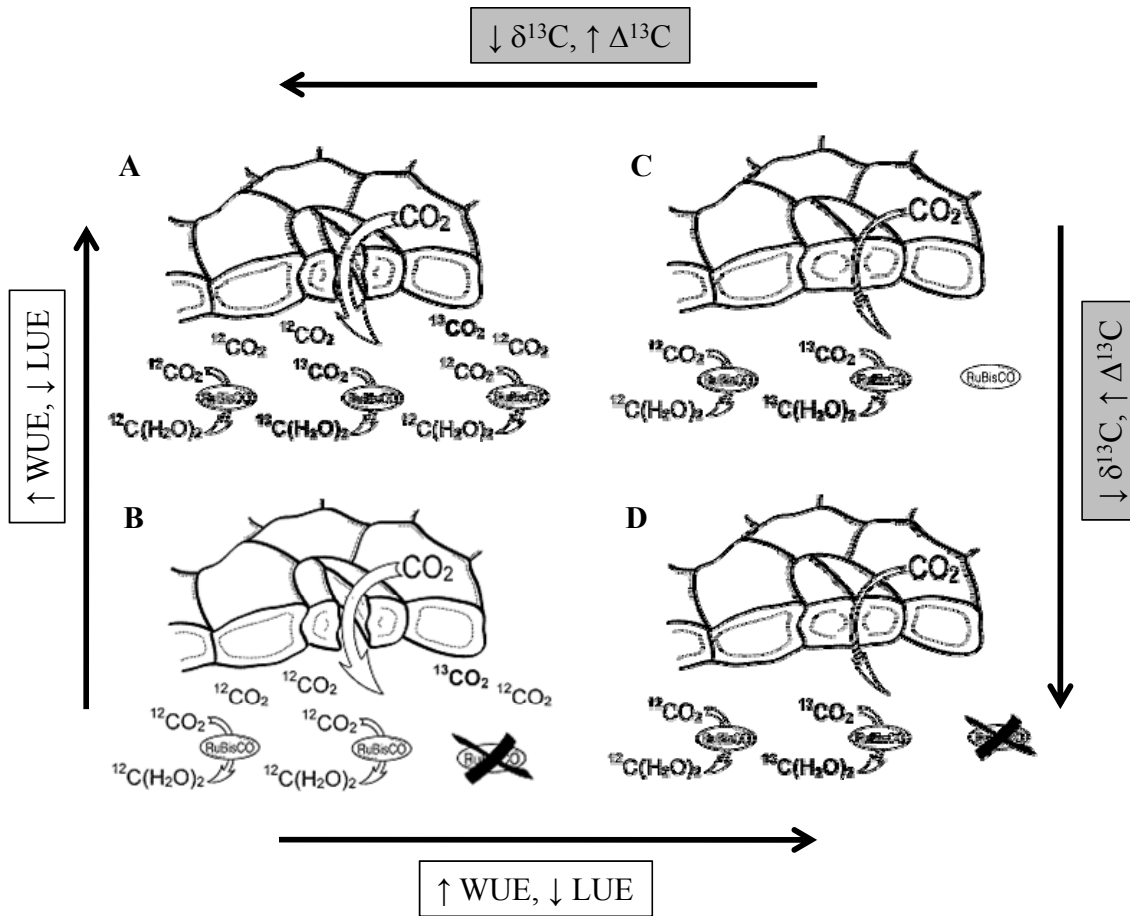
estomática permitió un mejor desempeño de esta especie en sendos niveles de luz. Considerando lo anteriormente expuesto, estos resultados sugieren que los individuos de *A. alba* consiguieron aclimatarse a ambos tratamientos de irradiancia y por ello desenvolverse en ambos con cierto éxito, lo que derivaría de la gran tolerancia a la sombra de esta especie (Robakowski *et al.* 2003), superior a la exhibida por *A. pinsapo*. Por su parte, esta última especie únicamente se desarrolló con cierto éxito a alta irradiancia, viéndose los individuos adscritos al tratamiento de baja irradiancia en la necesidad de incrementar su *fitness* a costa de perder eficiencia en el uso del agua, lo que podría comprometer su capacidad de supervivencia en condiciones de estrés hídrico y baja luminosidad. En cierto modo, estos resultados sugieren una vez más la mayor habilidad para la gestión de ambos recursos (agua y luz) exhibida por *A. alba*, frente al comportamiento exhibido por *A. pinsapo*, cuya supervivencia podría verse comprometida en situaciones en las que se ponga de manifiesto el citado *tradeoff* entre ambos recursos.

Por todo lo anterior, puede concluirse que la composición en isótopos estables de C del tejido foliar de ambas especies, además de recoger las características intrínsecas de las mismas, en términos de su eficiencia en el uso del agua, el control de la apertura estomática y el grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua, refleja el efecto que la disponibilidad de agua y de luz tuvieron sobre los individuos adscritos a las distintas combinaciones de irradiancia y riego. Así, esta composición del tejido foliar es consecuencia de las modificaciones relativas y simultáneas experimentadas en la eficiencia en el uso del agua y de la luz que supusieron las variaciones en las tasas de intercambio gaseoso, por lo que no podría emplearse como indicador exclusivamente del estatus hídrico de un individuo cuando existiera algún otro factor que estuviera afectando a las variables que determinan la incorporación y asimilación de C o en tejidos con una historia previa que ha quedado reflejada en su composición isotópica.

No obstante, en determinadas circunstancias el valor de discriminación isotópica puede estar indicando los mecanismos implicados en el proceso de aclimatación a las condiciones ambientales. Así, en nuestro caso por ejemplo, las distintas combinaciones de irradiancia y riego y los valores de WUE y LUE característicos de las mismas pueden explicarse considerando las variaciones que se producen en las tasas de intercambio gaseoso y que a su vez influyen en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  hallados, especialmente en el tejido foliar “nuevo” por los motivos antes expuestos (**Figura IV.38**

y **IV.39**). En este sentido, cualquier modificación de las condiciones ambientales de partida, caracterizadas por mayores niveles de irradiancia y riego (**Figura IV.39.A**), ya sea por la aplicación de bajos niveles de irradiancia o por un proceso de estrés hídrico, modificaron la apertura estomática y la discriminación que se ejerce contra el isótopo pesado, siendo ésta mayor en el tratamiento a alta irradiancia (**Figuras IV.39.A y IV.39.C**) frente a baja irradiancia (**Figuras IV.39.B y IV.39.D**), y en el tratamiento de privación de riego (**Figuras IV.39.C y IV.39.D**) frente al tratamiento de riego (**Figuras IV.39.A y IV.39.B**). Las variaciones halladas entre especies y tejido foliar de distinta edad se deberían al distinto grado de control de la apertura estomática ejercido al pasar de una situación a otra, siendo este control más estrecho en *A. alba* y en el tejido foliar maduro. Por su parte, el comportamiento exhibido principalmente por *A. pinsapo* en el tratamiento “baja irradiancia / riego”, consistente en mantener los estomas abiertos en condiciones de baja luminosidad, aún a costa de mantener unos niveles de transpiración relativamente altos se identifica plenamente con el mostrado en la **Figura IV.39.B**.

A pesar de la concordancia entre las variaciones experimentadas por WUE y LUE por un lado, y por  $\delta^{13}\text{C}$ , por otro lado, no se hallaron resultados de  $\delta^{13}\text{C}$  comparables a los obtenidos en WUE y LUE, en el sentido de que no se encontró una variación gradual de  $\delta^{13}\text{C}$  entre las distintas combinaciones de tratamientos de irradiancia y riego explorados (**Figura IV.37**). Ello ha de deberse a que las variaciones experimentadas en WUE y LUE actuaron sobre  $\delta^{13}\text{C}$  en sentidos opuestos, y a que ambas eficiencias no variaron en la misma medida entre las distintas combinaciones de tratamientos (**Figura IV.38**), como consecuencia de las distintas variaciones experimentadas por las tasas de fijación de C y de conductancia estomática simultáneamente, y el distinto grado de ajuste entre ambas variables en una especie y en otra.

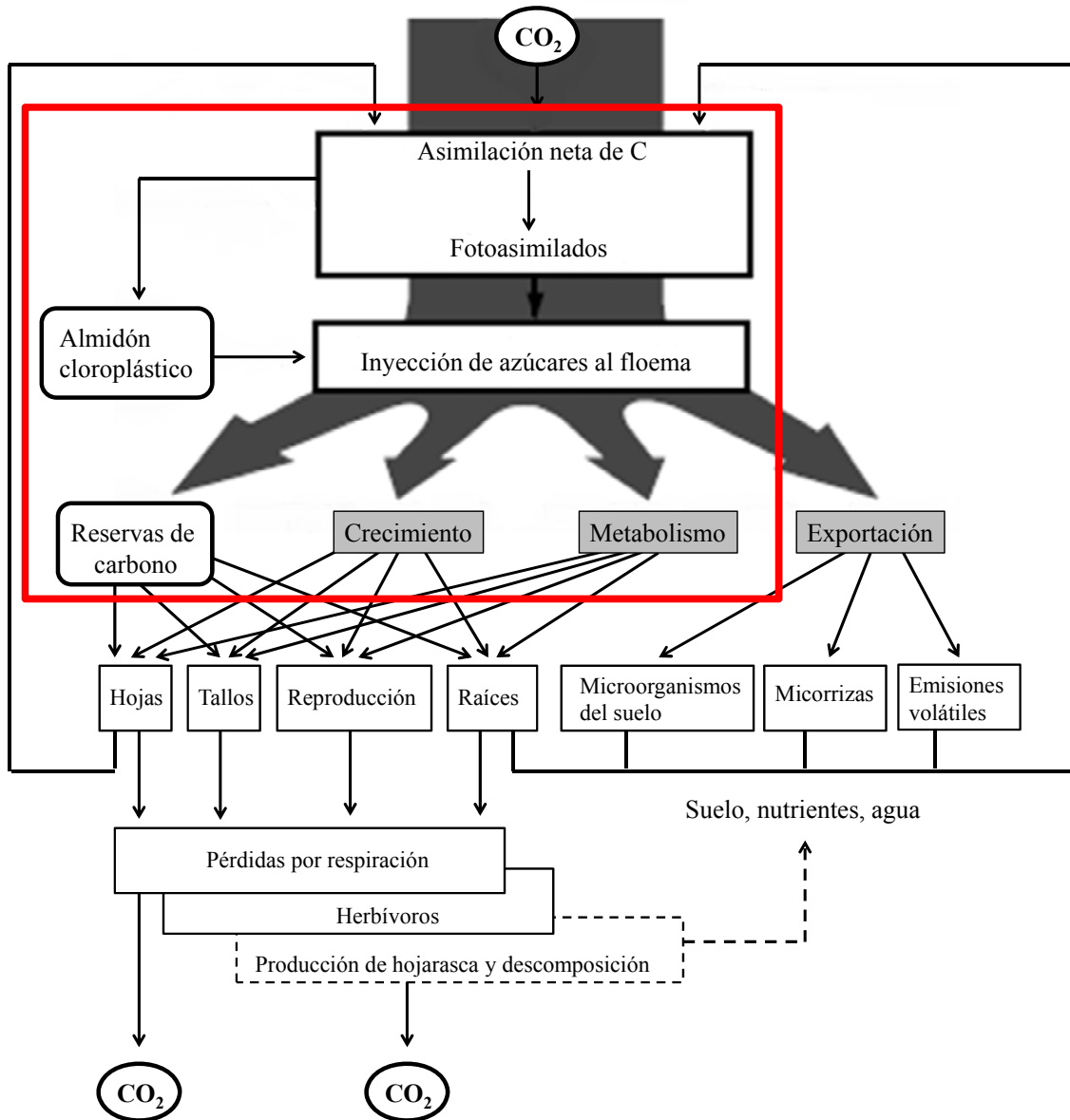


**Figura IV.39.** Representación simplificada de la relación entre la disponibilidad hídrica y luminosa, y la discriminación contra el isótopo pesado del carbono, en tejido foliar “nuevo” (modificado a partir de Ferrio *et al.* 2003). En condiciones de adecuada luminosidad y suministro hídrico (A), la apertura estomática permite la continua renovación de las moléculas de  $\text{CO}_2$  que pasan a la cámara subestomática. La Rubisco, activada por la luz, discrimina activamente en contra del isótopo pesado, por lo que se produce un progresivo empobrecimiento del tejido foliar en el mismo. En condiciones de baja luminosidad (B), si el suministro hídrico es adecuado, es posible que se produzca la apertura estomática, aún a costa de una disminución de la eficiencia en el uso del agua y a pesar de que la activación de la Rubisco sea menor, a fin de aprovechar la escasa luz disponible. Esta apertura permite la adecuada renovación de la cámara subestomática y la consiguiente discriminación contra el isótopo pesado. En condiciones de estrés hídrico (C), a pesar de que los niveles de luz sean suficientes para promover la activación de la Rubisco, el cierre estomático inducido disminuye los niveles de renovación del  $\text{CO}_2$  en la cámara subestomática. La Rubisco en principio discrimina contra el isótopo pesado, pero si la situación se prolonga en el tiempo, deja de “poder elegir” y empieza a incorporarse isótopo pesado. En condiciones de estrés hídrico y energético (por baja luminosidad) (D), el cierre estomático y la inactivación de la Rubisco hacen el isótopo pesado sea incorporado en mayor proporción que en anteriores ocasiones.

#### IV.4.3. Cambios en la partición del C foliar asociados al estrés hídrico y energético.

Para evaluar el estado de suministro de carbono de los individuos participantes en el experimento de una forma rápida y sencilla, se optó por medir el contenido en carbohidratos no estructurales en distintos momentos clave del mismo, dado que previsiblemente, tanto el periodo de aclimatación previo como el proceso de estrés hídrico a que se vieron sometidos posteriormente constituyeron periodos de demanda de carbono variable (Körner, 2003). Estos carbohidratos no estructurales (NSC, *non-structural carbohydrates*) constituyen el reservorio de carbono fijado intermedio entre la asimilación y la utilización (**Figura IV.40**), y el principal componente del balance de carbono en plantas (Chapin *et al.* 1990, LeRoux *et al.* 2001), que se incrementa o decrece en función del equilibrio fuente – sumidero para este elemento (Mooney, 1972; Chapin *et al.* 1990). Así, la movilización de los carbohidratos no estructurales está fuertemente controlada y estrechamente vinculada mediante relaciones de tipo *trade-off* y fuente-sumidero con el crecimiento y la respuesta al estrés (e.g. LeRoux *et al.* 2001; Veneklaas y den Ouden, 2005; Bogdan y Zagdánska, 2006; Myers y Kitajima, 2007). En *A. alba*, como en la mayoría de especies arbóreas, este reservorio está formado principalmente por azúcares solubles de bajo peso molecular (glucosa, fructosa, sacarosa, etc.) y almidón (Hoch *et al.* 2003). En el caso particular del pinsapo, sin embargo, no existen trabajos previos que hayan abordado la descripción de los compuestos de reserva de esta especie.

Los azúcares solubles están implicados en la síntesis de otros compuestos, la producción de energía, la estabilización de membranas (Hoekstra *et al.* 1991; Hoekstra *et al.* 2001), la regulación en la expresión de ciertos genes (Koch, 1996), y la regulación del metabolismo, el crecimiento y el desarrollo (Rook y Bevan, 2003). Incluso se ha destacado su papel en la protección frente a diversos tipos de estrés (frío, desecación, herbivoría) (Canham *et al.* 1999, Bogdan y Zagdánska, 2006) por sus propiedades osmorreguladoras. El almidón por su parte, es considerado el compuesto de reserva más común y versátil, aunque a diferencia de los azúcares solubles carece de propiedades osmorreguladoras.



**Figura IV.40.** Representación esquemática del destino del carbono fijado en plantas. Todos los organismos necesitan carbohidratos para sustentar su metabolismo y permitir su crecimiento y desarrollo. Las plantas, como organismos autótrofos, son capaces de “fabricar” los carbohidratos que necesitan para sustentar su metabolismo y permitir su crecimiento a través de la fotosíntesis. Los fotosintatos así producidos son transportados a través del floema desde las hojas activas hasta los tejidos en crecimiento, bien para cubrir sus necesidades, bien para ser almacenados, anticipándose a circunstancias menos favorables (Rook y Bevan, 2003). El tamaño de los reservorios de C que aparecen a la izquierda reflejan el estado de suministro de C de un individuo (modificado de Körner, 2003).

En las muestras que se tomaron a los pocos días de inicio del experimento (momento “inicial”), se registraron diferencias entre tratamientos de irradiancia, tanto en el tejido foliar maduro como en el nuevo de ambas especies, hallándose menores valores en el tratamiento de baja irradiancia, tanto para los azúcares libres como para el almidón y la suma total de ambos (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$  en todos los casos). Este resultado es coherente con el brusco descenso en el *input* energético experimentado por los individuos adscritos a este tratamiento, que pasaron de encontrarse a la intemperie en las instalaciones del Jardín Experimental a hallarse en una cámara de crecimiento *in vivo* bajo condiciones de iluminación que distaban mucho las condiciones de irradiancia natural propias de esa época del año. Este efecto, puesto de manifiesto en distintos trabajos previos en los que los individuos fueron sometidos experimentalmente a niveles de irradiancia bajos (e.g. Veneklaas y den Ouden, 2005; Correia *et al.* 2006), se debe a que, cuando las hojas son sometidas a esos niveles de irradiancia, es esencial disminuir la tasa de respiración para permitir un balance de carbono positivo. Dado que la aclimatación de las tasas respiratorias al nuevo ambiente lumínico puede tardar varios días (Noguchi *et al.* 2001), es probable que se produzca un desequilibrio temporal para el carbono mientras se mantengan las altas tasas típicas de las hojas de sol.

Por otra parte, el tamaño de los distintos reservorios hallado en *A. alba* fue casi siempre superior al hallado en *A. pinsapo* (**Tabla IV.18**), lo que podría ser indicativo de una menor tolerancia al estrés por parte de esta última especie (Myers y Kitajima 2007), dado que la movilización de estos reservorios actuaría como un tampón capaz de amortiguar el efecto que condiciones ambientales adversas pueden tener sobre el estado de suministro de carbono de los individuos. En este sentido, hay hallazgos que relacionan el almacenamiento de carbohidratos de reserva con una mayor tolerancia a condiciones de estrés y/o de baja luminosidad (Kobe, 1997; Veneklaas y den Ouden, 2005; Myers y Kitajima, 2007). Así, se ha planteado la hipótesis de un posible *trade-off* entre el crecimiento de la biomasa aérea y el almacenamiento de carbohidratos de reserva, e incluso que variaciones en la asignación de recursos a *pools* de carbohidratos de reserva constituyen un mecanismo para la variación interespecífica en la supervivencia en condiciones de baja irradiancia (Kobe, 1997), al hallarse evidencias de que la inversión en estructuras aéreas y el almacenamiento de reservas constituyen sumideros que compiten por los carbohidratos en plantas leñosas (Kozlowski, 1992).

En lo que respecta a la “edad” del tejido foliar, las mayores concentraciones de azúcares libres se registraron por lo general, en el tejido foliar maduro, siendo el

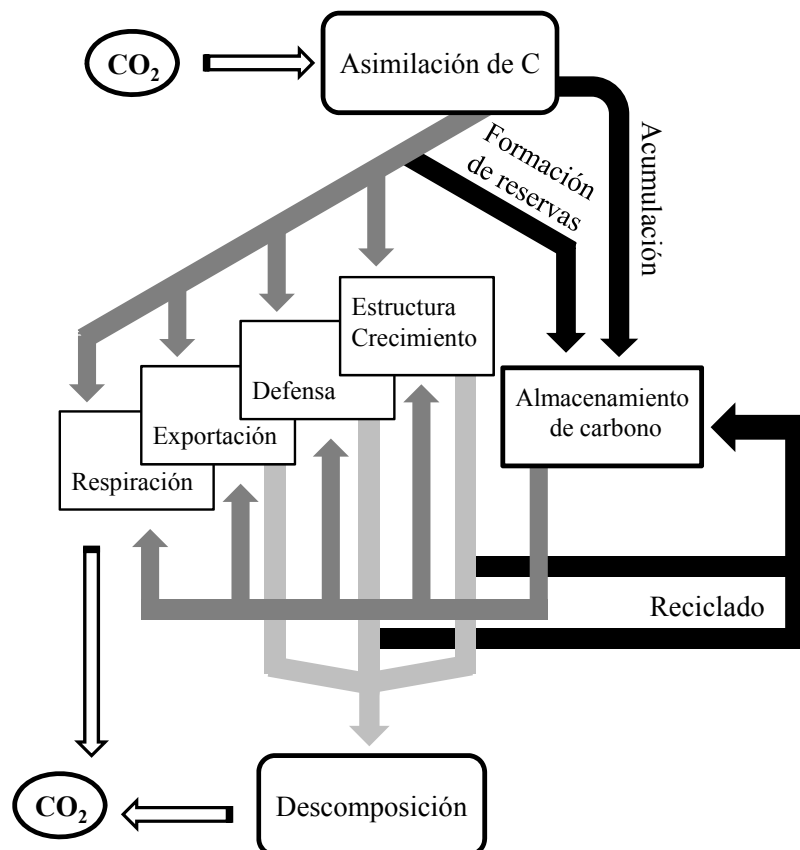
almidón, en cambio, más abundante en el tejido más joven (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ). Este tejido fue asimismo el más activo, registrándose variaciones en el tamaño de los reservorios analizados tanto en la primera como en la segunda parte del experimento (**Tabla IV.18**). Finalmente, en lo que respecta a la proporción en que se encuentran los principales compartimentos analizados, es de destacar que, en general, la concentración de almidón fue superior a la de azúcares (ANOVA de 1 vía,  $p < 0.05$ ), por lo que fueron las variaciones experimentadas por parte de aquel las que principalmente determinaron la evolución temporal experimentada por el reservorio de carbohidratos no estructurales totales (**Tabla IV.18**). No obstante, al considerar por separado ambas especies y edades de tejido foliar, se observó que esta diferencia fue mayor en *A. pinsapo* (aprox. proporción 3 a 1 en tejido foliar maduro y 5 a 1 en tejido foliar “nuevo”) que en *A. alba* (proporción 1 a 1 en tejido foliar maduro, 3 a 1 en tejido “nuevo”), donde se obtuvieron resultados acordes con los hallados en trabajos previos (Hoch *et al.* 2003).

Los tratamientos de irradiancia influyeron decisivamente en el tamaño y las variaciones experimentadas a lo largo del experimento por estos reservorios. En el tejido foliar maduro de ambas especies, durante la primera parte del experimento, las mayores concentraciones de carbohidratos, y las mayores variaciones con el paso del tiempo, se dieron por lo general en el tratamiento a alta irradiancia (**Tabla IV.18**). Este resultado es acorde con trabajos previos en los que se halló una relación positiva entre el contenido en NSC y la irradiancia (Niinemets 1995, 1997b; Johnson *et al.* 1997). En este tratamiento, se registraron tasas de fijación de C positivas en todo momento (ver resultados de la **Sección IV.3.2.1**), lo que explica el hecho de que se registrasen incrementos en la concentración de azúcares libres, indicativos del desarrollo del proceso de aclimatación a la luz. En este sentido, la señal lumínica estimuló el crecimiento en los individuos adscritos a este tratamiento (de hecho, se observó una mayor proliferación de brotes nuevos y una mayor longitud de éstos), lo que explicaría el hecho de que se registrasen simultáneamente descensos en el contenido de almidón. Por su parte, a baja irradiancia, los reservorios hallados fueron de menor tamaño y más constantes en el tiempo. Así, no se detectaron incrementos en la concentración de azúcares libres, lo que sería indicativo de la fuerte limitación energética impuesta con la aplicación de este tratamiento, al igual que las bajas tasas de fijación de C registradas en los individuos adscritos a este tratamiento. Por otro lado, el hecho de que tampoco se registrase descenso alguno en el contenido de almidón es consecuencia del escaso estímulo del crecimiento que tuvo lugar en ese tratamiento, y podría ser por otro lado

indicativo del proceso de aclimatación a niveles de irradiancia tan bajos, al sugerir un descenso en el gasto respiratorio asociado al mantenimiento de estos individuos. En el tejido foliar nuevo se halló una evolución parecida en esta primera parte del experimento, hallándose un incremento en el contenido de azúcares (también a baja irradiancia) y un descenso en el contenido de almidón (**Tabla IV.18**), si bien no se detectó un descenso en el contenido total. Ello podría deberse a la mayor capacidad de fijación de C de este tejido en crecimiento, sobre todo teniendo en cuenta que se desarrolló bajo los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento.

En la segunda parte del experimento, de nuevo se registraron mayores tamaños de contenidos en el tratamiento de alta irradiancia (**Tabla IV.18**). En el tejido foliar maduro, se halló una mayor concentración de azúcares en el tratamiento “sin riego”, y de almidón y NSC totales en el tratamiento de riego, si bien no se hallaron diferencias significativas, lo que podría deberse al hecho de que los individuos se encontrasen notablemente limitados desde el punto de vista energético e hídrico. En el tejido foliar nuevo, la aplicación de los tratamientos de riego tampoco tuvo influencia *per se* sobre la evolución temporal del contenido en estos compuestos, hallándose únicamente diferencias en el contenido de almidón, que se redujo notablemente en el tratamiento “alta irradiancia / sin riego”. Este descenso es el resultado del desequilibrio existente entre la fuente de C (una disminución en las tasas de fijación de C derivadas de la aplicación del tratamiento de estrés hídrico, aun estando los individuos a alta irradiancia) y el sumidero de C derivado de la propia naturaleza del tejido foliar (“nuevo”, en fase activa de crecimiento), además del efecto inhibitorio del estrés hídrico sobre la síntesis de almidón descrito en trabajos previos (Zrenner y Stitt, 1991; Correia *et al.* 2006). El hecho de que no se hayan detectado estos cambios en el tratamiento a baja irradiancia ha de ser, nuevamente, consecuencia de la fuerte limitación energética impuesta con este tratamiento, que no sólo disminuiría el suministro de C vía fotosíntesis sino que además “anula” la inversión de C en la construcción de tejido foliar (limitación en el crecimiento, acumulación pasiva de NSC). El contenido en azúcares fue marginalmente superior ( $p = 0.067$ ) en el tratamiento “sin riego”, hallándose un incremento significativo a baja irradiancia. Esta acumulación de azúcares, en los individuos adscritos al tratamiento de estrés hídrico, podría tener su origen también en la inhibición de la síntesis de almidón y la inversión de C en la síntesis de azúcares solubles (Freeden *et al.* 1991; Zrenner y Stitt, 1991; Quick *et al.* 1992, Correia *et al.* 2006). El hecho de que, no obstante, no se aprecien grandes variaciones en este

contenido se debe a distintas razones: la menor concentración de carbohidratos, especialmente en el tratamiento a baja irradiancia; la limitación energética impuesta con la aplicación de los tratamientos, que lógicamente influye en la velocidad de suministro del C necesario para la síntesis de estos compuestos; y finalmente, el hecho de que hayamos considerado dentro del mismo compartimento (“azúcares libres”) compuestos cuya síntesis está favorecida (en el caso de la glucosa y la fructosa) o desfavorecida (en el caso de la sacarosa) por el propio desarrollo del proceso de estrés hídrico (Pelleschi *et al.* 1997). En lo que respecta al contenido total en carbohidratos no estructurales, los análisis únicamente registraron un descenso en el tratamiento “alta irradiancia / sin riego”, ligado al decremento experimentado en la concentración de almidón. Para el resto de combinaciones de tratamientos se registraron incrementos con el paso del tiempo, derivados posiblemente de la inversión activa en azúcares en el tratamiento sin riego y de una acumulación pasiva de azúcares en los individuos regados (**Figura IV.41**).



**Figura IV.41.** Destino del carbono asimilado en plantas. Las reservas móviles de C pueden construirse por formación activa en competencia con otras funciones, como el crecimiento, la respiración o la síntesis de sustancias defensivas (y supone por tanto un *trade-off*), por acumulación pasiva (en cuyo caso no constituye un *tradeoff*, puesto que se debe simplemente a que, en ocasiones, el suministro de C excede la demanda) o a partir del reciclado de otros compuestos carbonados. Tomado de Hoch (2007).

Al considerar los resultados obtenidos para las distintas combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia (**Tabla IV.19**), es de destacar la similitud en el comportamiento mostrado por los individuos de ambas especies, especialmente a alta irradiancia. En este tratamiento únicamente se halló una reducción en el contenido de almidón y un incremento en la concentración de azúcares en la primera parte del experimento, ligados al proceso de aclimatación a ese nivel de irradiancia y a las mayores tasas de fijación de C registradas en ese tratamiento. En la segunda parte del experimento, únicamente se observaron cambios en el tejido “nuevo”, más activo, hallándose para *A. pinsapo* un incremento significativo en la concentración de los NSC totales de los individuos regados, que no se produjo en *A. alba*, y que podría deberse a diferencias interespecíficas en la síntesis del almidón o en la tasa de movilización de este compuesto.

En lo que respecta al tratamiento de baja irradiancia, es de destacar la escasa movilización de reservas en ambas especies, tanto en la primera como en la segunda parte del experimento. En el tejido foliar “nuevo” de *A. pinsapo* se produjo además una acumulación de azúcares libres y de NSC totales en la primera parte del experimento, y de azúcares en la segunda parte del experimento. Considerando la similitud de las tasas de fijación de C registradas en ambas especies, tanto en la primera como en la segunda parte del experimento, este incremento podría deberse a una menor capacidad de crecimiento en *A. pinsapo* durante el proceso de aclimatación a la luz, y una síntesis activa de azúcares con capacidad osmorreguladora durante el proceso de estrés hídrico.

Dado que, como era de esperar, las mayores tasas de fijación de C se hallaron siempre en el tratamiento a alta irradiancia (a lo largo de todo el experimento) y con riego (segunda parte del experimento), puede concluirse que los individuos adscritos a esta combinación de tratamientos gozaron de un estado de suministro de carbono razonablemente bueno, e indudablemente mejor que en otras combinaciones de tratamientos, lo que explicaría el hecho de que se registrasen no sólo mayores concentraciones en todo momento, sino también mayores variaciones temporales, ligadas a la movilización de almidón y principalmente a la acumulación simultánea, aunque a menudo leve, de azúcares libres. En comparación, las menores concentraciones y la “inmovilidad” de las reservas acumuladas a baja irradiancia parecen ser resultado de la limitación en el *input* energético a que se ven sometidos los individuos adscritos al mismo, los cuales mostraron menores tasas de fijación de C y un

menor crecimiento que los individuos del otro tratamiento. Esta constricción fue tal que, si bien por un lado redujo el consumo de almidón, también limitó la capacidad de invertir en la síntesis de azúcares con carácter osmorregulador durante el proceso de estrés hídrico (Correia *et al.* 2006). En contraposición, el tratamiento de alta irradiancia, permitió un cierto grado de activación en los individuos de ambas especies, que indujo la movilización de reservas y/o su acumulación en las distintas situaciones.

El hecho de que apenas existan diferencias derivadas directamente de la aplicación de los tratamientos de riego, unido a la existencia de diferencias consistentes entre tratamientos de irradiancia, indican una vez más la influencia crucial de la señal lumínica en el desenvolvimiento de ambas especies, hasta el punto de que el ambiente lumínico limitó decisivamente la capacidad de respuesta ante un proceso de estrés hídrico.

**Tabla IV.18.** Resultados más significativos de las diferencias registradas en el contenido en azúcares libres, en almidón y en NSC en muestras de tejido foliar maduro (parte superior) y “nuevo” (parte inferior) a lo largo del experimento, para los principales efectos considerados (especies, tratamientos de irradiancia y riego). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre especies, tratamientos de irradiancia y/o de riego, y distintos momentos del tiempo. El nivel de significación considerado fue de  $p < 0.05$ , salvo en caso de diferencias marginalmente significativas, en cuyo caso se indica otro valor entre paréntesis. “AI”: alta irradiancia. “BI”: baja irradiancia. “R”: riego. “SR”: sin riego. Las flechas indican si se produjo un incremento o una disminución con el paso del tiempo. El signo “=” indica que no existe una tendencia clara con el tiempo. Las casillas sombreadas indican que ese efecto (el tratamiento de riego) no se evaluó en la primera parte del experimento.

Efecto	Tejido foliar maduro								
	“inicial” – “inicial 2”			“inicial 2” – “final”					
	azúcares	almidón	NSC totales	azúcares		almidón		NSC totales	
<b>Especie</b> (mayor concentración)	<i>A. alba</i> *	<i>A. pinsapo</i>	<i>A. alba</i> *	<i>A. alba</i> *		<i>A. pinsapo</i> *		<i>A. alba</i> *	
<b>Irradiancia</b> (mayor concentración)	AI *	AI *	AI *	AI *		AI		AI *	
<b>Riego</b> (mayor concentración)				SR		R		R	
<b>tiempo</b>	↑ AI *	↓ AI *	↓ AI *	= AI - R	= AI - SR	↑ AI - R	= AI - SR	= AI - R	= AI - SR
	= BI	= BI	= BI	= BI - R	= BI - SR	= BI - R	= BI - SR	= BI - R	= BI - SR
Efecto	Tejido foliar “nuevo”								
	“inicial” – “inicial 2”			“inicial 2” – “final”					
	azúcares	almidón	NSC totales	azúcares		almidón		NSC totales	
<b>Especie</b> (mayor concentración)	<i>A. alba</i>	<i>A. alba</i>	<i>A. alba</i>	<i>A. alba</i> ( $p=0.057$ )		<i>A. alba</i>		<i>A. alba</i>	
<b>Irradiancia</b> (mayor concentración)	AI	AI	AI	AI		AI		AI	
<b>Riego</b> (mayor concentración)				SR ( $p=0.067$ )		R - AI *		R (AI)	
<b>tiempo</b>	↑ AI *	↓ AI *	= AI	↑ AI - R	= AI - SR	= AI - R	↓ AI - SR *	↑ AI - R	↓ AI - SR *
	↑ BI *	= BI	= BI	↑ BI - R	↑ BI - SR *	= BI - R	= BI - SR	↑ BI - R	↑ BI - SR

**Tabla IV.19.** Resultados más significativos de las diferencias registradas en el contenido en azúcares libres, en almidón y en NSC en muestras de tejido foliar maduro (tabla superior) y “nuevo” (tabla inferior) a lo largo del experimento, para las distintas combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia. “AI”: alta irradiancia. “BI”: baja irradiancia. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre especies, tratamientos de irradiancia y/o de riego ( $p < 0.05$ ). El doble asterisco indica un valor de  $p = 0.06$ . En cada columna se indican, por orden, los resultados obtenidos en la primera parte del experimento (1<sup>a</sup>), en la segunda parte, bajo el tratamiento de riego (2<sup>a</sup>-R) y bajo el tratamiento de estrés hídrico (2<sup>a</sup>-NR). Las flechas indican si se produjo un incremento o una disminución con el paso del tiempo. El signo “=” indica que no se observa una tendencia clara con el paso del tiempo.

<b>Tejido foliar maduro</b>									
	azúcares			almidón			NSC totales		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> - R	2 <sup>a</sup> - NR	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> - R	2 <sup>a</sup> - NR	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> - R	2 <sup>a</sup> - NR
<i>A. alba</i> – BI	↑	=	=	↓	=	=	↓	=	=
<i>A. alba</i> – AI	↑	=	=	↓*	↑	=	↓	=	=
<i>A. pinsapo</i> – BI	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>A. pinsapo</i> – AI	↑	=	=	↓*	↑	=	↓	=	=
<b>global</b>	↑*	=	=	↓*	=	=	↓*	=	=

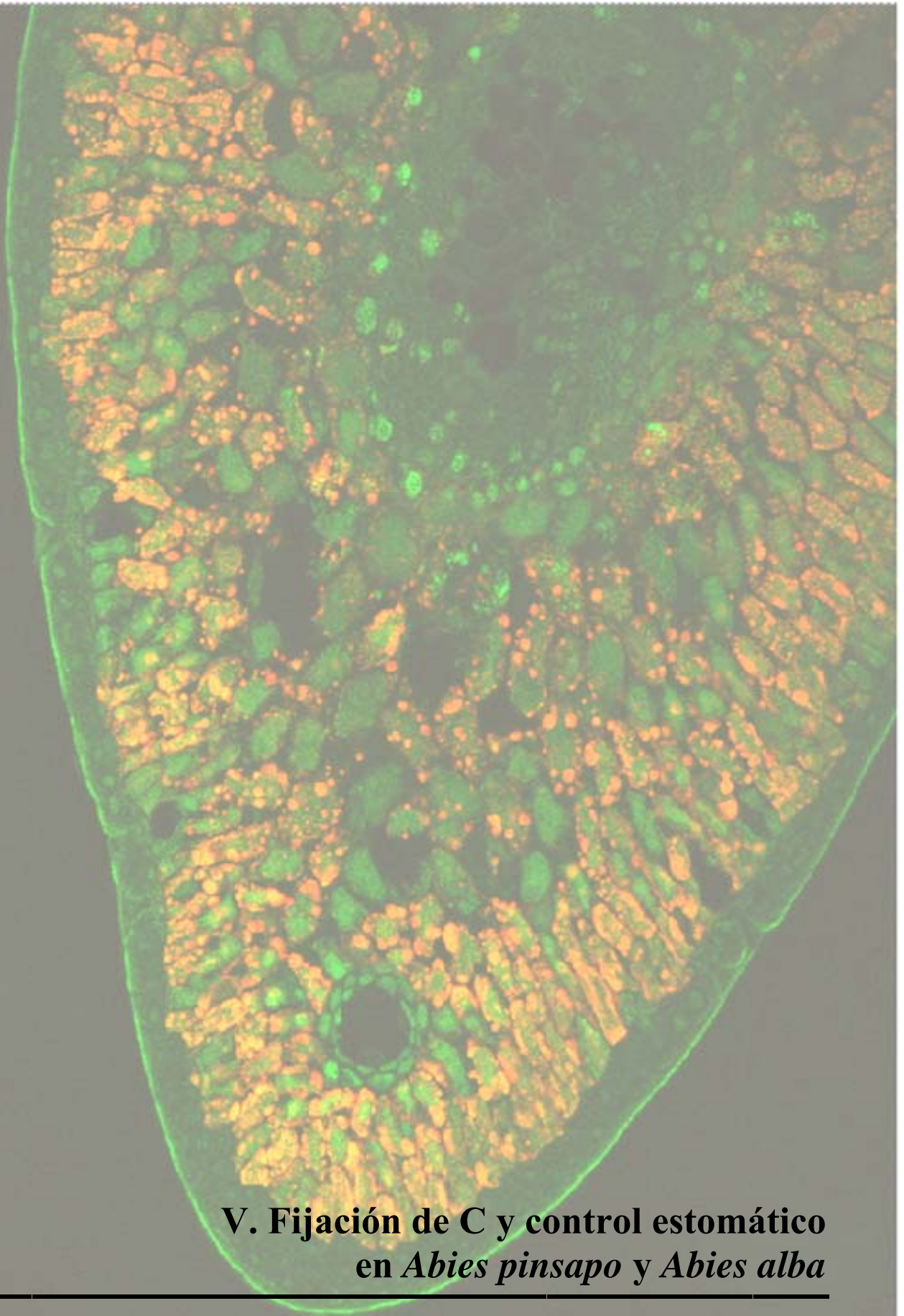
  

<b>Tejido foliar “nuevo”</b>									
	azúcares			almidón			NSC totales		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> - R	2 <sup>a</sup> - NR	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> - R	2 <sup>a</sup> - NR	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> - R	2 <sup>a</sup> - NR
<i>A. alba</i> – BI	↑	=	↑	↓	=	=	=	=	=
<i>A. alba</i> – AI	↑*	↑	↑	↓	=	↓*	=	=	↓*
<i>A. pinsapo</i> – BI	↑*	↑	↑*	=	=	=	↑**	=	=
<i>A. pinsapo</i> – AI	↑*	=	=	↓	↑	↓*	=	↑*	↓*
<b>global</b>	↑*	↑*	↑*	↓*	=	↓*	=	↑*	↓*

#### IV.5. Conclusiones.

- *Abies alba* ha demostrado ser la especie con mayor capacidad de homeostasis frente a cambios en las condiciones ambientales de suministro hídrico. En comparación, *A. pinsapo* presenta un control deficitario de la apertura estomática y un menor grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua, lo que a la postre redundaría en una menor eficiencia en el uso del agua.
- De nuevo, la composición en isótopos estables de C del tejido foliar no puede emplearse directamente como indicador del estatus hídrico de un individuo cuando exista algún otro factor que pueda alterar simultáneamente las variables que intervienen en el intercambio gaseoso.
- La señal isotópica de C también sugiere, al igual que las medidas de intercambio gaseoso, la existencia de un mayor control de la apertura estomática en *A. alba*, lo que permitió a esta especie desenvolverse con mayor éxito en las distintas combinaciones de irradiancia y riego.
- Las condiciones de estrés por déficit hídrico y energético no sólo afectaron a las variables relacionadas con el intercambio gaseoso, el estatus hídrico y la señal isotópica, sino que también actuaron en sentidos opuestos sobre la eficiencia en el uso del agua y de la luz, existiendo en este sentido un claro *tradeoff* entre ambas, siendo éste de mayor intensidad en *A. pinsapo*.
- Existe una fuerte dependencia respecto a la señal lumínica, en los individuos de ambas especies en cuanto a la síntesis de NSC y su movilidad, mayor que respecto a la disponibilidad hídrica, como indican las mayores concentraciones en los individuos sometidos a los tratamientos de alta irradiancia, o las menores concentraciones y la “inmovilidad” de las reservas acumuladas a baja irradiancia, que parecen ser resultado de la limitación en el *input* energético a que se ven sometidos los individuos adscritos al mismo.
- Las mayores concentraciones de NSC en los individuos de *A. alba*, junto a la mayor eficiencia en el uso del agua y de la luz por parte de esta especie, indican una mayor tolerancia al estrés por parte de la misma en comparación con *A. pinsapo*.





**V. Fijación de C y control estomático**  
en *Abies pinsapo* y *Abies alba*

---



## V. Fijación de carbono y control estomático en *Abies pinsapo* y en *Abies alba*.

*En este capítulo se describe el tercer y último de los experimentos llevados a cabo para comparar el comportamiento ecofisiológico de A. pinsapo y de A. alba bajo condiciones controladas. Se trata en realidad de tres subexperimentos diseñados para conocer la capacidad de fijación de carbono y el control ejercido sobre la apertura estomática en situaciones en la que el input energético se suministra de forma constante, mediante la aplicación de un nivel de irradiancia determinado, o de forma variable, bien mediante la aplicación de distintos niveles de irradiancia, bien mediante la aplicación de un cierto nivel de irradiancia constante interrumpido por periodos de oscuridad de duración creciente. En ellos se realizó el seguimiento de variables relacionadas con el intercambio gaseoso y se determinó la cantidad de carbono fijado y de agua “perdida” a través de los estomas en cada caso. Cuando fue posible, además, se evaluaron los cambios experimentados por distintos parámetros que describen la dinámica temporal de la fotosíntesis neta y la conductancia estomática al agua, y el tiempo que tardó en alcanzarse el estado estacionario, lo que constituye un nuevo punto de vista en lo que respecta a la evaluación del comportamiento exhibido por individuos de ambas especies en distintas situaciones de suministro de irradiancia.*

### V.1. Introducción.

#### V.1.1. Marco conceptual.

De todos los factores ambientales que afectan al desempeño de los organismos vegetales, puede que la luz sea el más heterogéneo tanto espacial como temporalmente (Percy, 1999). Así, bajo el dosel de especies perennes, largos periodos de luz difusa son interrumpidos de forma impredecible por brillantes *sunflecks* y por la apertura de pequeños huecos y claros (Percy, 1983; Chazdon y Percy, 1991; Valladares *et al.* 1997; Lei y Lechowicz, 1998), que alteran sensiblemente los niveles de irradiancia que perciben los individuos del sotobosque.

En el caso del pinsapo, el predominio de masas monoespecíficas, caracterizadas por una elevada densidad de pies y el desarrollo de un dosel cerrado y compacto (ver **Sección III.1.2**), hacen que la pervivencia de la especie dependa en gran medida de la

capacidad de los juveniles que se encuentran en el sotobosque para sobrevivir en el interior umbroso de los pinsapares, y para aprovechar los escasos rayos de luz que de forma fortuita puedan captar con el movimiento de las ramas por el viento o la apertura de un claro en el dosel. Por otro lado, las poblaciones de pinsapo se encuentran plenamente inmersas en un ambiente típicamente mediterráneo, con las constricciones que la intensa sequía estival característica pueda imponer sobre los procesos de regeneración natural de la especie, por lo que puede afirmarse que el mecanismo natural de regeneración del pinsapar, al menos bajo dosel, ha de estar fuertemente influenciado por la conjunción de dos circunstancias, la sequía estival y los bajos y/o variables niveles de irradiancia, que interaccionan e influyen de forma opuesta sobre los individuos juveniles de la especie (Sack *et al.* 2003). En este sentido, Smith y Huston (1989) ya abordaron la competencia entre los rasgos que favorecen la tolerancia a la sombra y la resistencia a la sequía, siendo este *tradeoff* en particular objeto de numerosos estudios posteriores, en los cuales se ha querido comprobar si la resistencia al estrés hídrico puede verse comprometida en condiciones de baja luminosidad, llegando incluso a plantearse la hipótesis de que la sequía puede ser más perniciosa bajo sombra que a pleno sol (Valladares y Pearcy, 2002). No obstante, y a pesar de haberse contrastado esta teoría en distintas ocasiones (e.g. Aranda *et al.* 2005; Climent *et al.* 2006), otros estudios hallaron que los bajos niveles de irradiancia tuvieron el efecto contrario, produciéndose una mitigación de los efectos derivados del estrés hídrico (e.g. Prider y Facelli, 2004; Sánchez-Gómez *et al.* 2006), en línea con la hipótesis de la facilitación (Callaway, 1995; Holmgren, 2000), o bien que ambos factores (el estrés hídrico y los bajos niveles de irradiancia) tuvieron efectos independientes (Sack y Grubb, 2002; Sack, 2004).

En cualquier caso, en relación con el pinsapo no existen trabajos de investigación que hayan abordado específicamente la forma en que los individuos más jóvenes, el estadio vital más vulnerable y, al mismo tiempo, el eslabón fundamental en los procesos de regeneración natural de la especie, afrontan este posible *tradeoff*, ni conocemos en qué medida se relaciona su capacidad de fijación de C con la dosis de irradiancia recibida, ni siquiera hasta qué punto esta relación se ve afectada por la forma en que esta dosis es suministrada, mediante la exposición a un determinado nivel de irradiancia, a distintos niveles de irradiancia en periodos de duración variable, o incluso a niveles extremadamente bajos. Por ello, se ha diseñado una serie de experimentos que abordan estas cuestiones, con el objetivo fundamental de comprobar si uno de los rasgos

xeroheliófilos que se han potenciado en *A. pinsapo*, en comparación con una especie de ambientes más mésicos, como *A. alba*, ha sido el control estomático, lo que le capacitaría *a priori* para i) responder rápidamente a cambios en el ambiente lumínico, y ii) maximizar la cantidad de carbono fijado en relación a la cantidad de agua perdida vía conductancia estomática. Así, en la planificación del diseño se ha incluido la evaluación de estas últimas variables, además de haberse considerado la importancia de la dinámica temporal del intercambio gaseoso, mediante la obtención de las constantes temporales que la definen, al objeto de evaluar la capacidad de reacción ante cambios en las condiciones ambientales (en nuestro caso, ante niveles de irradiancia variables), todo ello con la intención de conocer la estrategia seguida para mantener, en la medida de lo posible, un balance de carbono positivo.

#### V.1.2. Hipótesis de partida.

El pinsapo puede considerarse *sensu lato* una especie producto de un proceso evolutivo cuya fuerza directriz ha sido la rápida adaptación a condiciones climáticas de tipo mediterráneo (ver **Sección I.4.1**), por lo que cabría esperar, en consecuencia, la manifestación en su comportamiento ecofisiológico de rasgos semejantes a las estrategias adaptativas que presentan especies de comunidades vegetales típicamente mediterráneas. Entre esos rasgos, cabe destacar el notable grado de control de la apertura estomática que exhiben muchas de estas especies, al objeto de minimizar la cantidad de agua perdida durante la fijación de carbono. Así, el pinsapo, frente a otras especies de abetos propias de ambientes más benignos, como *A. alba*, habría de presentar un mayor control estomático y una mayor eficiencia en el uso del agua. Por otro lado, y si tenemos en cuenta la hipótesis de la existencia de un *tradeoff* entre la tolerancia a la sombra y al estrés hídrico, parece lógico pensar que en *A. alba*, una de las especies forestales europeas más tolerantes a la sombra (Robakowski *et al.* 2003), primen los rasgos propios de esta estrategia vital, mientras que en *A. pinsapo*, al que le ha “tocado” vivir en condiciones mediterráneas caracterizadas por una fuerte sequía estival, hayan predominado los rasgos que doten a la especie de una mayor tolerancia a la sequía, con independencia de que en determinados microambientes del sotobosque, las plántulas y brinzales puedan experimentar niveles de irradiancia extremadamente bajos (ver **Sección III.1.2**). Así, *A. pinsapo* podría considerarse una especie “mediterraneizada”, capaz de afrontar la heterogeneidad espacial y temporal de las

condiciones ambientales que caracterizan los ecosistemas forestales mediterráneos, mediante un comportamiento más plástico que el exhibido por especies propias de ecosistemas forestales templados, como *A. alba*.

Sin embargo, y tal y como se ha expuesto anteriormente (ver **Sección I.4.5**), existen estudios que sustentarían la hipótesis contraria (Lortie y Aarssen, 1996), lo que implicaría que *A. alba* podría considerarse *a priori* la especie capaz de un uso más plástico y eficiente de los recursos disponibles en cada momento. Además, la capacidad de supervivencia del pinsapo podría basarse en su estrategia vital, caracterizada por la frugalidad (Linares y Carreira, 2006), por lo que es necesario evaluar asimismo la interacción entre los niveles de baja irradiancia y el estrés hídrico propio de la época estival en el pinsapo.

### *V.1.3. Objetivo del experimento. Objetivos específicos.*

El objetivo básico de este capítulo ha sido evaluar experimentalmente la capacidad de fijación de carbono y la rapidez de respuesta en el control estomático, en individuos juveniles de *A. alba* y de *A. pinsapo*, bajo condiciones controladas. Con este propósito, se han diseñado tres experimentos que tratan de cubrir distintos aspectos específicos relacionados. En el primer experimento, se pretende conocer la respuesta fotosintética a un nivel de irradiancia constante, y estimar la capacidad de fijación de carbono así como la cantidad de agua perdida en individuos de ambas especies adscritos a distintos tratamientos de irradiancia. En el segundo experimento, el objetivo específico es conocer la respuesta de ambas especies al suministro de cierta dosis de luz mediante la yuxtaposición de periodos de distinta duración bajo niveles de irradiancia diferentes, y si la cantidad de C fijado y de agua “perdida” dependen de la forma en que la luz es suministrada y del tipo de respuesta exhibida por ambas especies. En el tercero, se pretende caracterizar la respuesta fotosintética ante niveles de luz estacionarios, conocer el efecto que tiene sobre la misma la interposición de periodos de oscuridad de duración creciente, y evaluar, por un lado, si el tiempo de retardo al hallarse de nuevo sometidos los individuos a un determinado nivel de irradiancia se incrementa de una forma lineal o no al incrementarse la duración de los periodos de oscuridad; y por el otro, conocer en qué medida puede mermarse la capacidad de fijación de C a causa del tiempo de retardo, y si ese decremento es proporcional o no a la reducción de la dosis de luz.

## V.2. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos.

### V.2.1. Diseño experimental.

Los tres experimentos descritos en este capítulo consistieron básicamente en el seguimiento de variables relacionadas con el control de la apertura estomática y la fijación de carbono en individuos sometidos a dos irradiancias distintas de incubación. Estos experimentos fueron llevados a cabo en el interior de una cámara de crecimiento *in vivo* adscrita a los Servicios Técnicos de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes en todo momento, con una temperatura media alrededor de los 20 – 22 °C, una humedad relativa del aire del 50-60% y un fotoperiodo de doce horas de luz y doce de oscuridad. Los individuos (4-5 réplicas por tratamiento y especie) fueron asignados al azar, en un diseño completamente aleatorizado, a dos niveles de irradiancia diferentes. Dentro de cada nivel de irradiancia, los individuos fueron rotados al azar semanalmente, al objeto de evitar los posibles efectos derivados de la localización de los mismos en el interior de la cámara.

Los tratamientos de irradiancia consistieron en una irradiancia media, de aproximadamente 350-400  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y una irradiancia baja, de 30-50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dicha irradiancia fue suministrada mediante tubos fluorescentes convencionales. Dada la diferencia en el porte entre los individuos de ambas especies, fueron colocados a distintas alturas, al objeto de homogeneizar la cantidad de luz incidente sobre cada uno de ellos. En adelante, los tratamientos serán referidos como “alta irradiancia” (AI) y “baja irradiancia” (BI), para hacer más intuitivos los correspondientes análisis y gráficos del apartado dedicado a resultados (**Sección V.3**) y facilitar así su comprensión. Durante cada experimento, los individuos fueron convenientemente regados (aproximadamente, 100 ml por individuo y día en el tratamiento BI, y 125 ml en el tratamiento AI). Además, se hizo un seguimiento de los niveles de humedad en el sustrato de los contenedores en los que se hallaban los individuos, mediante el empleo de una sonda de humedad Theta Probe modelo ML2x, acoplado a un *datalogger* HH2, todo de Delta-T Devices Ltd. (Cambridge, Reino Unido).

Para las medidas de intercambio gaseoso descritas en las siguientes secciones, se empleó el IRGA portátil que se describe en la **Sección II.3.6.1** de esta memoria. Estas medidas se tomaron en 3-5 individuos, seleccionados al azar dentro de cada nivel luz y especie, y siempre en tramos de un año de edad, con acículas maduras. Estos tramos fueron marcados y empleados a lo largo de cada experimento, siendo recolectados al final de los mismos, al objeto de corregir los datos experimentales por el área foliar real. En todos los casos, la irradiancia necesaria para estas mediciones fue suministrada mediante una lámpara de haluro metálico acoplada a un foco halógeno.

#### *V.2.1.1. Experimento 1. Curvas “fotoperiodo”.*

El primer experimento consistió en la realización de curvas que denominamos “fotoperiodo” con los individuos de ambas especies adscritos a los dos tratamientos de incubación previstos. Con estas curvas “fotoperiodo”, que consistieron en suministrar un cierto nivel de irradiancia constante durante un periodo de tiempo concreto, y en registrar simultáneamente las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua, el objetivo era poder estimar la cantidad de carbono fijado y de agua “perdida” por estos individuos.

Para la obtención de estas curvas, los individuos seleccionados fueron sometidos a una irradiancia incidente similar a la del tratamiento AI, después de haber estado en completa oscuridad durante la noche. Una vez que la respuesta fotosintética había alcanzado un valor máximo, calculado mediante el ajuste de los datos experimentales registrados a una curva sigmoideal definida por tres parámetros usando SigmaPlot 8 (Systat Software Inc., 2006), y tras comprobar que esta respuesta se mantiene prácticamente constante durante varias horas cuando se ha alcanzado el estado estacionario, se optó por reducir el registro de las tasas de intercambio gaseoso a una hora en la mayoría de los casos, al objeto de agilizar la toma de datos y poder aumentar así el número de réplicas. Conociendo para cada caso la duración del periodo de oscuridad y el momento en que se había producido el encendido de la fuente de irradiancia, se calcularon tres parámetros temporales distintos: el tiempo transcurrido desde el encendido hasta alcanzar la tasa máxima calculada, que denominamos  $T_{\text{maxsig}}$ ; el tiempo transcurrido desde el encendido hasta que se produjo el 63% del cambio total experimentado por la tasa neta de fotosíntesis registrada ( $T_{\text{tau}}$ ) (Whitehead y Teskey, 1995; Whitehead *et al.* 1996; Pepin y Livingson, 1997), calculando esa “cantidad de

cambio” como la diferencia entre la tasa promedio de respiración en oscuridad registrada y el valor experimental registrado más cercano al valor máximo considerado; finalmente, también se calculó el parámetro que denominamos  $T_{ss}$ , el tiempo transcurrido hasta alcanzarse el estado estacionario (en inglés, *steady-state*), definiendo este estado como el momento en que han transcurrido al menos cinco minutos en los que el coeficiente de variación, calculado considerando un periodo de cinco minutos sobre los datos experimentales registrados, permaneció por debajo del 5%. Estos tres parámetros temporales fueron calculados sobre los valores de las tasas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua registradas en paralelo, así como sobre el ratio entre las tasas instantáneas de ambas variables.

A partir del conjunto de datos experimentales registrados en cada caso, se calculó la dosis de irradiancia suministrada (en  $J\ m^{-2}$ ), como el área existente bajo la curva definida por el registro temporal de la irradiancia incidente, expresada en  $W\ m^{-2}$ . La cantidad de C fijado en cada caso (en  $\mu mol\ CO_2\ m^{-2}$ ) se calculó como el área bajo la curva definida por el registro temporal de la tasa instantánea de fotosíntesis neta, expresada en  $\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ . La cantidad de agua “perdida” a causa de la conductancia estomática al agua (en  $mol\ H_2O\ m^{-2}$ ) se calculó como el área bajo la curva definida por el registro temporal de esta variable, expresada en  $mol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$ . Para todos estos cálculos se empleó KaleidaGraph 4.1.1 (Synergy Software Inc., 1986-2010). A partir de estos tres datos pudo calcularse el ratio entre la cantidad de C fijado y la dosis de irradiancia recibida (expresado en  $\mu mol\ CO_2\ J^{-1}$ ) y el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida, expresado en  $\mu mol\ CO_2\ mol^{-1}\ H_2O$ , al objeto de realizar una estimación de la eficiencia en el uso del agua y de la luz por parte de los individuos participantes en este experimento.

#### V.2.1.2. Experimento 2. Dosis mediante distintos niveles de irradiancia.

El segundo experimento consistió en suministrar a individuos de ambas especies, adscritos a los dos tratamientos de irradiancia previstos (AI y BI), una cierta dosis de luz, mediante la colocación de los mismos bajo diferentes niveles de irradiancia durante periodos de tiempo de duración conocida. La secuencia de tiempos y niveles de irradiancia a que fue sometida cada uno de los individuos aparece en la **Tabla V.1**. Las tasas de intercambio se registraron con una frecuencia de cinco segundos. Previamente a

las medidas, cada individuo había estado una hora en el tratamiento de incubación al que estaba adscrito, al objeto de que todos los individuos empleados se encontrasen en la misma situación de partida. De forma simultánea a la aplicación y registro de estos niveles de irradiancia, se procedió al registro en paralelo de distintas variables relacionadas con el intercambio gaseoso, principalmente las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua.

**Tabla V.1.** Secuencia de periodos de luz previstos en el segundo experimento, con la irradiancia característica y la duración de cada uno de ellos. La irradiancia se expresa en  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

<b>Irradiancia incidente</b>	<b>Duración del periodo</b>
0	30'
300	60'
500	60'
1100	30'
800	60'
50	30'

Al igual que en el primer experimento, a partir de los registros temporales de los niveles de irradiancia y de las tasas de fotosíntesis neta y conductancia estomática, se calcularon la cantidad de luz suministrada a cada individuo (“dosis”, expresada en  $\text{J m}^{-2}$ ), la cantidad de C fijado vía fotosíntesis neta (“C fijado”, en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}$ ); y la cantidad de agua perdida a causa de la conductancia estomática al agua (“agua perdida”, en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}$ ). Para ello, y a pesar de que los datos experimentales se registraron en periodos de tiempo con la duración reflejada en la **Tabla V.1**, se consideraron únicamente los últimos 20 minutos, en el caso de los niveles de irradiancia aplicados durante media hora, y los últimos 40 minutos en el caso de los niveles de irradiancia aplicados durante una hora, a fin de evitar los momentos de tiempo en los que hubiese quedado constancia de la transición entre un nivel de luz y el siguiente, y recoger en cambio los momentos en los que la respuesta de las distintas variables se había estabilizado y había alcanzado con seguridad un estado próximo al estado estacionario. A partir de las tres variables mencionadas, se calcularon el ratio entre la cantidad de carbono fijado y la dosis de irradiancia recibida (expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ J}^{-1}$ ) y el ratio entre la cantidad de carbono fijado y la cantidad de agua perdida, expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ .

*V.2.1.3. Experimento 3. Interposición de periodos de oscuridad de duración creciente.*

En el tercer experimento, se caracterizó la respuesta fotosintética mostrada por individuos de ambas especies, seleccionados al azar, cuando los mismos eran sometidos a una irradiancia constante, de aproximadamente  $300 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de PAR, interrumpida por periodos de oscuridad de duración creciente. Así, el individuo seleccionado en cada ocasión era colocado bajo un nivel de irradiancia constante mientras se hacía un registro en continuo de las tasas de intercambio gaseoso, y cuando alcanzaba el estado estacionario en su respuesta fotosintética, era sometido a oscuridad total durante 5 minutos. Pasado este tiempo, el individuo era de nuevo colocado bajo el nivel de irradiancia constante. En cuanto volvía a alcanzarse el estado estacionario, se aplicaba un periodo de oscuridad de 10 minutos de duración, y luego se volvía al nivel de irradiancia inicial. Este procedimiento se repitió tres veces más, intercalando periodos de oscuridad de 30, 60 y 120 minutos. De forma previa a cualquier medida, los individuos permanecieron 60 minutos bajo el nivel de irradiancia de medida, al objeto de que todos los individuos empleados se encontrasen en la misma situación de partida. Se consideró que se había alcanzado el estado estacionario en la respuesta fotosintética cuando, una vez alcanzado el máximo según un ajuste sigmoideal de los datos experimentales (tasa instantánea de fotosíntesis neta vs. tiempo), el coeficiente de variación, para una ventana de cinco minutos, se mantuvo por debajo del 5% durante un mínimo de cinco minutos.

Al igual que en el primer experimento de este capítulo, se procedió al ajuste de los datos experimentales registrados a una curva sigmoideal, al objeto de conocer el valor máximo alcanzado por la respuesta fotosintética. Del mismo modo, se calcularon los promedios registrados durante el periodo de oscuridad conocida la duración del periodo de oscuridad en cada caso, y los tres parámetros temporales previamente descritos ( $T_{\text{maxsig}}$ ,  $T_{\text{tau}}$  y  $T_{\text{ss}}$ ) sobre los valores de las tasas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua registradas en paralelo, así como sobre el ratio entre las tasas instantáneas de ambas variables. Para estos cálculos, y para el cálculo del resto de variables de este experimento, se consideraron únicamente 25 minutos del total de tiempo registrado en cada caso, que varió en función del tiempo que necesitó cada individuo para alcanzar de nuevo el estado estacionario. Este periodo de tiempo comprendió los últimos cinco minutos del periodo de oscuridad aplicado en cada caso, y los siguientes 20 minutos registrados, en los que cuales queda constancia de la

transición experimentada al pasar de completa oscuridad al nivel de irradiancia constante previsto en el diseño del experimento.

Por otro lado, y de nuevo como en el primer experimento, se calculó la dosis de irradiancia suministrada (en  $\text{J m}^{-2}$ ), la cantidad de C fijado en cada caso (en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}$ ) y la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática al agua (en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}$ ), y a partir de estos tres datos, se calculó el ratio entre la cantidad de C fijado y la dosis de irradiancia recibida (expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ J}^{-1}$ ) y el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida (expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ).

### V.2.2. Tratamiento estadístico de los datos.

En el primero de los experimentos, para los parámetros temporales calculados a partir de las distintas curvas fotoperiodo, la tasa promedio registrada en oscuridad y los máximos teóricos de cada curva, la existencia de diferencias significativas entre especies, tratamientos de luz y los distintos momentos del tiempo se evaluó mediante un GLM (*General Linear Model*) seguido de un test *post-hoc* de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*). De forma previa, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de homogeneidad de las varianzas de Cochran, respectivamente. En caso de que los datos no cumplieren alguno de ellos, se procedió a la transformación de los datos.

En el tercer experimento, para las mismas variables, se evaluó de forma similar la existencia de diferencias significativas entre especies, tratamientos de irradiancia y las distintas duraciones de los periodos de oscuridad interpuestos, pero no entre distintos momentos del tiempo, al considerar únicamente el conjunto de datos registrado en el momento final del experimento. Ello se debió a que, al considerar el conjunto global de datos registrados, se comprobó *a priori* que en el momento inicial las diferencias debidas a la duración de los periodos de oscuridad no eran tan evidentes como al final del experimento y que, en este sentido, el efecto del tiempo de incubación fue similar al hallado en anteriores ocasiones, en las que se produjo una magnificación de los efectos derivados de la aplicación de los tratamientos. Por ello, para simplificar los análisis y centrarnos en esos efectos “ampliados”, se optó por considerar únicamente los datos registrados en el momento final del experimento.

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los parámetros temporales estudiados y las variables registradas en el primer experimento, considerando el conjunto de datos obtenidos en cada caso a nivel global, y a nivel de especie, de tratamiento de luz, y para cada combinación de especies y tratamientos, pares de conjuntos de datos (normales y homocedásticos) se compararon a través de un test *t* de Student. En caso de no cumplirse los requisitos de normalidad y homocedasticidad, ni siquiera transformando los datos originales, se realizó el ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de un test *a posteriori* para la detección de diferencias significativas (*Multiple comparison of mean ranks for all groups*).

Finalmente, en lo referente a la dosis de irradiancia suministrada, la cantidad de C fijado, la cantidad de agua perdida vía conductancia estomática, y la cantidad de C fijado en relación con la dosis suministrada y la cantidad de agua perdida, calculadas en los tres experimentos, la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de irradiancia y entre distintos momentos del tiempo se evaluó como en casos anteriores, mediante un GLM seguido del test *post hoc* de Tukey HSD. En el caso del tercer experimento, los análisis también evaluaron la existencia de diferencias significativas derivadas de la aplicación de periodos de oscuridad de distinta duración.

Para todos los análisis estadísticos se empleó el programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 1984-2004). El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95%.

### V.3. Resultados.

#### V.3.1. Curvas “fotoperiodo”.

Los datos experimentales registrados durante la realización de las curvas “fotoperiodo” sirvieron, en primer lugar, para conocer la dinámica temporal de tres de las variables registradas (la tasa instantánea de fotosíntesis neta, la de conductancia estomática al agua y el ratio entre ambas, **Figura V.1**) mediante el cálculo de los parámetros temporales que se detallan en la **Sección V.2.1.1** de este capítulo. Así, para cada una de esa variables, se calculó la tasa promedio registrada durante el periodo de oscuridad, el valor más cercano al máximo obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal, y las constantes temporales, que describen el tiempo que transcurre *i*, desde el encendido hasta que se produce el 63% del total del cambio ( $T_{\text{tau}}$ ),

*ii*, hasta que se alcanza el máximo calculado ( $T_{\text{maxsig}}$ ) y *iii*, hasta que se alcanza el estado estacionario en la respuesta de esa variable ( $T_{\text{ss}}$ ).

Los análisis estadísticos realizados sobre los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de luz y entre momentos del tiempo, según la variable considerada en cada caso.

#### *V.3.1.1. Tasa instantánea de fotosíntesis neta.*

En el caso de la respiración en oscuridad promedio registrada, se hallaron únicamente diferencias significativas entre especies (**Tabla V.2**). Los valores más negativos se registraron en la especie *A. pinsapo*. Con el tiempo tuvo lugar, al principio, un ligero descenso de las tasas, produciéndose después un incremento más o menos notable, especialmente en el tratamiento de alta irradiancia. En lo que respecta al máximo de cada curva, los análisis únicamente hallaron diferencias significativas con el paso del tiempo (**Tabla V.2**), produciéndose un notable descenso en todos los casos (**Figura V.2A**).

En lo que respecta a la dinámica temporal de esta variable, es de destacar que  $T_{\text{tau}}$  fue siempre inferior a  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$ , mostrando estos dos últimos valores similares (**Tabla V.5**). En el caso de  $T_{\text{tau}}$ , los análisis revelaron la existencia de diferencias entre especies y entre los distintos momentos del tiempo. Los mayores valores de este parámetro se registraron en *A. alba* y en los individuos adscritos al tratamiento de baja irradiancia. Con el tiempo, tuvo lugar un descenso en los valores registrados, especialmente en *A. alba*.

Para el parámetro  $T_{\text{maxsig}}$ , los análisis pusieron de manifiesto la existencia de diferencias para los efectos “especie” y “especie x tiempo de incubación”. Los mayores valores de este parámetro se hallaron en la especie *A. alba*. En esta especie, con el tiempo, los valores registrados se incrementaron al aumentar el tiempo de incubación (**Tabla V.2**). En *A. pinsapo*, sin embargo, los valores registrados se mantuvieron prácticamente constantes en el tratamiento de alta irradiancia, y decrecieron en el tratamiento a baja irradiancia (**Tabla V.5**). En el caso de  $T_{\text{ss}}$ , se hallaron diferencias significativas entre especies y entre los distintos momentos del tiempo (**Tabla V.2**). Los mayores valores se registraron en *A. alba*.

### V.3.1.2. Tasa instantánea de conductancia estomática al agua.

Para el caso de la tasa promedio de conductancia estomática al agua registrada durante el periodo de oscuridad, se hallaron diferencias debidas a los efectos “especie” y “especie x tiempo de incubación”. Los mayores valores se registraron en individuos de *A. pinsapo*. Con el tiempo, estos valores tendieron a aumentar ligeramente en valores promedio esta especie, y a disminuir en el caso de *A. alba*. Respecto a la tasa máxima característica de cada curva realizada, los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas debidas a los factores “especie”, “tiempo de incubación” y a la interacción entre ambos (**Tabla V.3**). Los mayores valores se obtuvieron en curvas realizadas en individuos de *A. pinsapo*. Con el tiempo, tuvo lugar un descenso significativo de estos valores (**Figura V.2**).

Respecto al parámetro  $T_{\text{tau}}$ , los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas ligadas a los efectos “especie” y “tiempo de incubación”, y a la interacción entre ambos (**Tabla V.3**). Los mayores valores se registraron en *A. alba*; con el tiempo, los valores registrados para este parámetro disminuyeron salvo en los individuos de *A. alba* a alta irradiancia (**Tabla V.6**). En el caso de  $T_{\text{maxsig}}$ , se hallaron diferencias derivadas de las interacciones “especie x tiempo de incubación”, “tratamiento de luz x tiempo de incubación” y “especie x tratamiento de luz x tiempo de incubación” (**Tabla V.3**). En *A. pinsapo*, este parámetro tuvo un comportamiento similar en ambos tratamientos de luz, produciéndose un descenso progresivo en los valores registrados con el paso del tiempo. Sin embargo, en *A. alba*, se produjo un incremento en los valores registrados en alta irradiancia, y un descenso en el tratamiento de baja irradiancia (**Tabla V.6**).

Por último, en el caso de  $T_{\text{ss}}$ , se hallaron diferencias únicamente debidas a los efectos “especie” y “tiempo de incubación” (**Tabla V.3**). Los mayores valores se registraron en *A. alba*; con el tiempo, se produjo un descenso de los valores registrados, salvo en individuos de *A. pinsapo* sometidos a baja irradiancia (**Tabla V.6**).

### V.3.1.3. Ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua.

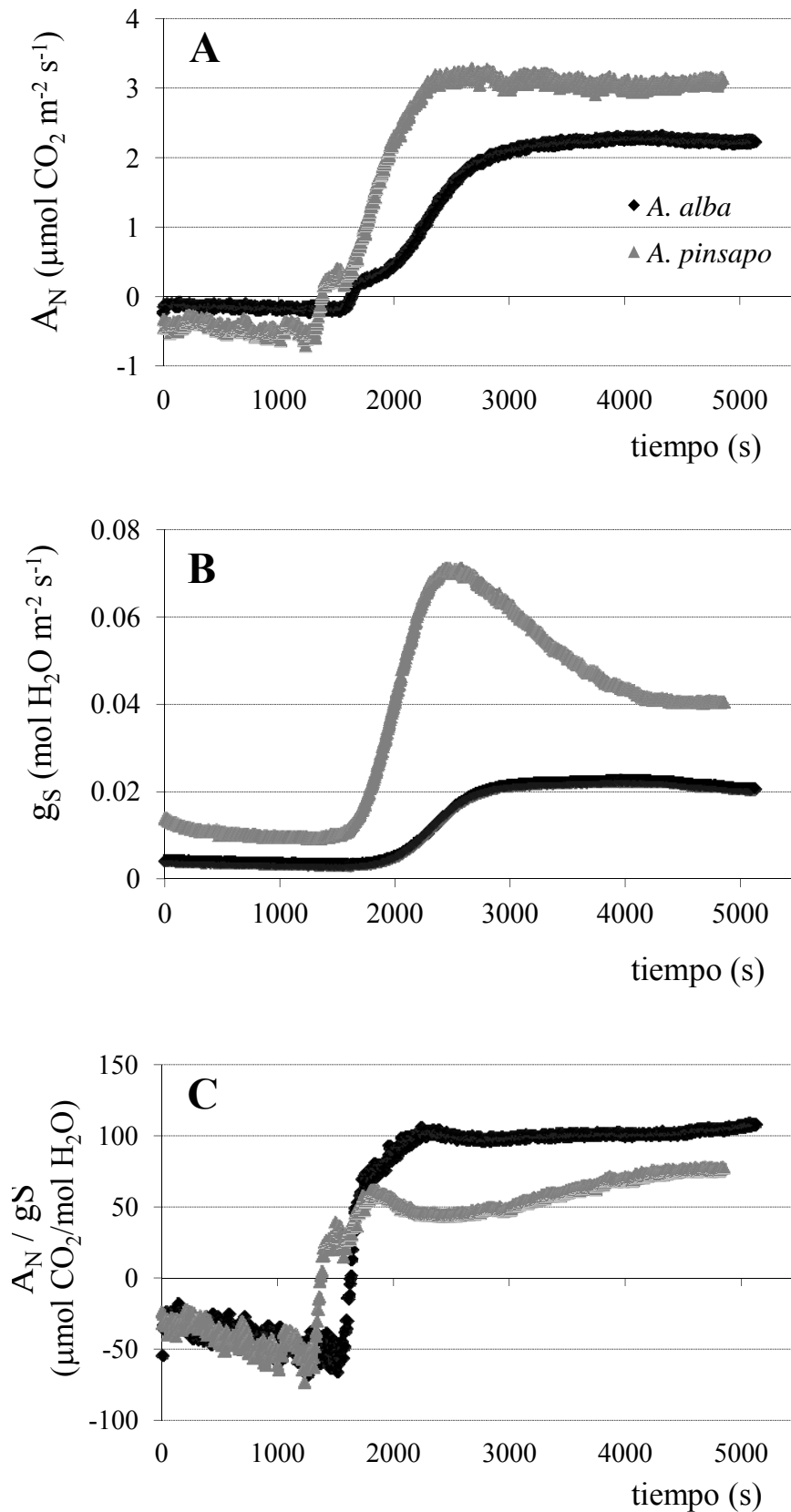
En el caso de los valores promedios registrados para este ratio durante el periodo de oscuridad, los análisis no hallaron diferencias significativas para ninguno de los efectos considerados. Sin embargo, para el valor máximo característico de cada curva, se

hallaron diferencias significativas ligadas a los efectos “especie”, “tiempo de incubación” y “tratamiento de luz x tiempo de incubación” (**Tabla V.4**). Los mayores valores se registraron en los individuos de *A. alba*. Con el tiempo, se produjo un incremento en promedio de los valores registrados, especialmente notable en el tratamiento a baja irradiancia (**Figura V.2**).

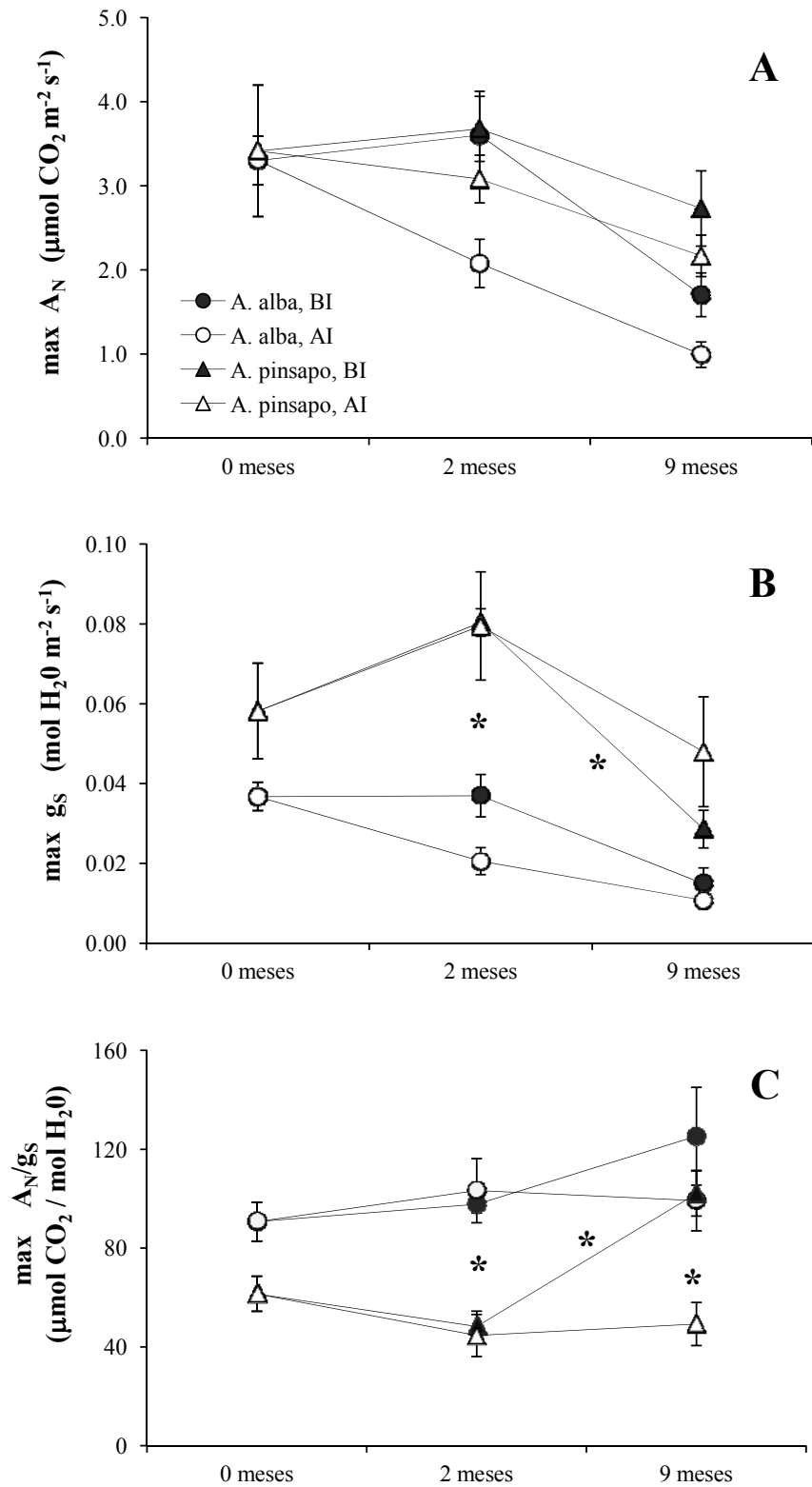
Respecto al parámetro  $T_{\text{tau}}$ , los análisis pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas únicamente ligadas al paso del tiempo (**Tabla V.4**). En el caso de  $T_{\text{maxsig}}$ , se hallaron diferencias significativas entre especies, con los mayores valores registrados en *A. alba*, y entre los distintos momentos del tiempo, produciéndose un incremento progresivo de los valores registrados (**Tablas V.4 y V.7**). Finalmente, para  $T_{\text{ss}}$ , los análisis también hallaron diferencias únicamente ligadas al paso del tiempo (**Tabla V.4**). La evolución temporal experimentada en el tratamiento a baja irradiancia fue parecida en ambas especies, mostrándose un comportamiento completamente distinto en el tratamiento de alta irradiancia (**Tabla V.7**).

Los valores mostrados en las **Tablas V.5, V.6 y V.7** no muestran tendencias claras de variación de los parámetros temporales, por lo que no resulta fácil explicar el conjunto total de diferencias significativas halladas para cada una de las tres variables relacionadas con el intercambio gaseoso. Por ello, se optó por extraer la información más relevante mediante un análisis global de estos parámetros y variables, del que emergieron ciertos patrones básicos.

Los análisis estadísticos realizados para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los distintos parámetros temporales estudiados, o entre las variables estudiadas, a nivel global, arrojaron los resultados que se recogen en las **Tablas V.8 y V.9**. En el caso del análisis efectuado por variables,  $T_{\text{tau}}$  fue significativamente inferior a  $T_{\text{ss}}$  y a  $T_{\text{maxsig}}$  en todos los casos (**Tabla V.8**), lo que significa que siempre se produjo en primer lugar un cambio brusco en los valores de la variable registrada, produciéndose en un menor espacio de tiempo el 63% del cambio total. En cambio, el tiempo necesario para que cada variable estudiada se estabilizase o alcanzase su máximo fue significativamente mayor. Además, tanto para la conductancia estomática al agua como para el ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis y de conductancia,  $T_{\text{ss}}$  fue significativamente mayor que  $T_{\text{maxsig}}$ , lo que significa que, para estas variables, se alcanzó el máximo en un tiempo significativamente inferior al necesario para alcanzar el estado estacionario. Sin embargo, estas diferencias no aparecieron ni en el caso de la fotosíntesis neta ni para el conjunto global de las tres variables estudiadas.



**Figura V.1.** Ejemplo de curvas “fotoperiodo” realizadas en el experimento, sobre dos individuos de ambas especies. De arriba abajo, se muestra el registro temporal de las variables consideradas: la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ ), la de conductancia estomática al agua ( $g_S$ ) y el ratio entre ambas.



**Figura V.2.** Evolución temporal de los valores máximos registrados para las variables fotosíntesis neta (A), conductancia estomática al agua (B), y para el ratio entre ambas (C), en individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos de irradiancia. Las barras de error representan el error estándar (n = 3 - 5). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo, entre especies o entre tratamientos de irradiancia.

**Tabla V.2.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de luz previstos en el experimento y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables el promedio de respiración en oscuridad registrado ( $R_d$ ), el valor máximo de respuesta fotosintética obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal (“max”), y los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\max\text{sig}}$  y  $T_{ss}$  (ver explicación en el texto) calculados para las curvas “fotoperiodo” realizadas en individuos de ambas especies (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	$R_d$	max	$T_{\tau}$	$T_{\max\text{sig}}$	$T_{ss}$
Especie	4.45 (1)	3.96 (1)	9.85 (1)	8.65 (1)	13.52 (1)
	<b>0.041*</b>	0.054	<b>0.033*</b>	<b>0.006*</b>	<b>0.001*</b>
Tratamiento de luz	2.75 (1)	3.71 (1)	4.20 (1)	0.15 (1)	0.40 (1)
	0.106	0.062	<b>0.048</b>	0.697	0.530
Tiempo de incubación	3.32 (2)	9.08 (2)	20.10 (2)	1.29 (2)	5.55 (2)
	<b>0.047</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.000*</b>	0.287	<b>0.008*</b>
Especie x tratamiento de luz	0.46 (1)	0.37 (1)	2.55 (1)	1.24 (1)	2.75 (1)
	0.502	0.545	0.120	0.272	0.106
Especie x tiempo de incubación	0.20 (2)	0.97 (2)	7.86 (2)	3.99 (2)	1.09 (2)
	0.822	0.389	<b>0.001*</b>	<b>0.027*</b>	0.347
Tratamiento de luz x tiempo de incubación	1.87 (2)	1.22 (2)	1.30 (2)	2.05 (2)	0.11 (2)
	0.168	0.308	0.284	0.143	0.893
Especie x tratamiento de luz x tiempo de incubación	0.32 (2)	0.24 (2)	0.71 (2)	0.46 (2)	1.53 (2)
	0.728	0.786	0.496	0.636	0.230

**Tabla V.3.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de luz previstos en el experimento y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables el promedio de conductancia estomática al agua registrado durante el periodo de oscuridad (“dark”), el valor máximo de conductancia estomática obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal (“max”), y los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\max\text{sig}}$  y  $T_{ss}$  calculados para las curvas “fotoperiodo” realizadas en individuos de ambas especies (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	dark	max	$T_{\tau}$	$T_{\max\text{sig}}$	$T_{ss}$
Especie	21.40 (1)	49.07 (1)	5.09 (1)	2.69 (1)	8.35 (1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.030*</b>	0.110	<b>0.006*</b>
Tratamiento de luz	0.32 (1)	0.01 (1)	1.79 (1)	3.23 (1)	0.02 (1)
	0.577	0.943	0.189	0.081	0.900
Tiempo de incubación	0.84 (2)	12.60 (2)	8.90 (2)	1.74 (2)	30.16 (2)
	0.441	<b>0.000*</b>	<b>0.001*</b>	0.189	<b>0.000*</b>
Especie x tratamiento de luz	3.82 (1)	1.95 (1)	0.70 (1)	0.25 (1)	2.34 (1)
	0.058*	0.171	0.407	0.621	0.135
Especie x tiempo de incubación	3.59 (2)	4.01 (2)	4.00 (2)	3.96 (2)	1.26 (2)
	<b>0.038*</b>	<b>0.027*</b>	<b>0.027*</b>	<b>0.028*</b>	0.297
Tratamiento de luz x tiempo de incubación	0.09 (2)	0.91 (2)	0.59 (2)	4.23 (2)	0.73 (2)
	0.913	0.410	0.561	<b>0.022*</b>	0.491
Especie x tratamiento de luz x tiempo de incubación	1.30 (2)	0.59 (2)	3.09 (2)	3.76 (2)	2.44 (2)
	0.286	0.559	0.057*	<b>0.033*</b>	0.101

**Tabla V.4.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de luz previstos en el experimento y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables el promedio registrado durante el periodo de oscuridad para el ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y conductancia estomática al agua (“dark”), el valor máximo de este ratio obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal (“max”), y los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$  calculados para las curvas “fotoperiodo” realizadas en individuos de ambas especies (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	dark	max	$T_{\tau}$	$T_{\text{maxsig}}$	$T_{\text{ss}}$
Especie	3.59 (1)	52.76 (1)	0.55 (1)	7.88 (1)	0.95 (1)
	0.066	<b>0.000*</b>	0.463	<b>0.008*</b>	0.337
Tratamiento de luz	1.31 (1)	5.44 (1)	0.30 (1)	0.08 (1)	0.04 (1)
	0.259	<b>0.025</b>	0.590	0.773	0.837
Tiempo de incubación	1.16 (2)	5.05 (2)	3.86 (2)	4.11 (2)	4.34 (2)
	0.324	<b>0.011*</b>	<b>0.030*</b>	<b>0.025*</b>	<b>0.020*</b>
Especie x tratamiento de luz	2.75 (1)	1.19 (1)	0.00 (1)	0.06 (1)	2.41 (1)
	0.106	0.283	0.980	0.808	0.129
Especie x tiempo de incubación	3.13 (2)	1.87 (2)	0.74 (2)	0.67 (2)	0.72 (2)
	0.055*	0.169	0.486	0.517	0.493
Tratamiento de luz x tiempo de incubación	0.76 (2)	5.46 (2)	0.12 (2)	0.02 (2)	0.02 (2)
	0.475	<b>0.008*</b>	0.889	0.977	0.980
Especie x tratamiento de luz x tiempo de incubación	1.48 (2)	0.51 (2)	1.06 (2)	1.08 (2)	0.92 (2)
	0.240	0.604	0.358	0.350	0.409

**Tabla V.5.** Valores promedio de los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$  calculados para la tasa instantánea de **fotosíntesis neta** registrada en los momentos inicial y final del experimento.

Especie e irradiancia	tiempo	$T_{\tau}$	$T_{\text{maxsig}}$	$T_{\text{ss}}$
<i>A. alba</i> , baja irradiancia	inicial	593	1408	1416
	final	350	1762	1220
<i>A. alba</i> , alta irradiancia	inicial	593	1408	1416
	final	292	1723	1789
<i>A. pinsapo</i> , baja irradiancia	inicial	451	1492	1261
	final	478	1014	1293
<i>A. pinsapo</i> , alta irradiancia	inicial	451	1492	1261
	final	271	1534	1092

**Tabla V.6.** Valores promedio de los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$  calculados para la tasa instantánea de **conductancia estomática** el agua registrada en los momentos inicial y final del experimento.

Especie e irradiancia	tiempo	$T_{\tau}$	$T_{\text{maxsig}}$	$T_{\text{ss}}$
<i>A. alba</i> , baja irradiancia	inicial	728	1025	1453
	final	563	632	1148
<i>A. alba</i> , alta irradiancia	inicial	728	1025	1453
	final	906	2282	1293
<i>A. pinsapo</i> , baja irradiancia	inicial	795	1494	1310
	final	628	767	1338
<i>A. pinsapo</i> , alta irradiancia	inicial	795	1494	1310
	final	539	1174	1027

**Tabla V.7.** Valores promedio de los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$  calculados para el **ratio** entre la tasa instantánea de fotosíntesis neta y la tasa instantánea de conductancia estomática al agua, registradas en los momentos inicial y final del experimento.

<b>Especie e irradiancia</b>	<b>tiempo</b>	<b><math>T_{\tau}</math></b>	<b><math>T_{\text{maxsig}}</math></b>	<b><math>T_{\text{ss}}</math></b>
<i>A. alba</i> , baja irradiancia	inicial	168	842	1102
	final	201	1804	923
<i>A. alba</i> , alta irradiancia	inicial	168	842	1102
	final	180	1426	1541
<i>A. pinsapo</i> , baja irradiancia	inicial	169	547	1250
	final	163	1001	1081
<i>A. pinsapo</i> , alta irradiancia	inicial	169	547	1250
	final	212	1205	911

**Tabla V.8.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los parámetros temporales calculados, considerando en cada caso como variables, el conjunto de datos obtenidos para cada parámetro en cada una de estas variables: la tasa instantánea de fotosíntesis neta ( $A_N$ ), la tasa instantánea de conductancia estomática al agua ( $g_s$ ), y el ratio entre ambas tasas ( $A_N/g_s$ ) (se realizó un test-t para cada variable y para el conjunto de todas ellas (“global”). Los parámetros se encuentran ordenados de mayor a menor en función de los valores medios registrados en cada uno de ellos. Para cada variable se muestra la existencia de diferencias significativas entre los distintos parámetros calculados, empleando letras distintas. El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95% ( $p < 0.05$ ).

<b>variable</b>	<b>parámetros</b>		
	$T_{\text{ss}}$	$T_{\text{maxsig}}$	$T_{\tau}$
$A_N$	a	a	b
$g_s$	a	b	c
$A_N/g_s$	a	b	c
global	a	a	b

#### V.3.1.4. Análisis global de los parámetros temporales.

En el caso del análisis efectuado por parámetros (**Tabla V.9**), los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre los tiempos registrados para las distintas variables. Así, para los tres parámetros estudiados, los tiempos registrados en el caso del ratio  $A_N/g_s$  fueron siempre significativamente inferiores a los registrados en los casos de  $A_N$  y de  $g_s$ . Esto indica que, para estas últimas variables, el tiempo promedio necesario tanto para el cambio brusco inicial como para la estabilización y maximización de cada función, fue significativamente superior al tiempo necesario en el caso del ratio entre ambas variables. Por otro lado, además, en los casos de  $T_{\text{maxsig}}$  y de  $T_{\tau}$  se hallaron diferencias entre los tiempos registrados para la fotosíntesis neta y la conductancia estomática al agua. En el caso de  $T_{\text{maxsig}}$ , el tiempo promedio registrado en

el caso de la fotosíntesis fue el mayor, lo que indica que esta variable es, de las tres estudiadas, la que más tiempo requiere para alcanzar su máximo. En el caso de  $T_{\text{tau}}$ , el tiempo promedio registrado en el caso de la conductancia estomática fue el mayor, lo que indica que esta variable es la que presenta una mayor inercia, al necesitar más tiempo para experimentar el 63% del cambio. En el caso de  $T_{\text{ss}}$ , como al considerar los tres parámetros calculados conjuntamente (“global”), el hecho de que no existan diferencias entre la tasa de fotosíntesis neta y la de conductancia, indica que ambas variables no difieren en cuanto al tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario.

**Tabla V.9.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre las variables relacionadas con el intercambio gaseoso registradas, considerando en cada caso como variables, el conjunto global de datos registrados de cada parámetro en las tres variables ( $A_N$ ,  $g_S$  y  $A_N/g_S$ ) (se realizó un test-t para cada parámetro y para el conjunto de todos ellos (“global”). Las variables se encuentran ordenadas de mayor a menor en función de los valores medios registrados en cada una de ellas. Para cada parámetro se muestra la existencia de diferencias significativas entre los tiempos registrados en las distintas variables, empleando letras distintas. El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95% ( $p < 0.05$ ).

parámetros	variables		
$T_{\text{ss}}$	a	a	b
	$g_S$	$A_N$	$A_N / g_S$
$T_{\text{maxsig}}$	a	b	c
	$A_N$	$g_S$	$A_N / g_S$
$T_{\text{tau}}$	a	b	c
	$g_S$	$A_N$	$A_N / g_S$
global	a	a	b
	$g_S$	$A_N$	$A_N / g_S$

Por otro lado, los análisis estadísticos realizados para comprobar la existencia de diferencias entre los distintos parámetros temporales considerados, o entre las variables estudiadas, a nivel de especie, de tratamiento de luz, y para cada combinación de especie y tratamiento, arrojaron los resultados que se recogen en la **Tabla V.10**. Así, en el caso de las variables estudiadas, al considerar el conjunto de valores obtenidos para  $T_{\text{ss}}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{tau}}$  en cada una de ellas (parte derecha de la tabla), es de destacar que no se hallaron nunca diferencias significativas entre la tasa instantánea de fotosíntesis neta y la de conductancia estomática al agua y que, por otro lado, el valor promedio de tiempos para ambas variables fue siempre significativamente mayor que el valor promedio obtenido para el ratio entre ambas. Esto significa que, entre la tasa instantánea de fotosíntesis neta y la de conductancia estomática, no existen diferencias en cuanto al tiempo promedio necesario para que, en cada una de ellas, tenga lugar el 63% del cambio total, se alcance el máximo o se alcance el estado estacionario, y que este

tiempo promedio siempre fue mayor, en todo caso, al tiempo promedio característico hallado para el ratio entre ambas tasas. Así, puede concluirse que la fotosíntesis neta y la conductancia estomática mostraron un comportamiento similar en términos de su capacidad de respuesta, tiempo de reacción, capacidad para alcanzar un valor máximo y estabilizarse. En el caso del ratio entre ambas tasas instantáneas, el hecho de que el tiempo promedio registrado para los tres parámetros sea significativamente inferior, indica que esta variable fue más sensible que las otras dos, en el sentido de que su dinámica temporal fue más rápida, modificándose bruscamente al principio antes ( $T_{\text{tau}}$ ) y saturándose y estabilizándose posteriormente también con mayor rapidez ( $T_{\text{maxsig}}$ ,  $T_{\text{ss}}$ ).

**Tabla V.10.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los parámetros temporales calculados y las variables relativas al intercambio gaseoso estudiadas, considerando en cada caso como variables, por un lado, el conjunto de valores obtenido de cada uno de dichos parámetros ( $T_{\text{tau}}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$ ) al medir las tres variables consideradas, y por el otro, el conjunto de valores obtenidos globalmente para los tres parámetros en cada una de las tres variables (se realizó un test-t para cada especie, para cada tratamiento de luz y para cada combinación de especie y tratamiento de luz). Tanto los parámetros como las variables se encuentran ordenados de mayor a menor en función de los valores medios registrados en cada uno de ellos. Para cada efecto se muestra la existencia de diferencias significativas entre los distintos parámetros calculados y las variables consideradas, empleando letras distintas. El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95% ( $p < 0.05$ ).

efecto	parámetros			variables		
	$T_{\text{ss}}$	$T_{\text{maxsig}}$	$T_{\text{tau}}$	$g_s$	$A_N$	$A_N/g_s$
<i>A. alba</i>	a	a	b	a	a	b
<i>A. pinsapo</i>	a	b	c	a	a	b
Baja irradiancia	a	a	b	a	a	b
Alta irradiancia	a	b	c	a	a	b
<i>A. alba</i> , baja irradiancia	a	a	b	a	a	b
<i>A. alba</i> , alta irradiancia	a	a	b	a	a	b
<i>A. pinsapo</i> , baja irradiancia	a	b	c	a	a	b
<i>A. pinsapo</i> , alta irradiancia	a	a	b	a	a	b

Desde el punto de vista de los parámetros calculados (parte izquierda de la **Tabla V.10**), es de destacar que  $T_{\text{tau}}$  fue en todos los casos significativamente inferior a los otros dos parámetros, lo que indica que, durante la realización de las curvas, lo primero que sucede es un cambio brusco en la dinámica temporal de las variables registradas. A nivel de especie, la única diferencia hallada fue que, en *A. pinsapo*,  $T_{\text{ss}}$  fue significativamente superior a  $T_{\text{maxsig}}$ , lo que indica que los individuos de esta especie tardaron un tiempo significativamente mayor en alcanzar el estado estacionario que en alcanzar el valor máximo en cada curva. A nivel de tratamientos de luz, también  $T_{\text{ss}}$  fue

significativamente mayor a  $T_{\text{maxsig}}$  en el tratamiento a alta irradiancia. En lo que respecta a la combinación de especies y tratamientos de luz, no se hallaron diferencias salvo en el caso de “*A. pinsapo* x baja irradiancia”, en el que, de nuevo,  $T_{\text{ss}}$  fue superior a  $T_{\text{maxsig}}$ . En el resto de los casos, no se hallaron diferencias significativas entre ambos parámetros.

#### V.3.1.5. Cantidad de carbono fijado y de agua perdida.

Además de llevarse a cabo los cálculos necesarios para la obtención de estos parámetros temporales, los datos registrados durante la realización de las curvas “fotoperiodo” también se emplearon para calcular la dosis de irradiancia suministrada a los individuos del experimento durante la realización de dichas curvas, la cantidad de C que éstos individuos fueron capaces de fijar en este proceso, y la cantidad de agua que estos individuos pierden a través de la conductancia estomática al agua, tal y como ya se indicó en la **Sección V.2.1.1** de este capítulo. Con estos tres datos, se pudo hacer una estimación de la cantidad de C fijado en relación a la cantidad de irradiancia recibida y a la cantidad de agua perdida, como aproximación a la eficiencia en el uso de la luz y del agua de los individuos participantes en el experimento.

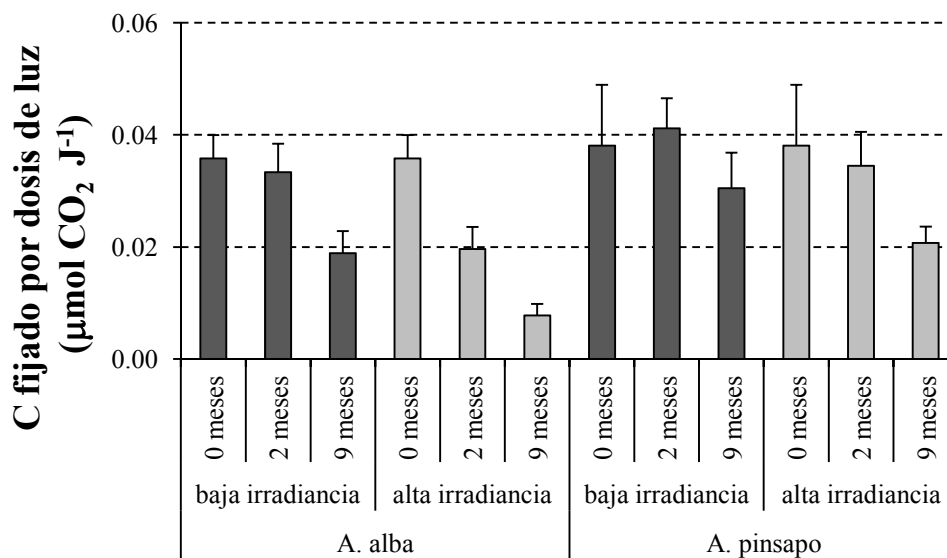
La dosis de luz suministrada a cada individuo fue similar en los tres momentos del tiempo considerados, rondando los  $2 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$ . En lo que respecta a las distintas variables calculadas, los análisis estadísticos revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de luz y/o los distintos momentos del tiempo, según la variable considerada (**Tabla V.11**). En lo que respecta a la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia recibida, se hallaron diferencias entre especies y entre los distintos momentos del tiempo, pero no entre los distintos tratamientos de irradiancia de incubación (**Tabla V.11**). Los mayores valores del ratio se hallaron en *A. pinsapo*; al incrementarse el tiempo de incubación, se produjo una disminución de los valores registrados (**Figura V.3**).

En el caso de la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática, se hallaron igualmente diferencias entre especies y entre momentos del tiempo, además de otros efectos (**Tabla V.11**). Esta cantidad de agua, siempre superior en *A. pinsapo*, disminuyó con el paso del tiempo (**Figura V.4**). Para el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida, se hallaron únicamente diferencias significativas entre especies, además de para el efecto “tiempo de incubación x tratamiento de

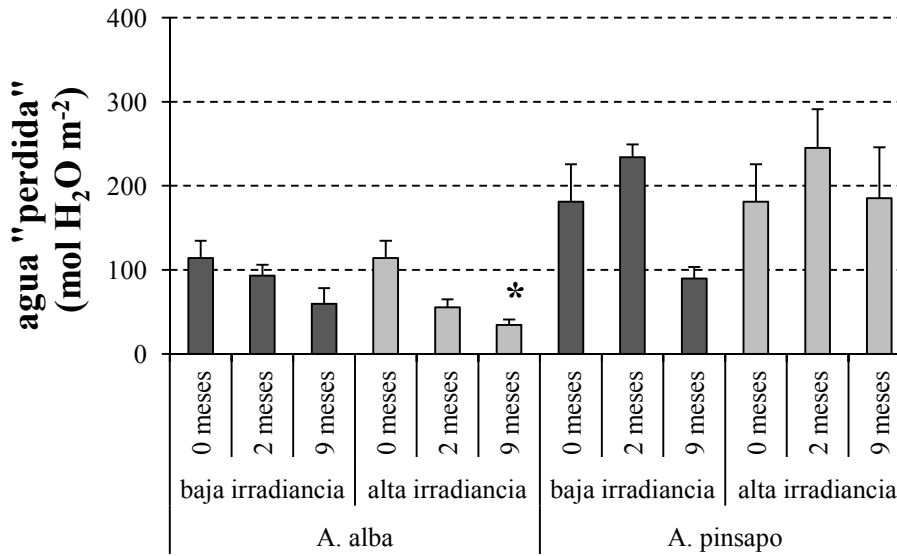
irradiancia” (Tabla V.11). Los mayores valores de este ratio se hallaron en *A. alba*; con el paso del tiempo, los valores registrados disminuyeron en el tratamiento de alta irradiancia, y aumentaron en baja irradiancia (Figura V.5).

**Tabla V.11.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de luz previstos en el experimento y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables la cantidad de C fijado por estos individuos en ese proceso (“C fijado”), la cantidad de agua perdida vía conductancia estomática al agua (“agua perdida”) y el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida simultáneamente (“C fijado por agua”) (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

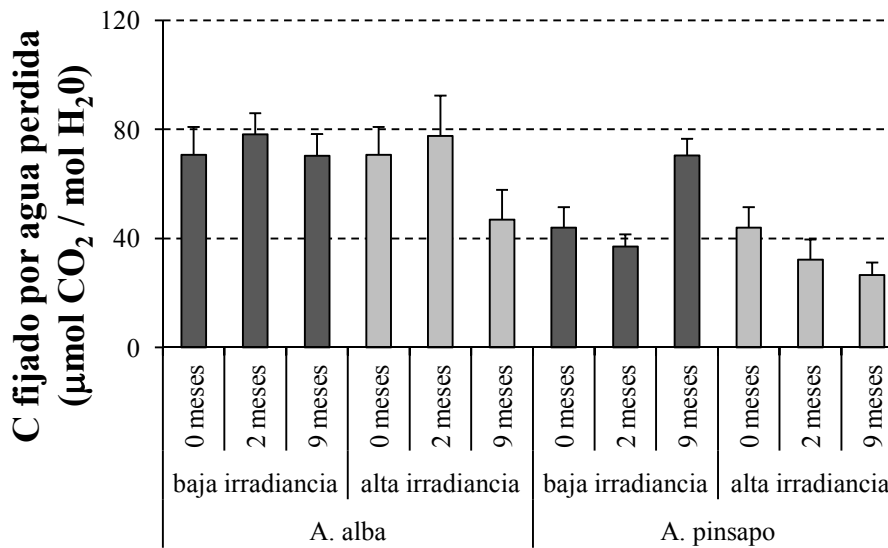
efecto	C fijado por dosis	agua perdida	C fijado por agua
Especie	4.52 (1) <b>0.040*</b>	50.30 (1) <b>0.000*</b>	24.36 (1) <b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia	2.88 (1) 0.098	0.19 (1) 0.669	5.01 (1) <b>0.031</b>
Tiempo de incubación	6.55 (2) <b>0.004*</b>	9.69 (2) <b>0.000*</b>	0.17 (2) 0.844
Especie x tratamiento de irradiancia	0.12 (1) 0.732	5.15 (1) <b>0.029*</b>	0.58 (1) 0.452
Especie x tiempo de incubación	0.69 (2) 0.508	4.64 (2) <b>0.016*</b>	2.84 (2) 0.071*
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.81 (2) 0.454	0.67 (2) 0.517	3.76 (2) <b>0.033*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.07 (2) 0.931	1.88 (2) 0.167	0.32 (2) 0.725



**Figura V.3.** Evolución temporal de la cantidad de C fijado en relación con la dosis de irradiancia recibida por los individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-5). Al igual que en el caso anterior, con el paso del tiempo se produjo una notable reducción de esta variable, especialmente notable en el caso de *A. alba*.



**Figura V.4.** Evolución temporal de la cantidad de agua perdida vía conductancia estomática al agua, por parte de los individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-5). Esta cantidad de agua es notablemente superior en el caso de *A. pinsapo*, aunque en ambas especies se produjo una notable reducción con el paso del tiempo.



**Figura V.5.** Evolución temporal de la cantidad de C fijado en relación con la cantidad de agua perdida por parte de los individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-5). Este ratio fue notablemente superior en *A. alba* frente a *A. pinsapo*. Con el paso del tiempo, este parámetro se mantuvo prácticamente constante, disminuyó o aumentó en función de la especie y el tratamiento de irradiancia considerado.

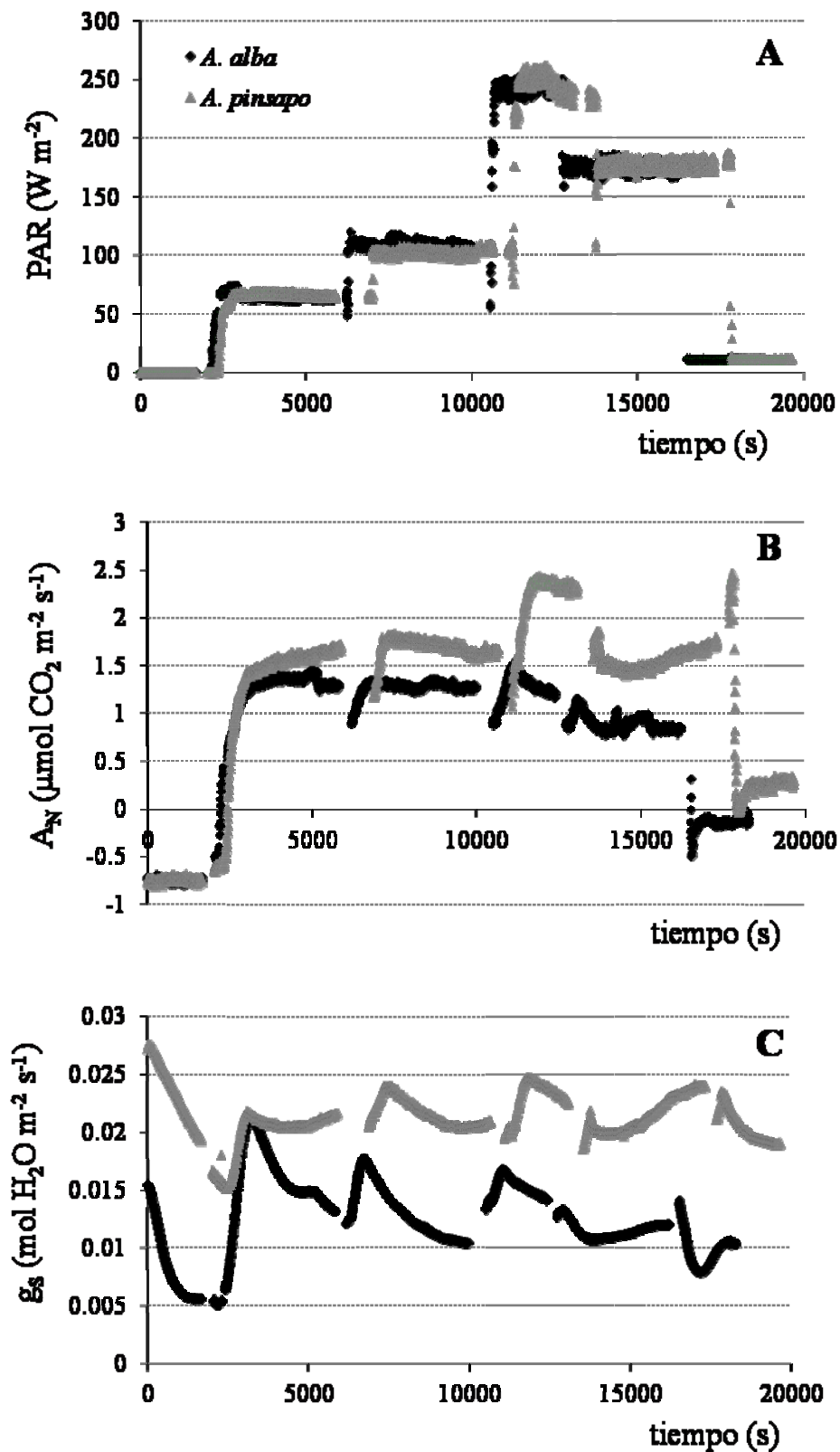
### V.3.2. Suministro de luz mediante periodos de tiempo caracterizados por distintos niveles de irradiancia.

El segundo experimento previsto consistió en suministrar a individuos de ambas especies, adscritos a distintos tratamientos de irradiancia, una cierta dosis de luz mediante la colocación de los mismos bajo diferentes niveles de irradiancia durante periodos de tiempo de duración conocida. El registro temporal de estos niveles de irradiancia, así como de las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua (**Figura V.6**), y el cálculo de nuevas variables a partir de estos datos experimentales (dosis de irradiancia recibida, cantidad de carbono fijado, carbono fijado por dosis de irradiancia, cantidad de agua “perdida” y carbono fijado por agua “perdida”) permitió investigar la existencia de diferencias entre especies y los posibles efectos derivados de la aplicación de los tratamientos de irradiancia en los distintos tiempos de incubación previstos en el experimento, respecto a las variables mencionadas. La dosis total de irradiancia recibida, calculada como la suma de la dosis suministrada a través de los distintos periodos previstos, rondó en todos los casos los  $11,4 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$ . Los análisis estadísticos llevados a cabo revelaron la existencia de diferencias entre ambas especies para las variables “C fijado por dosis”, “agua perdida” y “C fijado por agua perdida”, sin que se detectasen efectos derivados de los tratamientos de irradiancia o el tiempo de incubación (**Tabla V.12**). En el caso del carbono fijado por dosis, los mayores valores se registraron en *A. pinsapo*; con el tiempo, tuvo lugar una disminución de los valores hallados, especialmente patente en esta misma especie (**Figura V.7**). En lo que respecta a la cantidad de agua “perdida”, los mayores valores de esta variable se registraron también en *A. pinsapo* (**Figura V.8**). Por el contrario, los mayores valores del ratio “C fijado por agua perdida” se registraron en la especie *A. alba* (**Figura V.9**). No obstante, estos resultados obtenidos para la dosis total no coinciden completamente con los obtenidos cuando se consideran los distintos periodos de tiempo (las distintas dosis) registrados por separado. Así, en lo que respecta a la cantidad de C fijado por dosis, los análisis estadísticos efectuados sobre los datos registrados durante la aplicación de los distintos periodos previstos (**Tabla V.1**) pusieron de manifiesto la existencia de diferencias entre especies y entre distintos momentos del tiempo (salvo para las dosis suministradas a 500 y a 1100  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  - “dosis 500” y “dosis 1100”) pero no entre tratamientos de irradiancia (**Tabla V.13**). También se hallaron diferencias para el efecto “especie x tratamiento de

irradiancia” en los casos de “dosis 500” y “dosis 1100”. En el caso de las “dosis 0” y “dosis 50”, se registraron menores cantidades de C fijado por dosis en *A. pinsapo*; con el tiempo, se produjo un incremento en los valores registrados. En el resto de casos (“dosis 300”, “dosis 500”, “dosis 1100” y “dosis 800”), el comportamiento experimentado por esta variable fue similar al demostrado al considerarse la dosis total de irradiancia recibida: los mayores valores de este ratio se registraron en la especie *A. pinsapo* (**Figura V.7**); al incrementarse el tiempo de incubación, tuvo lugar un descenso significativo de la cantidad de C fijado por dosis. En lo que respecta a la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática, los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies en todos los casos (**Tabla V.14**), con los mayores valores registrados siempre en *A. pinsapo* (**Figura V.10B**). También se hallaron diferencias significativas entre distintos momentos del tiempo para “dosis 300”, produciéndose una reducción de la cantidad de agua perdida al incrementarse el tiempo de incubación. Finalmente, en lo que respecta al ratio “C fijado por agua perdida”, los análisis pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre especies y entre distintos momentos del tiempo, sólo en los casos de “dosis 300” y “dosis 800” (**Tabla V.15**). Los mayores valores de este ratio se registraron siempre en *A. alba*. Con el tiempo tuvo lugar un incremento significativo de los valores registrados en “dosis 300”, y una disminución en “dosis 800”. A la vista de estos resultados, puede por tanto concluirse, por un lado, que el comportamiento de los individuos de ambas especies fue similar durante el periodo de oscuridad y el suministro de la dosis de luz mediante un nivel de irradiancia de  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , registrándose por lo general tasas de respiración más negativas en el caso de *A. pinsapo*, que fueron incrementándose con el paso del tiempo. Además, se perdió una mayor cantidad de agua en dicha especie en ambos casos. Por otro lado, puede también concluirse que el comportamiento registrado para el resto de dosis de luz (suministradas mediante irradiancias de 300, 500, 800 y  $1100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fue asimismo similar al comportamiento registrado al considerar la dosis total de luz recibida en su conjunto. En este sentido, es de destacar el hecho de que no se hallasen, por lo general, diferencias derivadas de la incubación a los dos tratamientos de irradiancia previstos en el experimento. Para el ratio “C fijado por dosis”, se hallaron diferencias entre especies (los mayores valores siempre en *A. pinsapo*) y entre los distintos momentos del tiempo, produciéndose en todos los casos una disminución con el paso del tiempo, especialmente significativa en el caso de la especie mencionada. En lo que respecta a la

cantidad de agua “perdida”, se hallaron por lo general diferencias únicamente entre especies, siendo esta cantidad significativamente menor en *A. alba*. La variable para la que se hallaron resultados más heterogéneos fue “C fijado por agua perdida”, dado que en las distintas situaciones o bien no se hallaron diferencias *a priori*, o se hallaron entre especies o entre especies y entre los distintos momentos del tiempo. No obstante, es de destacar la existencia, consistentemente, de diferencias significativas entre ambas especies, dándose los mayores valores de este ratio en *A. alba*, que fue la especie que mostró por tanto una mayor eficiencia en el uso del agua.

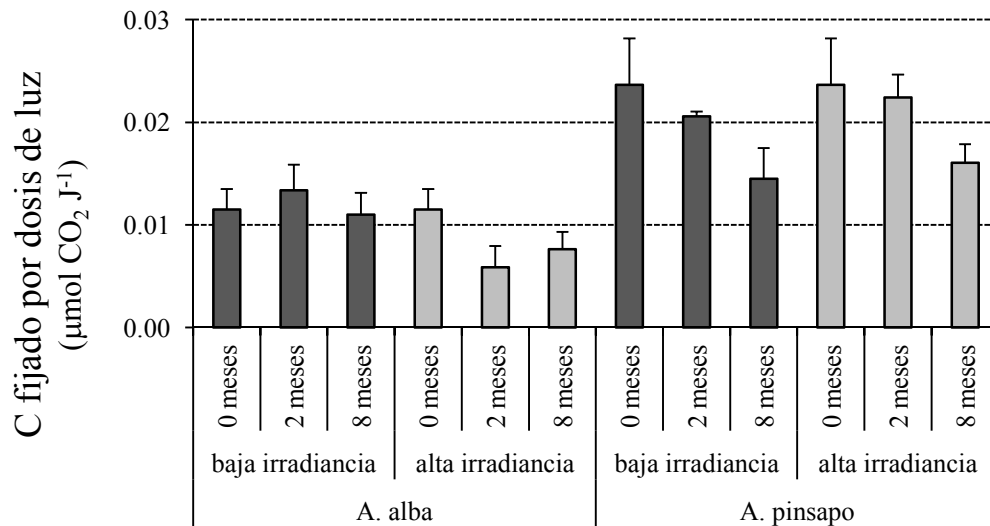
Por otro lado, la realización de análisis estadísticos sobre los datos agrupados por especies y tratamientos de irradiancia de incubación, para la detección de diferencias entre las distintas dosis de luz suministradas, pusieron de manifiesto la existencia, en todo momento, de estas diferencias en lo que respecta a las tres variables consideradas: C fijado por dosis, agua perdida y C fijado por agua perdida (**Tabla V.16**). La única excepción la constituyó la especie *A. pinsapo* en lo que respecta a la última variable mencionada, para la que no se hallaron diferencias entre las distintas dosis de luz suministradas. En lo que respecta a la cantidad de C fijado por dosis, es de destacar el hecho de que esta variable fuese, para todas las combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia, mayor en la dosis suministrada a través de un nivel de irradiancia de  $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , similar al característico del tratamiento AI (**Figura V.10A**). A medida que se fueron sucediendo los distintos periodos de irradiancia previstos, se produjo una reducción significativa de este ratio en las distintas combinaciones de especies y tratamientos de luz, salvo al pasar de  $1100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (**Figura V.10A**). Para la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática, en *A. alba*, únicamente se registraros variaciones significativas al pasar de oscuridad a luz (de 0 a  $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y al pasar de  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 50. En *A. pinsapo*, además de en estas transiciones, también se hallaron variaciones significativas al pasar de  $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 1100 y de 1100 a 800 (**Figura V.10B**). Por último, en lo que respecta a la cantidad de C fijado por agua “perdida”, la secuencia de las distintas dosis suministradas generó en *A. alba* una disminución en los valores registrados para este ratio al pasar de “dosis 500” a “dosis 1100”. En *A. pinsapo*, los valores se mantuvieron más o menos constantes hasta disminuir al pasar de “dosis 1100” a “dosis 800”. No obstante, no se hallaron diferencias significativas en ningún caso (**Figura V.10C**).



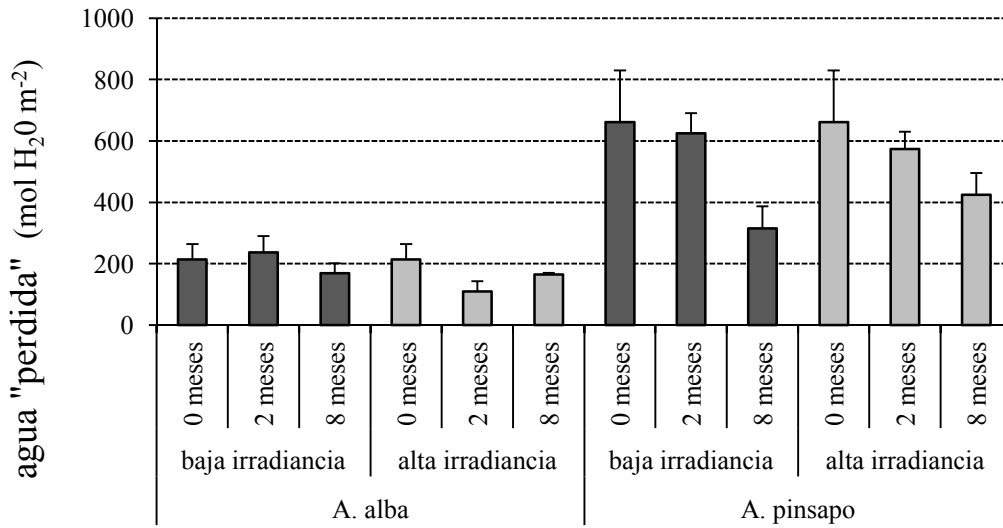
**Figura V.6.** En el segundo experimento, se suministró una cierta dosis de luz mediante distintos niveles de irradiancia en periodos de tiempo determinados (parte superior de la figura). Simultáneamente, se procedió al registro en paralelo de las tasas instantáneas de fotosíntesis y de conductancia estomática al agua (parte inferior). Como ejemplo, se muestra la respuesta obtenida en dos individuos de ambas especies participantes en el experimento.

**Tabla V.12.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de luz previstos en el experimento y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables la cantidad total de C fijado normalizada por la dosis de luz suministrada (“C fijado por dosis de luz”), la cantidad total de agua “perdida” vía conductancia estomática (“agua perdida”), y la cantidad total de C fijado en relación con la cantidad total de agua “perdida” (“C fijado por agua perdida”) durante la secuencia de periodos de irradiancia previstos en el diseño del experimento (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

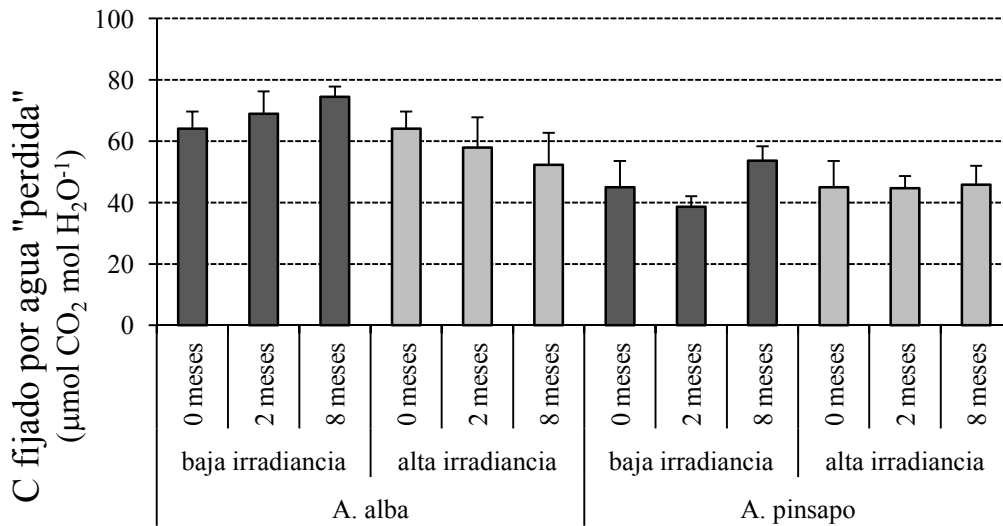
efecto	C fijado por dosis	Agua “perdida”	C fijado por agua “perdida”
Especie	47.97 (1)	69.38 (1)	24.36 (1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia	0.75 (1)	0.36 (1)	2.49 (1)
	0.394	0.551	0.125
Tiempo de incubación	4.52 (2)	2.96 (2)	0.40 (2)
	<b>0.019</b>	0.066	0.671
Especie x tratamiento de irradiancia	2.71 (1)	1.50 (1)	2.01 (1)
	0.109	0.230	0.166
Especie x tiempo de incubación	1.99 (2)	2.09 (2)	0.43 (2)
	0.154	0.141	0.653
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.33 (2)	1.95 (2)	1.60 (2)
	0.720	0.159	0.218
Especie x tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.86 (2)	0.57 (2)	0.50 (2)
	0.432	0.573	0.610



**Figura V.7.** Evolución temporal de la cantidad de C fijado en relación con la dosis de irradiancia recibida por los individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4). Este ratio, significativamente superior en *A. pinsapo*, experimentó una notable reducción con el paso del tiempo en ambas especies.



**Figura V.8.** Evolución temporal de la cantidad de agua perdida vía conductancia estomática al agua, por parte de los individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4). Esta cantidad de agua fue significativamente superior en el caso de *A. pinsapo*.



**Figura V.9.** Evolución temporal de la cantidad de C fijado en relación con la cantidad de agua perdida por parte de los individuos de ambas especies adscritos a los distintos tratamientos. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4). Este ratio fue significativamente superior en *A. alba* frente a *A. pinsapo*.

**Tabla V.13.** Resultado de los análisis estadísticos aplicados para la detección de diferencias entre los tratamientos de incubación (baja y alta irradiancia) y los distintos momentos del tiempo, considerando como variable la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia suministrada (“C fijado por dosis”) durante la aplicación de la secuencia de niveles de irradiancia prevista en el experimento. En el caso de dosis 0, se indica el resultado del análisis estadístico realizado sobre los datos de C fijado (distintos GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

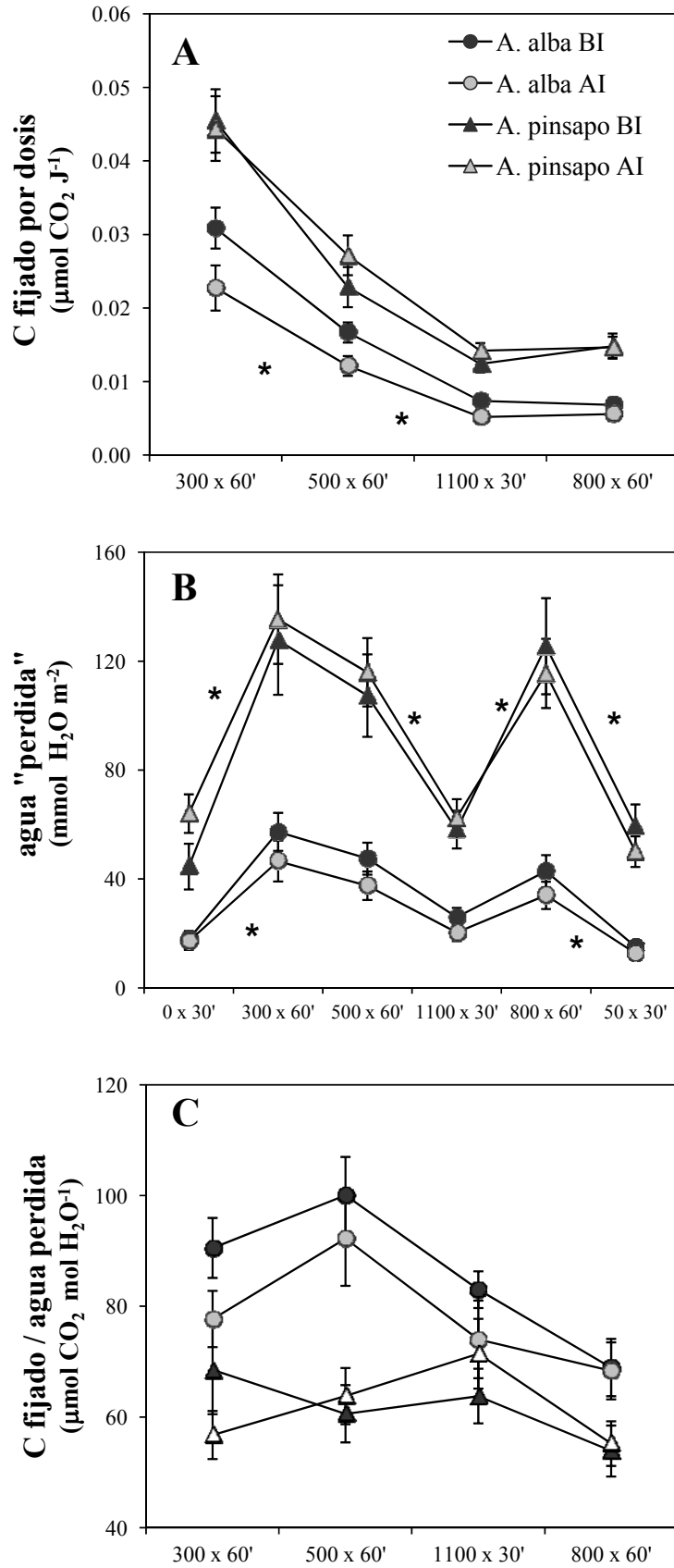
efecto	Dosis 0	Dosis 300	Dosis 500	Dosis 1100	Dosis 800	Dosis 50
Especie	5.69 (1) <b>0.023</b>	34.5 (1) <b>0.000*</b>	29.94 (1) <b>0.000*</b>	60.18 (1) <b>0.000*</b>	54.57 (1) <b>0.000*</b>	10.68 (1) <b>0.003*</b>
Tratamiento de irradiancia	0.39 (1) 0.539	2.4 (1) 0.132	0.05 (1) 0.818	0.18 (1) 0.676	0.44 (1) 0.510	0.01 (1) 0.905
Tiempo de incubación	13.84 (2) <b>0.000*</b>	5.9 (2) <b>0.007*</b>	3.22 (2) 0.053	4.55 (2) <b>0.018</b>	4.98 (2) <b>0.013*</b>	4.83 (2) <b>0.015*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	0.93 (1) 0.342	1.6 (1) 0.216	4.72 (1) <b>0.037*</b>	4.50 (1) <b>0.042*</b>	0.30 (1) 0.588	0.02 (1) 0.894
Especie x tiempo de incubación	0.69 (2) 0.509	1.8 (2) 0.187	1.99 (2) 0.152	1.61 (2) 0.216	1.70 (2) 0.199	1.28 (2) 0.292
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	2.12 (2) 0.137	0.6 (2) 0.543	0.03 (2) 0.971	0.05 (2) 0.949	1.16 (2) 0.325	0.69 (2) 0.506
Especie x tratamiento irradiancia x tiempo de incubación	3.24 (2) 0.052*	0.8 (2) 0.438	1.24 (2) 0.304	1.24 (2) 0.302	0.13 (2) 0.875	0.48 (2) 0.624

**Tabla V.14.** Resultado de los análisis estadísticos aplicados para la detección de diferencias entre los tratamientos de incubación (baja y alta irradiancia) y los distintos momentos del tiempo, considerando como variable la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática al agua (“**agua perdida**”), durante la aplicación de la secuencia de niveles de irradiancia prevista en el experimento (distintos GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	Dosis 0	Dosis 300	Dosis 500	Dosis 1100	Dosis 800	Dosis 50
Especie	60.73 (1) <b>0.000*</b>	59.46 (1) <b>0.000*</b>	54.47 (1) <b>0.000*</b>	54.19 (1) <b>0.000*</b>	71.34 (1) <b>0.000*</b>	104.65 (1) <b>0.000*</b>
Tratamiento de irradiancia	1.57 (1) 0.220	0.38 (1) 0.540	0.26 (1) 0.614	0.53 (1) 0.471	0.78 (1) 0.385	1.01 (1) 0.323
Tiempo de incubación	2.22 (2) 0.125	8.91 (2) <b>0.001*</b>	2.03 (2) 0.148	1.62 (2) 0.214	1.84 (2) 0.175	1.67 (2) 0.204
Especie x tratamiento de irradiancia	2.37 (1) 0.133	2.21 (1) 0.147	1.98 (1) 0.169	1.63 (1) 0.211	0.62 (1) 0.435	0.04 (1) 0.842
Especie x tiempo de incubación	5.28 (2) <b>0.010*</b>	2.09 (2) 0.140	1.55 (2) 0.228	1.14 (2) 0.332	2.06 (2) 0.144	1.28 (2) 0.292
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	0.41 (2) 0.664	1.47 (2) 0.244	2.21 (2) 0.126	2.06 (2) 0.144	2.75 (2) 0.079	2.60 (2) 0.090
Especie x tratamiento irradiancia x tiempo de incubación	0.59 (2) 0.562	0.74 (2) 0.485	0.61 (2) 0.548	0.65 (2) 0.529	0.30 /2) 0.742	0.34 (2) 0.714

**Tabla V.15.** Resultado de los análisis estadísticos aplicados para la detección de diferencias entre los tratamientos de incubación (baja y alta irradiancia) y los distintos momentos del tiempo, considerando como variable el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua “perdida” (“C fijado por agua perdida”), durante la aplicación de la secuencia de niveles de irradiancia prevista en el experimento (distintos GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	Dosis 0	Dosis 300	Dosis 500	Dosis 1100	Dosis 800	Dosis 50
Especie		17.97 (1) <b>0.000*</b>	28.31 (1) <b>0.000*</b>	3.46 (1) 0.072*	8.35 (1) <b>0.007*</b>	
Tratamiento de irradiancia		5.01 (1) <b>0.032*</b>	0.19 (1) 0.669	0.09 (1) 0.767	0.00 (1) 0.949	
Tiempo de incubación		6.20 (2) <b>0.005*</b>	0.34 (2) 0.713	0.92 (2) 0.410	5.31 (2) <b>0.010*</b>	
Especie x tratamiento de irradiancia		0.02 (1) 0.876	0.79 (1) 0.379	2.53 (1) 0.121	0.11 (1) 0.740	
Especie x tiempo de incubación		0.52 (2) 0.598	0.53 (2) 0.593	0.27 (2) 0.763	0.55 (2) 0.580	
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación		2.34 (2) 0.112	4.00 (2) <b>0.028</b>	2.51 (2) 0.097	0.52 (2) 0.600	
Especie x tratamiento irradiancia x tiempo de incubación		0.48 (2) 0.620	1.04 (2) 0.365	0.68 (2) 0.512	0.25 (2) 0.778	



**Figura V.10.** Promedio de la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia (A), la cantidad de agua perdida (B) y el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida (C), en individuos de ambas especies adscritos a sendos tratamientos de irradiancia en los tres momentos del tiempo considerados en el experimento. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4).

**Tabla V.16.** Resultado de los análisis estadísticos aplicados sobre los datos agrupados por combinación de especies y tratamientos de irradiancia para la detección de diferencias entre las distintas dosis de luz suministradas y los distintos momentos del tiempo, considerando como variables el ratio “C fijado por dosis” (parte superior de la tabla), la cantidad de agua “perdida” (parte central de la tabla) y el ratio entre el C fijado y la cantidad de agua perdida (parte inferior), durante la aplicación de la secuencia de niveles de irradiancia prevista en el experimento (distintos GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y los distintos tiempos de incubación, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

<b>C fijado por dosis de luz</b>				
<b>efecto</b>	<b><i>A. alba</i>, baja irradiancia</b>	<b><i>A. alba</i>, alta irradiancia</b>	<b><i>A. pinsapo</i>, baja irradiancia</b>	<b><i>A. pinsapo</i>, alta irradiancia</b>
Tiempo de incubación	0.58 (2)	9.50 (2)	6.95 (2)	7.43 (2)
	0.564	<b>0.001*</b>	<b>0.003*</b>	<b>0.002*</b>
Dosis de luz	39.52 (3)	28.00 (3)	36.48 (3)	38.12 (3)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Tiempo de incubación x dosis de luz	0.31 (6)	1.18 (6)	0.43 (6)	1.42 (6)
	0.928	0.345	0.850	0.237
<b>Agua perdida</b>				
<b>efecto</b>	<b><i>A. alba</i>, baja irradiancia</b>	<b><i>A. alba</i>, alta irradiancia</b>	<b><i>A. pinsapo</i>, baja irradiancia</b>	<b><i>A. pinsapo</i>, alta irradiancia</b>
Tiempo de incubación	2.78 (2)	8.85 (2)	16.96 (2)	7.44 (2)
	0.071	<b>0.001*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.002*</b>
Dosis de luz	12.22 (5)	8.96 (5)	11.69 (5)	12.79 (5)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Tiempo de incubación x dosis de luz	0.58 (10)	0.81 (10)	1.17 (10)	0.63 (10)
	0.825	0.617	0.332	0.783
<b>C fijado por agua perdida</b>				
<b>efecto</b>	<b><i>A. alba</i>, baja irradiancia</b>	<b><i>A. alba</i>, alta irradiancia</b>	<b><i>A. pinsapo</i>, baja irradiancia</b>	<b><i>A. pinsapo</i>, alta irradiancia</b>
Tiempo de incubación	3.83 (2)	3.04 (2)	4.21 (2)	0.07 (2)
	<b>0.031*</b>	0.064	<b>0.024*</b>	0.934
Dosis de luz	6.94 (3)	3.02 (3)	1.07 (3)	1.87 (3)
	<b>0.001*</b>	<b>0.046*</b>	0.374	0.154
Tiempo de incubación x dosis de luz	1.24 (6)	1.64 (6)	1.02 (6)	0.84 (6)
	0.311	0.173	0.433	0.548

### V.3.3. Intercalado de periodos de oscuridad de distinta duración.

#### V.3.3.1. Dinámica temporal de la fotosíntesis y de la conductancia estomática, alcance del estado estacionario y parámetros temporales.

El tercer experimento llevado a cabo consistió básicamente en la interrupción del suministro de irradiancia de un determinado nivel constante mediante la interposición de periodos de oscuridad de duración creciente. El tipo de registro de datos que se efectuó durante la realización del mismo (PAR, tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua simultáneamente), se muestra en la **Figura V.11**. A partir de estos datos, y tomando en cada caso el rango de 25 minutos que se detalla en la **Sección V.2.1.3**, se calcularon los valores promedios de fotosíntesis neta y de conductancia estomática registrados en oscuridad. A partir de estos, también se hallaron los valores instantáneos del ratio entre ambas tasas (**Figura V.12**). Por otro lado, se calcularon los valores máximos estimados mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal, y las constantes temporales que caracterizaron la respuesta de las distintas variables ( $T_{\text{tau}}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$ ), tal y como se describe en la **Sección V.2.1.1** de este capítulo (**Figura V.13**).

Los análisis estadísticos realizados sobre los resultados obtenidos en el momento final del experimento pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de luz y derivadas de la aplicación de los periodos de oscuridad de distinta duración, según la variable considerada en cada caso.

+ Tasa instantánea de fotosíntesis neta.

En el caso de la respiración en oscuridad promedio registrada, se hallaron diferencias significativas entre especies y entre tratamientos de irradiancia, pero no derivadas de la aplicación de los periodos de oscuridad (**Tabla V.17**). Los valores más negativos se registraron en la especie *A. pinsapo* y entre los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia (**Figura V.12A**). En lo que respecta al máximo de cada curva, de nuevo se hallaron únicamente diferencias entre especies y entre tratamientos de irradiancia (**Tabla V.17**). Los mayores valores máximos se hallaron en *A. pinsapo* y en los individuos sometidos a baja irradiancia (**Figura V.13A**).

En lo que respecta a los tres parámetros temporales descriptores de la dinámica temporal de la fotosíntesis, los análisis revelaron únicamente la existencia de diferencias significativas derivadas de la aplicación de los periodos de oscuridad (**Tabla V.17**). En todos los casos, a medida que se incrementó la duración de estos periodos, se produjo un incremento progresivo del valor de los mismos (**Figura V.14A**).

+ Tasa instantánea de conductancia estomática al agua.

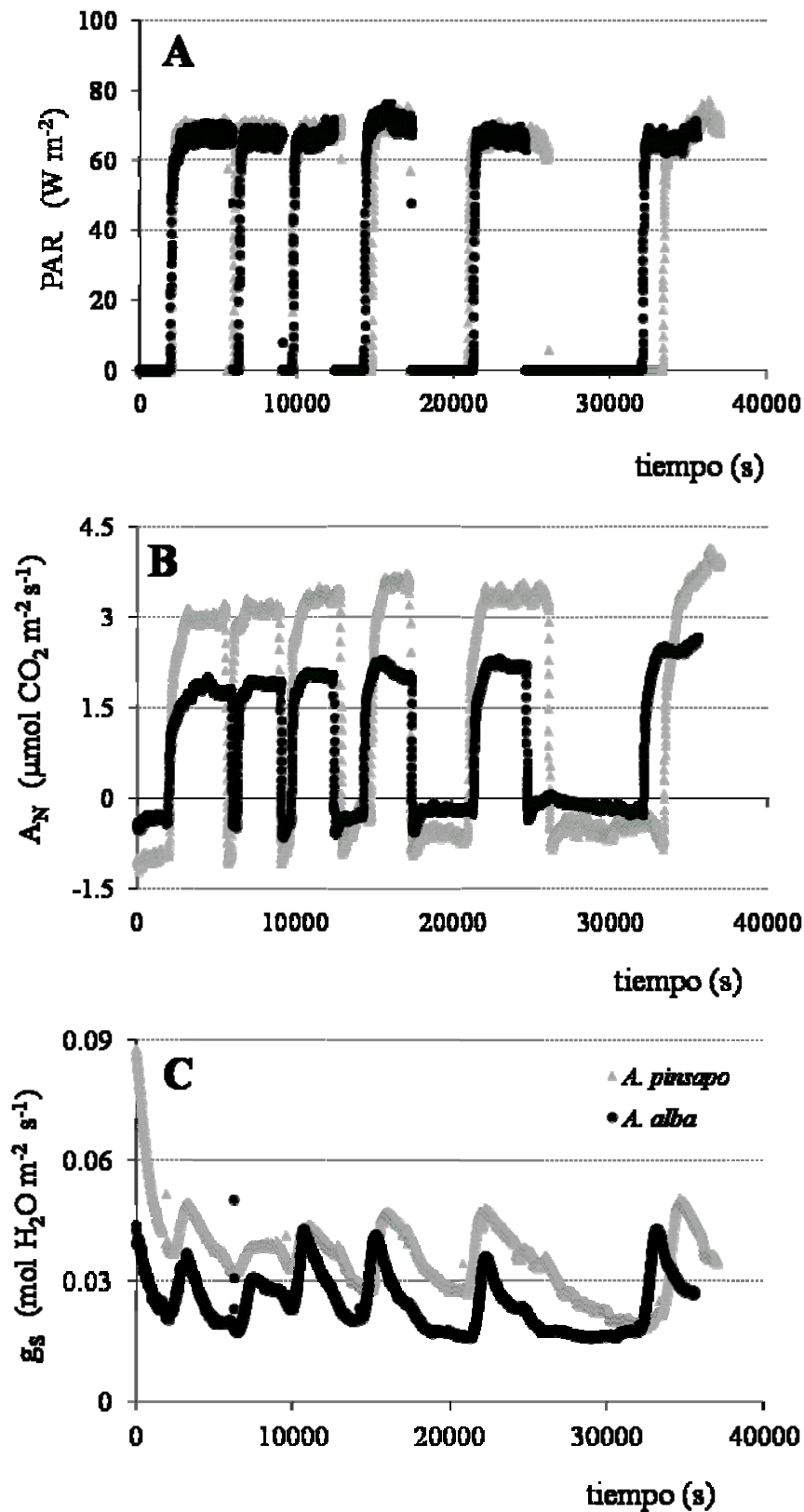
Para los valores promedio de esta variable registrados en oscuridad, los análisis estadísticos hallaron diferencias significativas entre especies, entre tratamientos de irradiancia, y derivadas de la aplicación de los periodos de oscuridad (**Tabla V.18**). Los mayores valores se registraron en la especie *A. pinsapo* y entre los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia (**Figura V.12B**). Con el incremento en la duración de los periodos de oscuridad, se produjo una disminución progresiva de los valores registrados (**Figura V.12B**). En cambio, en lo que respecta al máximo de cada curva, únicamente se encontraron diferencias significativas entre especies (**Tabla V.18**), hallándose los mayores valores máximos en *A. pinsapo* (**Figura V.13B**).

En lo que respecta a  $T_{\text{tau}}$ , los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia, y derivadas de la aplicación de los periodos de oscuridad (**Tabla V.18**). Los mayores valores de esta variable se hallaron en el tratamiento a alta irradiancia, y a medida que se incrementó la duración de estos periodos (**Figura V.14B1**). En el caso de  $T_{\text{maxsig}}$ , se hallaron diferencias entre especies, tratamientos de irradiancia y periodos de oscuridad de distinta duración, además de para la interacción “tratamiento de irradiancia x duración oscuridad” (**Tabla V.18**). Los mayores valores se encontraron en *A. alba*, en los individuos del tratamiento de alta irradiancia y a medida que se incrementó la duración del periodo de oscuridad previo, especialmente en el tratamiento a alta irradiancia (**Figura V.14B2**). Finalmente, en lo que respecta a  $T_{\text{ss}}$ , los análisis detectaron diferencias significativas entre especies, tratamientos de irradiancia y entre periodos de oscuridad de distinta duración, además de otros efectos (**Tabla V.18**). Los mayores valores de esta variable se encontraron en *A. pinsapo* y entre los individuos adscritos al tratamiento de baja irradiancia. A medida que se incrementó la duración de los periodos de oscuridad, se produjo un incremento en el valor de  $T_{\text{ss}}$  (**Figura V.14B3**).

+ Ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua.

En el caso de los valores promedios registrados para este ratio durante el periodo de oscuridad, los análisis no hallaron diferencias significativas para ninguno de los efectos considerados, salvo para el efecto de la aplicación de los periodos de oscuridad de duración creciente (**Tabla V.19**). Así, a medida que se incrementó la duración de estos periodos, se produjo un descenso en los valores promedios (**Figura V.12C**). Para el valor máximo característico de cada curva, se hallaron diferencias significativas ligadas a los efectos “especie” y “especie x tratamiento de irradiancia” (**Tabla V.19**). Los mayores valores se registraron en *A. alba*. En esta especie, el valor promedio registrado a alta irradiancia fue significativamente inferior al registrado a baja irradiancia, mientras que en *A. pinsapo* no hubo diferencias entre tratamientos (**Figura V.13C**).

En lo que respecta a  $T_{\text{tau}}$ , los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia, periodos de oscuridad y para el efecto “especie x duración oscuridad” (**Tabla V.19**). Los mayores valores se hallaron en el tratamiento a alta irradiancia, y a medida que fue incrementándose la duración de los periodos de oscuridad, especialmente en *A. alba* (**Figura V.14C1**). Para  $T_{\text{maxsig}}$ , se hallaron diferencias significativas entre especies, tratamientos de irradiancia y periodos de oscuridad (**Tabla V.19**). Los mayores valores de esta variable se hallaron en *A. alba* y en el tratamiento a alta irradiancia, y a medida que se incrementó la duración de los periodos de oscuridad (**Figura V.14C2**). Finalmente, en el caso de  $T_{\text{ss}}$ , los análisis detectaron únicamente la existencia de diferencias significativas para los efectos “duración del periodo de oscuridad” y “especie x tratamiento de irradiancia” (**Tabla V.19**). En *A. pinsapo*, se hallaron mayores valores de esta variable en el tratamiento a baja irradiancia, mientras que en *A. alba* se hallaron a alta irradiancia. A medida que se incrementó la duración de los periodos de oscuridad, se produjo un incremento en paralelo de los valores hallados (**Figura V.14C3**).



**Figura V.11.** En el tercer experimento, se interrumpió el suministro de irradiancia desde una fuente constante mediante la interposición de periodos de oscuridad de duración creciente (parte superior de la figura). Simultáneamente, se procedió al registro en paralelo de las tasas instantáneas de fotosíntesis y de conductancia estomática al agua (parte inferior). En concreto, se muestra la respuesta obtenida en sendos individuos de *A. pinsapo* y *A. alba* al principio del experimento.

**Tabla V.17.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias derivadas de los tratamientos de luz previstos en el experimento y de la aplicación de los periodos de oscuridad de duración creciente, considerando como variables el promedio de respiración en oscuridad registrado ( $R_d$ ), el valor máximo de respuesta fotosintética obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal (“max”), y los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\max sig}$  y  $T_{ss}$  (ver explicación en el texto) calculados a partir de los registros llevados a cabo en el momento final del tercer experimento (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y la duración de los periodos de oscuridad, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de  $p$ . En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	$R_d$	max	$T_{\tau}$	$T_{\max sig}$	$T_{ss}$
Especie	39.91 (1)	50.35 (1)	0.34 (1)	1.73 (1)	0.05 (1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.564	0.194	0.828
Tratamiento de irradiancia	12.83 (1)	11.52 (1)	1.47 (1)	3.13 (1)	0.08 (1)
	<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	0.231	0.083	0.781
Duración oscuridad	1.71(4)	0.25 (4)	75.34 (4)	26.12 (4)	14.37 (4)
	0.162	0.908	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	0.52 (1)	1.50 (1)	0.31 (1)	0.11 (1)	1.29 (1)
	0.474	0.226	0.583	0.746	0.261
Especie x Duración oscuridad	0.48 (4)	0.33 (4)	0.77 (4)	1.04 (4)	0.33 (4)
	0.753	0.853	0.548	0.394	0.857
Tratamiento de irradiancia x duración oscuridad	0.34 (4)	0.47 (4)	0.32 (4)	0.74 (4)	0.62 (4)
	0.848	0.757	0.860	0.570	0.650
Especie x tratamiento irradiancia x duración oscuridad	0.13 (4)	0.04 (4)	0.24 (4)	0.76 (4)	0.92 (4)
	0.969	0.996	0.914	0.559	0.460

**Tabla V.18.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias derivadas de los tratamientos de luz previstos en el experimento y de la aplicación de los periodos de oscuridad de duración creciente, considerando como variables el promedio conductancia estomática al agua registrado durante el periodo de oscuridad (“dark”), el valor máximo de conductancia estomática obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal (“max”), y los parámetros temporales  $T_{\tau}$ ,  $T_{\max sig}$  y  $T_{ss}$  calculados a partir de los registros llevados a cabo en el momento final del tercer experimento (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y la duración de los periodos de oscuridad, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de  $p$ . En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

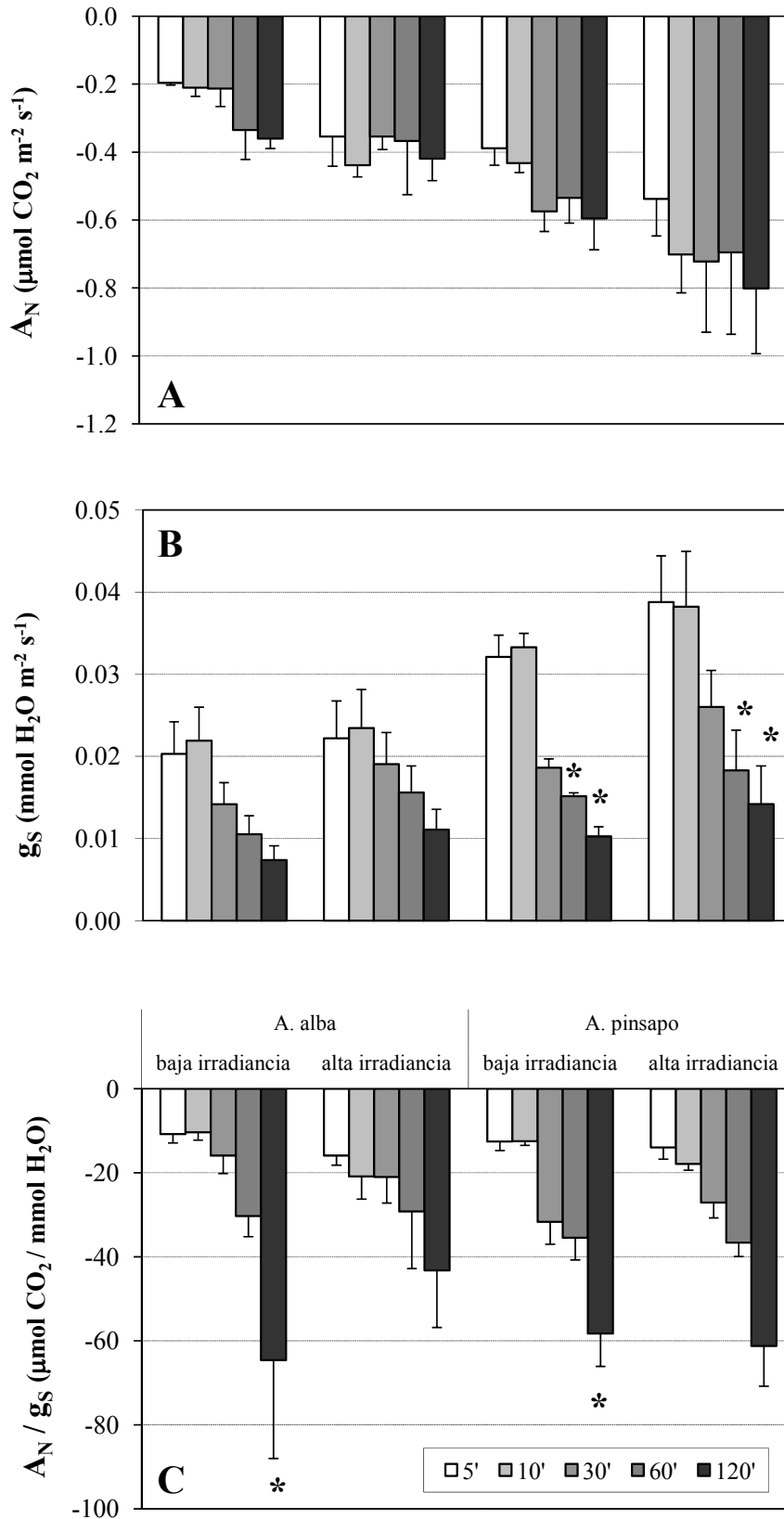
efecto	dark	max	$T_{\tau}$	$T_{\max sig}$	$T_{ss}$
Especie	26.83 (1)	65.88 (1)	1.50 (1)	4.51 (1)	4.74 (1)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.226	<b>0.039*</b>	<b>0.034*</b>
Tratamiento de irradiancia	7.95 (1)	3.68 (1)	54.06 (1)	30.16 (1)	19.49 (1)
	<b>0.007*</b>	0.061	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Duración oscuridad	22.63 (4)	0.38 (4)	4.21 (4)	8.58 (4)	19.61 (4)
	<b>0.000*</b>	0.824	<b>0.005*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	0.34 (1)	0.28 (1)	0.10 (1)	1.98 (1)	0.96 (1)
	0.561	0.598	0.759	0.165	0.332
Especie x Duración oscuridad	2.41 (4)	0.12 (4)	1.69 (4)	1.10 (4)	5.92 (4)
	0.061*	0.976	0.167	0.367	<b>0.001*</b>
Tratamiento de irradiancia x duración oscuridad	0.10 (4)	0.68 (4)	2.35 (4)	4.15 (4)	2.13 (4)
	0.981	0.612	0.067*	<b>0.006*</b>	0.091
Especie x tratamiento irradiancia x duración oscuridad	0.15 (4)	0.04 (4)	0.43 (4)	0.38 (4)	11.80 (4)
	0.963	0.996	0.787	0.825	<b>0.000*</b>

**Tabla V.19.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias derivadas de los tratamientos de luz previstos en el experimento y de la aplicación de los periodos de oscuridad de duración creciente, considerando variables el promedio registrado durante el periodo de oscuridad para el ratio entre las tasas instantáneas de fotosíntesis neta y conductancia estomática al agua (“dark”), el valor máximo de este ratio obtenido mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal (“max”), y los parámetros temporales  $T_{\text{tau}}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$  calculados a partir de los registros llevados a cabo en el momento final del tercer experimento (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz y la duración de los periodos de oscuridad, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

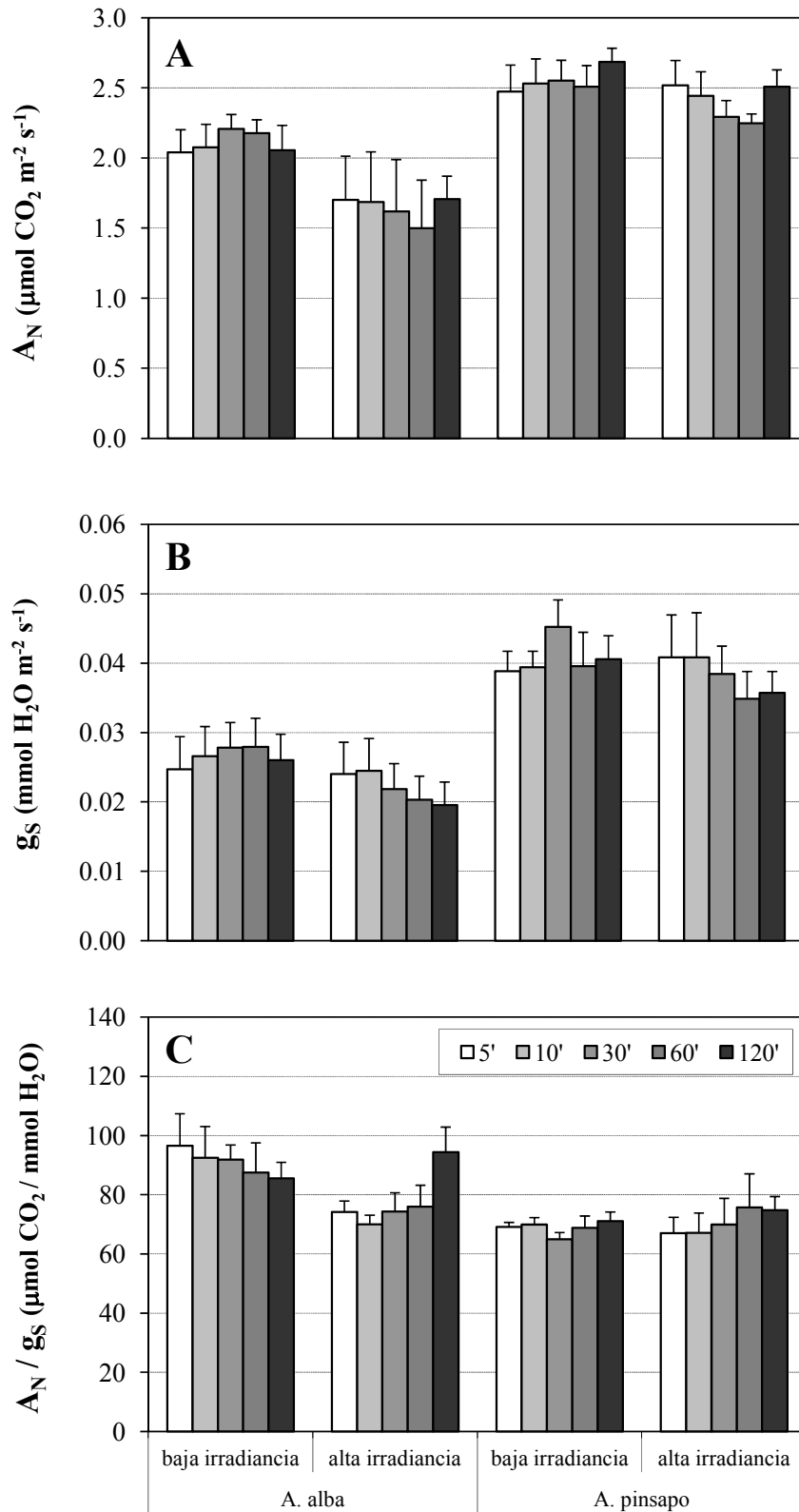
efecto	dark	max	$T_{\text{tau}}$	$T_{\text{maxsig}}$	$T_{\text{ss}}$
Especie	1.44 (1) 0.235	22.32 (1) <b>0.000*</b>	1.42 (1) 0.239	15.86 (21) <b>0.000*</b>	1.64 (1) 0.207
Tratamiento de irradiancia	0.02 (1) 0.903	3.19 (1) 0.080	16.64 (1) <b>0.000*</b>	53.67 (1) <b>0.000*</b>	1.20 (1) 0.279
Duración oscuridad	17.66 (4) <b>0.000*</b>	0.58 (4) 0.677	27.84 (4) <b>0.000*</b>	13.78 (4) <b>0.000*</b>	4.97 (4) <b>0.002*</b>
Especie x tratamiento de irradiancia	0.05 (1) 0.824	6.13 (1) <b>0.017*</b>	2.61 (1) 0.112	1.93 (1) 0.170	15.78 (1) <b>0.000*</b>
Especie x Duración oscuridad	0.32 (4) 0.860	0.24 (4) 0.916	6.25 (4) <b>0.000*</b>	1.35 (4) 0.266	0.55 (4) 0.703
Tratamiento de irradiancia x duración oscuridad	0.56 (4) 0.696	1.32 (4) 0.275	1.90 (4) 0.125	1.50 (4) 0.217	0.35 (4) 0.840
Especie x tratamiento irradiancia x duración oscuridad	0.64 (4) 0.637	0.71 (4) 0.590	0.47 (4) 0.759	1.59 (4) 0.192	0.80 (4) 0.531

### V.3.3.2. Cantidad de C fijado y de agua “perdida”. Eficiencia en el uso del agua y de la luz.

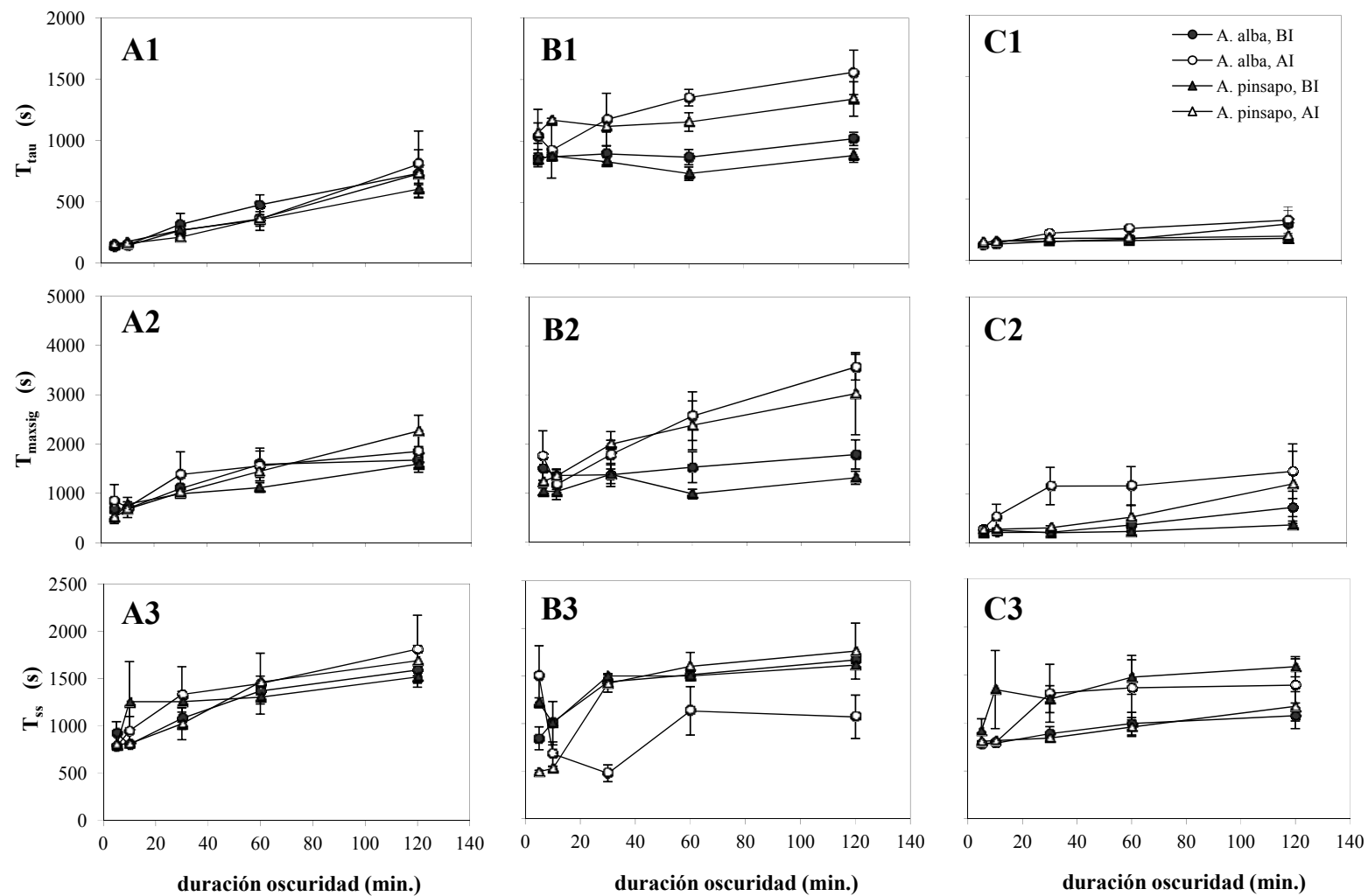
Para calcular la dosis de irradiancia suministrada en cada caso, la cantidad de C fijado y la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática, hubo que considerar, en cada caso, los cinco minutos de oscuridad que precedieron el encendido de la lámpara empleada, y los 20 minutos siguientes, correspondientes al registro de datos efectuado cuando la lámpara ya estaba encendida, dado que, la duración de los periodos de oscuridad varió conforme al diseño previsto en el experimento, y el tiempo registrado tras el encendido de la lámpara fue también distinto, al variar el tiempo que necesitó cada individuo en cada caso para el alcance del estado estacionario. Durante los citados 25 minutos de registro, la dosis de irradiancia suministrada rondó los  $7 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$ .



**Figura V.12.** Valor promedio de las tasas registradas en oscuridad, para las variables fotosíntesis neta (A), conductancia estomática al agua (B), y para el ratio entre ambas variables (C), en el momento final del experimento. Las barras de error representan el error estándar ( $n = 3-4$ ). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas.



**Figura V.13.** Valor promedio de los máximos calculados mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva sigmoideal, para las variables fotosíntesis neta (A), conductancia estomática al agua (B), y para el ratio entre ambas variables (C), en el momento final del experimento. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4).



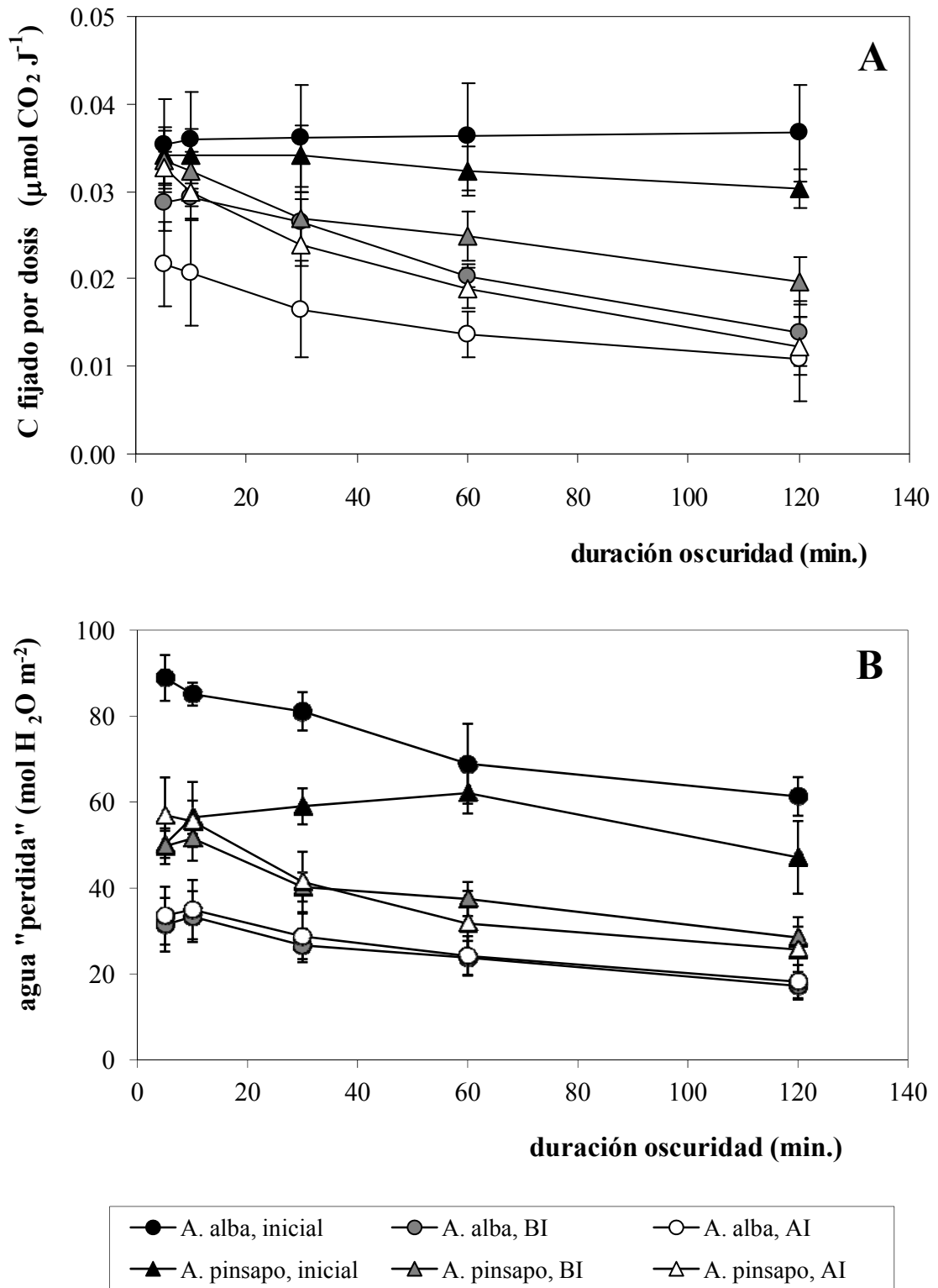
**Figura V.14.** Valor promedio de los parámetros  $T_{\tau}$  (1),  $T_{maxsig}$  (2) y  $T_{ss}$  (3) para las tasas instantáneas registradas de fotosíntesis neta (A), de conductancia estomática al agua (B) y el ratio entre ambas (C), en el momento final del experimento. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4). Nótese la diferencia de escala.

Como en casos anteriores, a partir de la dosis de irradiancia suministrada y la cantidad de C fijado por cada individuo, se calculó la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia suministrada (“C fijado por dosis”) como el ratio entre ambas variables. Para este ratio, los análisis estadísticos hallaron diferencias entre los distintos momentos del tiempo y derivadas de la aplicación de periodos de oscuridad de distinta duración, además de para otros efectos (“especie x tiempo de incubación”, “tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación”, “tiempo de incubación x duración oscuridad”) (**Tabla V.20**). Los mayores valores de este ratio se hallaron en los registros efectuados en el momento inicial del experimento. La aplicación de los tratamiento de incubación previstos en el experimento redujo los valores registrados para este ratio, especialmente en *A. alba* y en los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia. La interposición de los distintos periodos de oscuridad, si bien no tuvo una influencia decisiva en el momento inicial del experimento, influyó negativamente en el momento final del mismo, descendiendo progresivamente el valor del ratio al incrementarse la duración de los mismos (**Figura V.15A**).

En el caso de la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática, los análisis revelaron la existencia de diferencias significativas entre especies, entre distintos momentos del tiempo, y derivadas de la aplicación de los periodos de oscuridad, además de para el efecto “especie x tiempo de incubación” (**Tabla V.20**). Esta cantidad de agua fue superior en *A. pinsapo* y en el momento inicial del experimento. Con el paso del tiempo, la cantidad de agua perdida por individuos de ambas especies disminuyó, especialmente en *A. alba*. Como para otras variables, la interposición de periodos de oscuridad apenas tuvo efecto al inicio del experimento, si bien hizo disminuir ostensiblemente esta pérdida de agua al final del mismo, a medida que se incrementaba la duración de los periodos de oscuridad (**Figura V.15B**). Para el ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida, se hallaron únicamente diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia, entre los distintos momentos del tiempo, y para la interacción entre ambas variables (efecto “tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación”), sin hallarse diferencias debidas de la aplicación de los periodos de oscuridad (**Tabla V.20**).

**Tabla V.20.** Resultado del análisis estadístico aplicado para la detección de diferencias entre los tratamientos de irradiancia de incubación previstos en el experimento, los distintos momentos del tiempo y la aplicación de periodos de oscuridad distinta duración a que fueron sometidos los individuos de ambas especies durante la realización de este experimento, considerando como variables la cantidad total de C fijado normalizada por la dosis de luz suministrada (“C fijado por dosis de luz”), la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática (“agua perdida”), y la cantidad total de C fijado en relación con la cantidad total de agua “perdida” (“C fijado por agua perdida”) (GLM considerando como factores las especies, los tratamientos de luz, los distintos tiempos de incubación y la duración del periodo de oscuridad, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	C fijado por dosis	Agua “perdida”	C fijado por agua “perdida”
Especie	0.74 (1) 0.391	15.25 (1) <b>0.000*</b>	2.77 (1) 0.099
Tratamiento de irradiancia	4.30 (1) <b>0.041</b>	0.01 (1) 0.937	7.20 (1) <b>0.008*</b>
Tiempo de incubación	77.33 (1) <b>0.000*</b>	115.46 (1) <b>0.000*</b>	12.43 (1) <b>0.001*</b>
Duración oscuridad	5.16 (4) <b>0.001*</b>	5.41 (4) <b>0.001*</b>	0.21 (4) 0.931
Especie x tratamiento de irradiancia	0.34 (1) 0.559	0.13 (1) 0.718	2.89 (1) 0.092
Especie x tiempo de incubación	9.89 (1) <b>0.002*</b>	4.71 (1) <b>0.032*</b>	1.20 (1) 0.276
Tratamiento de irradiancia x tiempo de incubación	4.30 (1) <b>0.041*</b>	0.01 (1) 0.937	7.20 (1) <b>0.008*</b>
Especie x duración oscuridad	0.35 (4) 0.843	0.05 (4) 0.995	0.09 (4) 0.984
Tratamiento de irradiancia x duración oscuridad	0.03 (4) 0.998	0.06 (4) 0.993	0.02 (4) 0.999
Tiempo de incubación x duración oscuridad	3.68 (4) <b>0.007*</b>	1.57 (4) 0.187	0.72 (4) 0.582
Especie x tratamiento irradiancia x tiempo incubación	0.34 (1) 0.559	0.13 (1) 0.718	2.89 (1) 0.092
Especie x tratamiento irradiancia x duración oscuridad	0.17 (4) 0.952	0.05 (4) 0.996	0.24 (4) 0.916
Especie x tiempo incubación x duración oscuridad	0.07 (4) 0.992	0.35 (4) 0.843	1.36 (4) 0.253
Tratamiento irradiancia x tiempo incubación x duración oscuridad	0.03 (4) 0.998	0.06 (4) 0.993	0.02 (4) 0.999
1 x 2 x 3 x 4	0.17 (4) 0.952	0.05 (4) 0.996	0.24 (4) 0.916



**Figura V.15.** Diferencias entre las cantidades iniciales y finales de C fijado por dosis de irradiancia recibida (A) y en la cantidad promedio de agua "perdida" vía conductancia estomática (B) durante la aplicación de los distintos periodos de oscuridad, expresada como el promedio obtenido para el conjunto de individuos de cada especie adscrito a cada uno de los tratamientos de irradiancia previstos en el experimento. Las barras de error representan el error estándar (n = 3-4).

## V.4. Discusión.

### V.4.1. Fijación de C y control estomático en curvas fotoperiodo.

Los resultados obtenidos en el primer experimento fueron en su mayoría acordes a las hipótesis planteadas inicialmente y, si bien no resulta fácil explicar el conjunto total de diferencias significativas encontradas, ciertos patrones básicos emergieron con claridad. Por un lado, el hecho de que las tasas más negativas de respiración en oscuridad se hayan encontrado en *A. pinsapo* de nuevo apunta a que esta especie sea de las dos la que presenta una menor tolerancia a la sombra (Lambers *et al.* 1998). La disminución en el tiempo de las tasas máximas de fotosíntesis neta en ambas especies puede interpretarse como un signo del desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores. Este descenso se debería a una mayor inversión de N foliar en la síntesis de LHCP para maximizar la captación de la irradiancia disponible (Naidu y DeLucia, 1998), que conllevaría una disminución en la síntesis de Rubisco y por tanto, de la capacidad de carboxilación de los individuos (Terashima y Evans, 1988; Niinemets y Tenhunen, 1997). El hecho de que no se hayan encontrado diferencias entre tratamientos de irradiancia a este respecto sugiere que los niveles de irradiancia a que estaban sometidos los individuos de ambas especies antes del experimento eran muy superiores a los característicos de los tratamientos previstos en el mismo, motivo por el que los individuos de ambas especies no percibirían la menor diferencia existente entre éstos. Por otro lado, las mayores tasas de conductancia estomática se hallaron claramente en *A. pinsapo*, tanto en oscuridad como bajo el nivel de irradiancia incidente previsto, lo que, en conjunción con la escasa diferencia entre especies en lo que respecta a las tasas máximas de fotosíntesis neta (mayores en *A. pinsapo*,  $p = 0.054$ ), pone de manifiesto la mayor desproporción existente entre estas tasas y las de conductancia al agua en esta última especie, y es acorde con los menores valores del ratio fotosíntesis/conductancia hallados para la misma. Por ello, una vez más, *A. alba* es la especie que muestra consistentemente una mayor eficiencia intrínseca en el uso del agua. Por su parte, el descenso experimentado en las tasas de conductancia estomática con el tiempo podría estar relacionado asimismo con el desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores (Uemura *et al.* 2000).

En lo que respecta a los distintos parámetros temporales calculados, es de destacar que en general se obtuviesen mayores valores en *A. alba* tanto para la

fotosíntesis neta como para la conductancia estomática al agua, pareciendo por ello que esta especie de gran tolerancia a la sombra fue la menos eficaz en la regulación de la apertura estomática, al igual que sucedió en el experimento descrito en el capítulo anterior en condiciones de privación del riego (ver **Sección IV.4.1**), lo que en principio podría confirmar la hipótesis de la existencia de un *tradeoff* entre los rasgos que confieren tolerancia a la sombra y resistencia al estrés hídrico (Smith y Huston, 1989). Sin embargo, los bajos valores de conductancia de los individuos de esta especie en cualquier circunstancia (**Figura V.2B**) sugieren un uso más conservativo de este recurso, permitiendo maximizar la eficiencia de uso del agua (ver **Sección IV.4.1**). Esto, de alguna manera, pondría en tela de juicio la validez de la hipótesis planteada en nuestro caso (como en otros trabajos; ver, por ejemplo Markesteijn y Poorter (2009)), y es coherente con resultados previos de esta memoria (**Figuras IV.13, IV.16**) que indicaron que *A. alba* fue la especie que presentó en todo momento mayor eficiencia en el uso del agua (ver **Sección IV.4.1**). Además, el hecho de que también fuese mayor el tiempo necesario para la maximización de la tasa de fotosíntesis neta, en contra de lo que cabría esperar *a priori* de una especie típicamente de sombra o aclimatada a la misma, estaría íntimamente relacionado con el estrecho acoplamiento existente entre las tasas de fotosíntesis y las de conductancia estomática exhibido por esta especie, viéndose la fijación de C ralentizada tanto por la baja velocidad de la apertura estomática y la consecuente reducción en el suministro de C (Knapp y Smith, 1990) como quizá también por una limitación de carácter bioquímico / enzimático (Chazdon y Pearcy, 1991). En cualquier caso, *A. pinsapo* fue la especie en la que se registró el menor tiempo necesario para la maximización de esta eficiencia instantánea en el uso del agua (825 segundos frente a los 1230 hallados en *A. alba*, en valores promedio; ver **Tabla V.7**), y este patrón de evolución temporal, así como las variaciones relativas en las tasas de fotosíntesis neta y conductancia estomática al agua, son consistentes con resultados previos (ver **Figuras IV.12, IV.13, IV.16 y IV.7**, y **Secciones IV.3.1 y IV.4.1**) que pusieron de manifiesto la existencia de variaciones más rápidas y de mayor magnitud en las tasas de estas variables registradas simultáneamente en esta especie frente *A. alba*; además, estas variaciones fueron más independientes la una de la otra en su evolución temporal, lo que sugiere un menor grado de control de las variables relacionadas con el intercambio gaseoso en *A. pinsapo*. Así, es de destacar que esos mismos resultados, en el contexto en el que fueron obtenidos (**Capítulo IV**, experimento de estrés hídrico), también sugerían una menor capacidad de homeostasis

frente a cambios en las condiciones ambientales (Knapp y Smith, 1990). De esta forma, la estrategia mostrada por *A. alba* de minimizar la pérdida de agua manteniendo en todo momento niveles de conductancia estomática bajos y retrasando o amortiguando, en la medida de lo posible, los cambios en la misma (Markesteyn y Poorter, 2009), indican la elevada capacidad homeostática exhibida por esta especie (Knapp y Smith, 1990).

#### *V.4.1.1. Parámetros temporales. Caracterización de la respuesta fotosintética.*

El tiempo de incubación bajo ambos tratamientos de irradiancia no tuvo un efecto claro sobre los parámetros temporales calculados, produciéndose distintos resultados en función de la especie, el tratamiento de irradiancia y la variable considerada en cada caso (**Tablas V.5, V.6 y V.7**). No obstante, los resultados obtenidos en los análisis realizados por parámetros y por variables, a distintos niveles (global, por especies, por tratamientos de luz y para las distintas combinaciones de especies y tratamientos) (**Tablas V.8, V.9 y V.10**), fueron muy consistentes, y las diferencias mínimas, a pesar de que para realizar estas comparaciones se consideraron todas las curvas fotoperiodo realizadas a lo largo del experimento, tanto a principios del mismo como transcurridos dos y diez meses, entre las que se encontraron diferencias derivadas del tiempo de incubación en los parámetros calculados y en las variables consideradas. Así, por ejemplo,  $T_{\text{tau}}$  fue siempre inferior a  $T_{\text{maxsig}}$ , que a su vez fue por lo general inferior a  $T_{\text{ss}}$  en las tres variables estudiadas, con independencia de que el valor de estos parámetros aumentase o disminuyese al incrementarse el tiempo de incubación (**Tabla V.8**). Y los valores de estos parámetros obtenidos para el ratio entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática fueron por lo general inferiores a los obtenidos para la fotosíntesis neta y para la conductancia estomática consideradas independientemente (**Tabla V.9**). Estos resultados, indicativos de que el comportamiento observado, en términos de qué variables se alteran o se estabilizan antes o después, y de qué parámetros temporales mostraron mayores o menores valores, es muy similar entre las distintas combinaciones de especies y tratamientos de luz (**Tabla V.10**), sugieren a su vez que el mecanismo que subyace a este comportamiento es muy básico y constituye un rasgo de carácter conservativo.

Los menores valores obtenidos en todos los parámetros temporales para el ratio entre las tasas de fijación de C y las de conductancia estomática apuntan a que los individuos de ambas especies, a la hora de regular sus tasas de intercambio gaseoso,

priorizaron la optimización del ratio fotosíntesis/conductancia estomática (Cowan, 1977, 1986; Givnish, 1988). Por otro lado, el hecho de que para las tasas de fotosíntesis neta se hallasen en todo momento mayores valores de estos parámetros que los registrados para el citado ratio, sugiere que los individuos de ambas especies buscaron maximizar las tasas de fijación de C con cierta independencia del tiempo necesario para ello. Finalmente, para las tasas de conductancia estomática se registraron por lo general los mayores valores de las tres variables estudiadas, lo que reflejaría fielmente la inercia intrínseca a esta variable (Nobel, 1983; Knapp y Smith, 1990).

#### V.4.1.2. Carbono fijado, eficiencia en el uso del agua y en la fijación de carbono.

La mayor cantidad de carbono fijado se halló en *A. pinsapo*, como consecuencia de las mayores tasas de fotosíntesis neta y la mayor capacidad de esta especie para la maximización de las mismas en un menor espacio de tiempo. El descenso en las tasas de fotosíntesis neta con el tiempo, provocado por el desarrollo del proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores, explicaría el decremento registrado en la cantidad de carbono fijado al final del experimento. Por otro lado, y como en anteriores ocasiones (ver **Sección III.4.1**), la falta de diferencias significativas entre tratamientos de irradiancia sugiere que los individuos de ambas especies no percibieron una gran diferencia entre ambos, aunque sí respecto a las condiciones de partida, consecuencia del tiempo durante el que estos tratamientos fueron aplicados (efecto “tiempo de incubación”) (ver **Secciones III.4.2 y III.4.3**).

En consonancia con las mayores tasas de conductancia registradas en *A. pinsapo*, la cantidad de agua “perdida” vía conductancia estomática fue superior en esta especie, tal y como apuntaron resultados previos (ver **Sección IV.4.1**), a pesar del descenso experimentado por los valores máximos de esta variable (**Figura V.2B**).

En lo que respecta al ratio entre la cantidad de carbono fijado y de agua perdida, los mayores valores se encontraron en *A. alba* frente a *A. pinsapo*, en coherencia con la mayor eficiencia intrínseca en el uso del agua exhibida consistentemente, y a pesar de ser la especie en la que se hallaron menores tasas de fotosíntesis neta y un mayor valor de  $T_{\text{maxsig}}$  para esta variable. Esto pone de manifiesto una vez más el elevado grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua existente en esta especie, capaz de contrarrestar, mediante menores tasas de

conductancia al agua, la menor capacidad de fijación de C y de regulación instantánea de la eficiencia en el uso del agua exhibida aparentemente por la misma.

#### *V.4.2. Efecto del suministro de luz mediante distintas irradiancias de incubación*

Los resultados obtenidos en este segundo experimento en lo que respecta a la dosis total suministrada mediante distintos niveles de irradiancia fueron en su mayoría acordes a lo que cabría esperar, si bien es de destacar la ausencia de diferencias derivadas de los tratamientos de irradiancia y el tiempo de incubación. Así, la cantidad de C fijado por dosis fue superior en *A. pinsapo*, lo que en principio podría sorprender si consideramos la elevada tolerancia a la sombra de *A. alba* (Robakowski *et al.* 2003) y la elevada eficiencia en el uso de la luz que se le presupone por ello (Chazdon y Pearcy, 1991). Pero es necesario recordar que la dosis total se suministró no sólo a los niveles de irradiancia característicos de los tratamientos de incubación aplicados, sino también mediante niveles de irradiancia de moderados a altos (500, 800 ó 1100  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), en los que *A. pinsapo* exhibió una respuesta más eficaz en la fijación de C. La disminución en el tiempo de la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia recibida, aunque no significativa, se debería al desarrollo de un proceso de aclimatación a niveles de irradiancia más bajos, que produciría un descenso en las tasas máximas de fotosíntesis neta alcanzadas en el equilibrio por los individuos como consecuencia del menor potencial de carboxilación desarrollado por los mismos, resultado a su vez de una menor inversión de N foliar en la síntesis de Rubisco y mayor en la construcción de LHCP para mejorar la eficiencia en el uso de la luz recibida (Terashima y Evans, 1988; Niinemets y Tenhunen, 1997; Naidu y DeLucia, 1998). El hecho de que este descenso no sea significativo puede deberse a que las distintas dosis se suministraron mediante un rango amplio de niveles de irradiancia, de manera que el efecto puede ser más notable en los niveles más altos, pero quizá se vea compensado por un mejor desenvolvimiento de estos individuos a niveles de irradiancia más bajos. Por otro lado, la mayor “pérdida” de agua vía conductancia estomática tuvo lugar en *A. pinsapo*, como era de esperar considerando las mayores tasas de conductancia estomática halladas en esta especie en todo momento; por su parte, la mayor cantidad de C fijado por agua “perdida” hallada en *A. alba* es coherente con el hecho de que esta especie sea la que haya mostrado consistentemente una mayor eficiencia en el uso del agua o más bien una mayor capacidad de regulación del intercambio gaseoso con la consecuente optimización del

ratio entre la cantidad de C fijado y de agua perdida ante cambios en las condiciones de suministro hídrico y luminoso (ver de nuevo **Secciones V.4.1 y V.4.3**).

Los análisis efectuados para cada una de las distintas dosis de irradiancia aplicadas consiguieron revelar las diferencias existentes entre tratamientos de irradiancia y/o distintos momentos del tiempo. En lo que respecta a la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia, el hecho de que una vez más no se hallasen diferencias entre tratamientos, unido a que se hayan encontrado diferencias derivadas del tiempo de incubación, sugiere como en otros apartados de este mismo capítulo (ver **Secciones V.4.1 y V.4.3**) que los individuos participantes en el experimento acusaron la gran diferencia existente entre los niveles de irradiancia experimentados de forma previa al experimento y los característicos de los tratamientos aplicados, lo que les impediría percibir la menor diferencia existente entre éstos. En los periodos de irradiancia del principio y el final de la secuencia aplicada (oscuridad y  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se obtuvieron lógicamente valores negativos en la cantidad neta de C fijado y de C fijado por dosis, como era de esperar considerando el efecto tanto de la oscuridad como de la aplicación de un nivel de irradiancia tan bajo tras suministrarse previamente dos dosis a  $1100$  y  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En cualquier caso, las tasas más negativas de respiración se registraron en *A. pinsapo*, hallándose los valores menos negativos de C fijado/C fijado por dosis para *A. alba*, como era de esperar considerando la elevada tolerancia a la sombra característica de esta especie. Por su parte, para las dosis suministradas a mayores niveles de irradiancia, en *A. alba* se registraron las menores cantidades de C fijado por dosis, lo que podría deberse a una mayor inversión en LHCP frente a la síntesis de Rubisco, que limitaría el potencial de carboxilación de estos individuos a estos mayores niveles de irradiancia, lo que se corresponde con los patrones observados en el equipo pigmentario de ambas especies (ver **Sección III.3.3.3**). El descenso experimentado por ambas especies en la cantidad de C fijado por dosis con el tiempo de incubación, similar al hallado al considerar la dosis total de irradiancia suministrada, sería consecuencia del proceso de aclimatación a niveles de irradiancia más bajos, que produciría una limitación de la capacidad de carboxilación de los individuos a mayores niveles de irradiancia (Terashima y Evans, 1988; Niinemets y Tenhunen, 1997).

Al igual que en el caso de la dosis total, el hecho de que la cantidad de agua “perdida” sea siempre mayor en *A. pinsapo* es coherente con las mayores tasas de conductancia estomática halladas en todo momento en esta especie bajo distintas

circunstancias. Por su parte, la reducción de la cantidad de agua perdida con el tiempo, únicamente en la “dosis 300”, sugiere que ese proceso de aclimatación a los niveles de irradiancia previstos conllevó la optimización del ratio “C fijado por agua perdida” de forma especialmente notable para uno de los niveles de irradiancia característicos de los tratamientos. Así, para un nivel de irradiancia bastante inferior, como  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , y adecuado suministro hídrico, es posible que los individuos de ambas especies mantuviesen los estomas abiertos para intentar maximizar la fijación de C a partir de la escasa irradiancia recibida (ver **Sección IV.4.2**). A niveles de irradiancia superiores, la mayor estimulación del aparato fotosintético pudo impedir la optimización del citado ratio, como efecto de la ausencia de aclimatación a esos niveles de luz.

Finalmente, las mayores cantidades de C fijado por agua perdida halladas en *A. alba* serían consecuencia principalmente, además de su eficiencia en el uso de la luz, de su mayor capacidad para usar los recursos hídricos de forma más conservativa, a la vista de las menores tasas de conductancia estomática halladas en todo momento, y de la mayor capacidad de regulación del ratio entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua. El hecho de que se produzca un incremento de la variable citada a  $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  tendría que ver nuevamente con la aclimatación a ese nivel de irradiancia (ver párrafo anterior). Por su parte, la disminución registrada a  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  podría deberse a que este nivel de irradiancia no fuese fotoinhibidor al principio del experimento, pero sí al final del mismo, como consecuencia de la aclimatación a niveles de irradiancia inferiores. Y si este comportamiento no se observa a “dosis 500” y a “dosis 1100” es porque, en el primer caso, este nivel de irradiancia no es tan alto como para provocar el proceso de fotoinhibición en ningún momento del experimento, y en el segundo, porque es posible que éste ya lo sea incluso al principio del mismo. De ahí que no se experimenten cambios en el tiempo a este respecto.

Por su parte, los análisis realizados sobre datos agrupados para las distintas combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia pusieron de manifiesto las diferencias existentes entre las distintas dosis de irradiancia suministradas, en lo que respecta tanto a la cantidad de C fijado por dosis y la de agua “perdida”, como al ratio entre ambas. Así, la reducción experimentada en la cantidad de C fijado por dosis de irradiancia suministrada al pasar de unos niveles de luz a otros (**Figura V.10.A**) se debería a la conjunción de dos factores: en primer lugar, que las máximas tasas de

fijación de C se estarían produciendo lógicamente al nivel o niveles de irradiancia más próximos ( $300$  y  $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a los empleados en los tratamientos de incubación (Givnish, 1988) y que constituyen por si mismos la señal lumínica necesaria para desencadenar estos procesos, y por otro lado, a que es posible que, al producirse la aclimatación a estos niveles de incubación, la aplicación de mayores niveles de irradiancia durante periodos prolongados pueda provocar procesos de fotoinhibición que limiten temporalmente la fijación de C (Lambers *et al.* 1998) (Figura V.10.A).

Por otro lado, el hecho de que la cantidad de agua perdida variase en *A. alba* de forma menos notable que en *A. pinsapo* (**Figura V.10.B**), es otra evidencia más de un uso más conservativo de este recurso por parte de la primera, y más plástico por parte de la segunda, que parece así la más eficiente en la gestión de este recurso. Pero las menores tasas de conductancia registradas en todo momento en *A. alba*, además de sugerir una mayor capacidad de optimización del ratio fotosíntesis / conductancia, indican además una mayor eficiencia en el uso del agua en las distintas condiciones de iluminación experimentadas. Finalmente, la ausencia de diferencias significativas en lo que respecta al ratio C fijado por agua perdida (**Figura V.10.C**) sugiere que los individuos de ambas especies fueron capaces de regular el ratio entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al pasar de unos niveles de irradiancia a otros para mantenerlo aproximadamente constante, si bien los mayores valores hallados para *A. alba* indican la mayor eficiencia de esta especie a este respecto en comparación con *A. pinsapo*.

#### V.4.3. Efectos del intercalado de periodos de oscuridad de distinta duración.

La aplicación de periodos de oscuridad de duración creciente tuvo efectos de distinto tipo sobre las diferentes combinaciones de especies y tratamientos de irradiancia, en lo que respecta tanto a las variables relacionadas con el intercambio gaseoso como a los parámetros empleados para describir la dinámica temporal de estas variables (**Tablas V.17 a V.19**). De forma general, el incremento en la duración de estos periodos de oscuridad produjo el aumento de los valores obtenidos para los parámetros temporales calculados ( $T_{\text{tau}}$ ,  $T_{\text{maxsig}}$  y  $T_{\text{ss}}$ ) en las tres variables consideradas (fotosíntesis neta, conductancia estomática al agua y ratio entre ambas) (**Figura V.14**), lo que a su vez tuvo implicaciones tanto sobre la cantidad de C fijado como sobre la cantidad de agua “perdida” en los periodos de iluminación que siguieron (**Tabla V.20**, **Figura V.15**).

Este resultado era de esperar considerando el impacto de la disminución de la cantidad de irradiancia incidente sobre el funcionamiento de la maquinaria fotosintética (Knapp y Smith, 1990; Whitehead y Teskey, 1995).

No obstante, este efecto sólo se hizo especialmente patente al final del experimento, en contra de lo que podría esperarse *a priori*, teniendo en cuenta tanto la tolerancia a la sombra de ambas especies como el hecho de que el tiempo de incubación del experimento constituyese un periodo de aclimatación a dos niveles de irradiancia considerablemente bajos. En este sentido, sería de esperar no sólo la existencia de diferencias derivadas de la aplicación de periodos de oscuridad más largos al principio del experimento, sino también que ese efecto inicial fuese incluso más notable que en el momento final del mismo, especialmente entre los individuos adscritos al tratamiento de baja irradiancia, del mismo modo que muchas especies del sotobosque presentan una notable capacidad de respuesta ante variaciones significativas en la duración, la frecuencia de aparición y la cantidad de irradiancia incidente (*sunflecks*) (Chazdon y Pearcy, 1991), al experimentar un estado de activación intermedio de inducción de la fotosíntesis que les permite aprovechar de la manera más rápida y eficiente posible estos pulsos de luz. Así, es posible que el incremento de los tiempos de respuesta tras la aplicación de los periodos de oscuridad hallado en el momento final del experimento se deba al hecho de que los individuos de ambas especies fueron aclimatados artificialmente a una dosis de irradiancia que, aunque baja, se suministró mediante niveles constantes, lo que habría provocado la pérdida de la capacidad de respuesta mencionada. Este resultado sería por su parte coherente con el obtenido en trabajos previos, que pusieron de manifiesto la ausencia de respuesta ante cambios en la señal lumínica por parte de algunas especies propias de ambientes permanentemente sombreados (Mooney *et al.* 1983, Pearcy, 1988). Además, en el momento final del experimento se hallaron tasas de respiración en oscuridad más negativas en promedio (GLM realizado sobre el conjunto global de datos registrados,  $p < 0.000$ ), lo que incrementaría la inercia de los individuos de ambas especies en su respuesta de fijación neta de C (Givnish, 1988), y con ello los valores registrados de los parámetros temporales considerados. Por su parte, este incremento en las tasas de respiración sería asimismo consecuencia de la aclimatación a niveles de irradiancia artificialmente constantes, que habrían inducido en los individuos del experimento mayores costes de mantenimiento, especialmente en los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia.

Por otro lado, cabría esperar la existencia de diferencias entre especies y entre tratamientos de irradiancia, hallándose, en primer lugar, menores tasas máximas de fotosíntesis neta en la especie más tolerante a la sombra (Givnish, 1988) y/o en los individuos de ambas especies aclimatadas a la misma, pero también una mayor eficiencia fotosintética en el uso de la luz y por ello una mayor capacidad *a priori* para recuperar, en tiempos de respuesta más cortos, las tasas de fijación de C alcanzadas en estado estacionario durante los periodos de iluminación (Chazdon y Pearcy, 1991). Por su parte, en la especie menos tolerante a la sombra y/o en los individuos adscritos al tratamiento de mayor irradiancia, sería de esperar una mayor capacidad de fijación de C al nivel de irradiancia de medida, similar al experimentado durante el tiempo de incubación (Givnish, 1988), pudiendo suponer, en principio, que en estos individuos existiría un mayor efecto tanto de la oscuridad como del incremento en la duración de dichos periodos como consecuencia de su menor eficiencia fotosintética en el uso de la luz. Así, al producirse mayores tiempos de retardo, esto podría comprometer la cantidad de C fijado por estos individuos, al contrarrestarse parcialmente las mayores tasas de fotosíntesis neta alcanzadas.

Sin embargo, no se hallaron diferencias consistentes entre especies y/o tratamientos de irradiancia en lo que respecta a los parámetros temporales calculados, siendo el efecto más evidente el producido por la duración creciente de los periodos de oscuridad aplicados. En lo referente a las tasas máximas de intercambio gaseoso y a las registradas en oscuridad, los resultados son coherentes con otros obtenidos previamente en este capítulo, que sugieren que *A. alba* es la especie de mayor tolerancia a la sombra de las dos, como indican las tasas menos negativas de respiración en oscuridad (**Tabla V.17, Figura V.12A**) y las menores tasas máximas de fotosíntesis neta (**Tabla V.17, Figura V.13A**), y al mismo tiempo la que exhibe un uso más conservativo de los recursos hídricos, como señalan las menores tasas de conductancia al agua registradas durante los distintos periodos de luz y oscuridad (**Tabla V.18, Figuras V.12B y V.13B**), y los mayores valores máximos del ratio fotosíntesis/conductancia en los periodos de iluminación (**Tabla V.19, Figura V.13C**). Por otro lado, se hallaron distintas evidencias del desarrollo de un proceso de aclimatación a los bajos niveles de irradiancia aplicados, como el descenso experimentado en promedio por las tasas máximas de fotosíntesis neta (Terashima y Evans, 1988; Niinemets y Tenhunen, 1997; Naidu y DeLucia, 1998), y de conductancia estomática al agua (Uemura *et al.* 2000) (GLM realizado sobre el conjunto global de datos registrados,  $p < 0.000$  en ambos

casos), siendo el incremento en los valores máximos registrados del ratio entre ambas tasas instantáneas (GLM realizado sobre el conjunto global de datos registrados,  $p < 0.000$ ) consecuencia del descenso en la conductancia como respuesta al decremento experimentado en el *input* energético, lo que sugiere que estas variaciones en el intercambio gaseoso fueron tendentes a maximizar la fijación de C en relación con la cantidad de agua perdida por los individuos de ambas especies (Cowan, 1977, 1986; Givnish, 1988). Sin embargo, únicamente se hallaron diferencias entre tratamientos de irradiancia en el caso de la fotosíntesis neta, para la que se encontraron en el momento final del experimento, tasas de respiración en oscuridad más negativas en los individuos adscritos al tratamiento de alta irradiancia, y mayores tasas máximas en los individuos de baja irradiancia (**Tabla V.17**, **Figuras V.12A** y **V.13A**), lo que no es de extrañar considerando la mayor eficiencia en el uso de la luz esperable en los mismos, además del hecho de que a estos niveles moderados de irradiancia, el *input* energético sea insuficiente para poner de manifiesto el menor potencial de carboxilación de estos individuos (Lambers *et al.* 1998) o su mayor vulnerabilidad frente a procesos de fotoinhibición. No obstante, las tasas promedio registradas en ambos tratamientos no son muy distintas ( $5.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a baja irradiancia frente a 4.5 en alta irradiancia), y están expresadas por unidad de área, y no por peso o contenido foliar en proteínas, lo que podría hacer variar el resultado final (Givnish, 1988). En cualquier caso, este resultado, por su parte, indica una mayor sensibilidad y/o dependencia ante cambios en las condiciones de iluminación por parte de la fotosíntesis neta frente a la conductancia estomática al agua (Nobel, 1983; Knapp y Smith, 1990), para la que no se detectaron diferencias en este sentido.

Otro indicio claro de que los individuos se encontraron sometidos a niveles de irradiancia inferiores a los experimentados de forma previa lo constituye el hecho de que la cantidad de C fijado y de agua “perdida” fuesen menores en el momento final del mismo (**Figura V.15**), como consecuencia de las menores tasas registradas tanto de fotosíntesis neta como de conductancia estomática al agua. El incremento registrado en los distintos parámetros temporales lógicamente contribuyó a hacer más evidentes tales diferencias. No obstante, y a pesar de la mayor dependencia de las condiciones de iluminación por parte de los mecanismos de fijación de C, el descenso en ambas variables hizo que la cantidad de C fijado por agua “perdida” fuese mayor al final del experimento, en coherencia con el desarrollo de ese proceso de aclimatación a niveles de irradiancia inferiores, al suponer el descenso en la fotosíntesis neta una menor

cantidad de C fijado (menor ganancia) y el descenso en la conductancia estomática una menor cantidad de agua perdida (menor pérdida).

Por otra parte, es de destacar que las diferencias entre especies en este caso se restrinjan a la cantidad de agua perdida, siendo ésta mayor en *A. pinsapo* a causa de las mayores tasas de conductancia estomática al agua registradas en todo momento. En lo que respecta a los tratamientos de irradiancia, la mayor cantidad de C fijado y de C fijado por cantidad de agua “perdida” se registraron en los individuos adscritos al tratamiento de baja irradiancia. En general, estas cantidades de C fijado y de agua perdida fueron disminuyendo conforme se incrementaba la duración de los periodos de oscuridad, sin guardar una relación proporcional a la dosis de irradiancia suministrada (**Figura V.15**). A este respecto, y dado que no se hallaron diferencias entre especies en lo que respecta a la cantidad de C fijado, la especie más competitiva, la que presentaría un mayor *fitness* en estas circunstancias sería *A. alba*, para la que siempre se perdieron, en proporción, menores cantidades de agua vía conductancia estomática. En este sentido, los menores tiempos de retardo registrados por lo general en *A. pinsapo* no permitieron contrarrestar las mayores tasas de conductancia estomática observadas en esta especie.



## V.5. Conclusiones.

- *Abies alba* fue la especie que mostró simultáneamente una mayor tolerancia a la sombra y una mayor capacidad para usar de forma conservativa los recursos hídricos, lo que apunta de nuevo a una mayor eficiencia en el uso tanto del agua como de la luz, y pone en entredicho la existencia de un *tradeoff* entre la tolerancia a la sombra y la resistencia al estrés hídrico en nuestro caso.
- En *A. alba* existe asimismo un mayor acoplamiento temporal y una mayor proporción entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua, lo que permitió exhibir variaciones más lentas y de menor magnitud en las tasas de intercambio gaseoso que *A. pinsapo*, que fue la especie que exhibió un menor grado de control de las variables relacionadas con este intercambio y, por ello, una menor capacidad de homeostasis frente a cambios en el ambiente lumínico.
- Como resultado del proceso de aclimatación, las variaciones experimentadas en las tasas de intercambio gaseoso por ambas especies fueron tendentes a maximizar la cantidad de C fijado mediante la fotosíntesis en relación con la cantidad de agua perdida vía conductancia estomática, intentando incrementar o al menos mantener constante el ratio entre las tasas instantáneas de las variables mencionadas. En cualquier caso, en *A. alba* se dieron, por lo general, los mayores valores del citado ratio.
- La doble perspectiva abordada en nuestro caso, con el registro de las tasas instantáneas para conocer la forma y la velocidad a la que pueden producirse estas variaciones, junto con la integración de estas tasas instantáneas en un periodo de tiempo, para conocer el efecto final de estos cambios, ofrece una visión más completa del comportamiento exhibido por cada especie bajo distintas condiciones lumínicas.
- En general, *A. pinsapo* fue la especie que mostró un mayor capacidad de fijación de C, lo que estaría relacionado con mayores tasas de fotosíntesis neta y menores tiempos de respuesta. No obstante, también fue la especie que mostró un mayor consumo de recursos hídricos. Así, las mayores tasas de conductancia estomática al agua exhibidas en todo momento bajo las distintas condiciones de irradiancia y oscuridad no pudieron ser contrarrestadas por los menores tiempos de respuesta de esta variable. Por su parte, *A. alba* fue la especie en la que se halló por lo general un mayor ratio entre la cantidad de C fijado y la cantidad de agua perdida en ese proceso, como consecuencia de su mayor capacidad para la regulación del intercambio gaseoso y de una mayor eficiencia en la gestión de los recursos hídricos.





**VI. Influencia de la heterogeneidad ambiental sobre el patrón espacial de regeneración natural de *Abies pinsapo***

---



## **VI. Influencia de la heterogeneidad ambiental sobre el patrón espacial de regeneración natural de *Abies pinsapo*.**

*Este capítulo aborda el estudio de la regeneración natural que presenta Abies pinsapo en huecos naturales del dosel forestal, mediante el análisis espacial de dicha regeneración en relación con la distribución de variables ambientales. Los huecos naturales constituyen espacios en los que, debido a su configuración espacial y la presencia de distintas especies vegetales, existe una elevada heterogeneidad espacial y temporal respecto a variables ecológicas clave, tales como la irradiancia incidente sobre los individuos o la cantidad de humedad disponible en el sustrato. El objetivo de este capítulo es conocer la influencia que esta heterogeneidad ambiental tiene sobre los patrones espaciales de regeneración natural, es decir, en qué medida los distintos factores ecológicos, y la forma en que éstos varían en el espacio y en el tiempo, afectan a la supervivencia y al crecimiento de individuos juveniles; se trata, en definitiva, de conocer cuál es el papel que juega la heterogeneidad ambiental en el desenvolvimiento ecofisiológico de los juveniles de esta especie en condiciones naturales.*

### **VI.1. Introducción.**

*VI.1.1. Procesos de regeneración natural asociados a huecos del dosel forestal: la heterogeneidad espacial como fuerza motriz y moduladora de la regeneración de especies.*

Cuando un árbol, o un grupo pequeño de árboles, muere o es dañado, la caída de éstos, o incluso de ramas grandes, crea lo que se denomina un “hueco”, una apertura en el dosel forestal (e.g. Yamamoto, 2000). Estos huecos tienen su origen, normalmente, en perturbaciones de tipo natural, como el viento, las tormentas, el peso de la nieve, la caída de un rayo, el ataque de un patógeno, etc. y su tamaño puede variar entre unos pocos metros cuadrados (por ejemplo, cuando se produce la caída de un único árbol) y varios miles (el efecto, por ejemplo, de los huracanes o los grandes incendios), aunque por término medio presentan una extensión inferior a 1000 m<sup>2</sup> (Yamamoto, 2000).

Con el paso del tiempo, los huecos se “rellenan”, bien por el crecimiento de las ramas de árboles dominantes dispuestos en torno al hueco, que cierran el dosel, bien por el reclutamiento vertical de nuevos individuos en el sotobosque, procedentes de semillas

dispersadas por los árboles de los alrededores o presentes en el banco de semillas del suelo. Este fenómeno se conoce con el término de “dinámica de huecos” (*gap dynamics*; e.g. Watt, 1947; Whitmore, 1978).

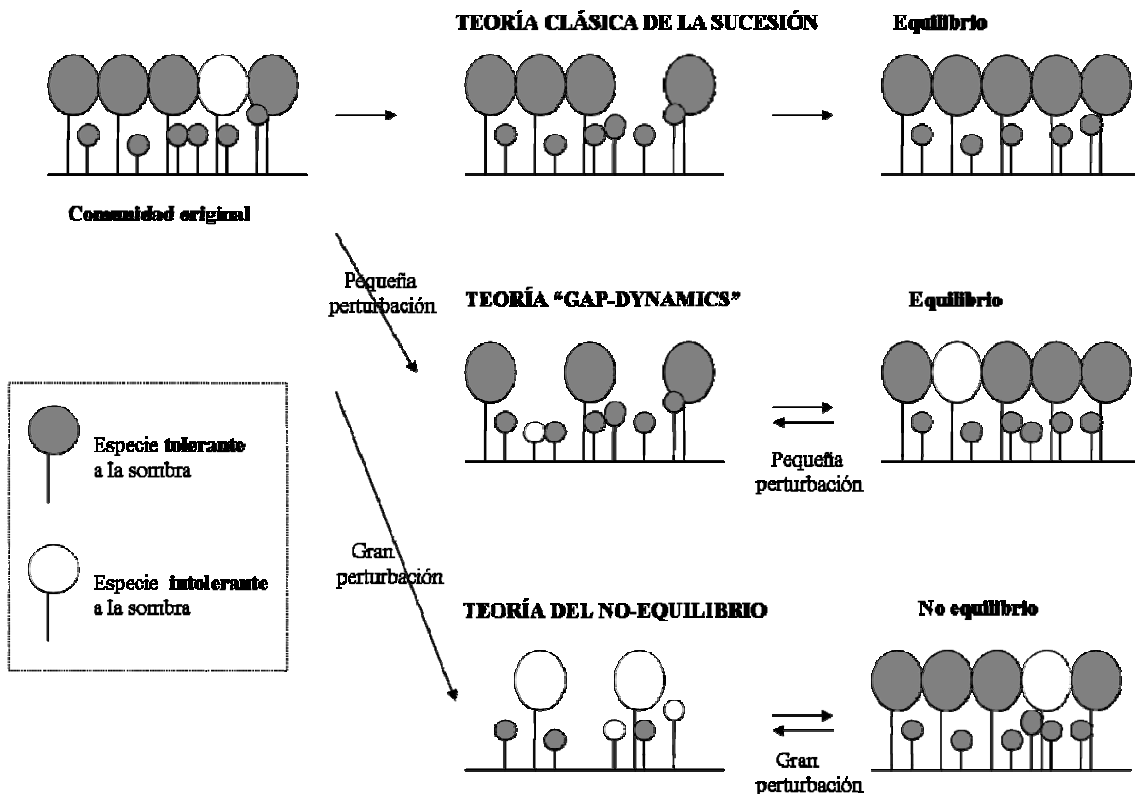
La respuesta de las especies, tanto del dosel como del sotobosque, ante la apertura de huecos, en términos de su supervivencia, crecimiento y reproducción, con frecuencia se atribuye al incremento en la disponibilidad de recursos clave y/o a la disminución en la competencia por estos recursos. El tamaño del hueco y su forma suelen enfatizarse como principales responsables de la composición de especies en los mismos (Runkle, 1982; Denslow, 1987; Poulson y Platt, 1989), pero la heterogeneidad ambiental a una escala más fina, dentro de los huecos, puede ser también importante (Brandani *et al.* 1988; Veblen, 1985).

Esta regeneración natural de especies arbóreas en el interior de los huecos del dosel tras una perturbación ha sido profusamente estudiada (ver, por ejemplo, Bazzaz y Pickett, 1980; Denslow, 1987; Platt y Strong, 1989), concluyéndose que juega un papel fundamental en la estructuración del bosque y el mantenimiento de la diversidad de especies (Farina, 2006). Las respuestas halladas a nivel de población y de comunidad en huecos de diferente tamaño se emplean a menudo para explicar cómo se mantiene la diversidad estructural y de especies a metaescala en bosques sometidos a perturbación natural a pequeña escala: la heterogeneidad ambiental que los huecos del dosel introducen en los ecosistemas forestales garantiza la presencia y la persistencia en el tiempo de especies con distintas estrategias coexistiendo en un mismo sistema (por ejemplo, con distinto grado de tolerancia a la sombra) (**Figura VI.1**). Este proceso, conocido como ‘gap partitioning’ (e.g. Ricklefs, 1977; Denslow, 1980a), es aún objeto de controversia, sobre todo en lo que se refiere a sistemas forestales localizados a escasa latitud y en bosques tropicales (Coates, 2000).

Esta hipótesis del ‘gap partitioning’, que se apoya en la especialización de nichos entre especies, y es una extensión del principio de exclusión competitiva (Gause, 1934), propone que, si bien los juveniles deberían mostrar una distribución diferencial a lo largo del gradiente de recursos que se establece entre zonas bajo dosel cerrado y los bordes y el centro de los huecos que se hayan abierto (Ricklefs, 1977; Denslow, 1980a; Gray y Spies, 1997), la multitud de factores que determinan los procesos de regeneración natural (“nicho de regeneración”) permite el establecimiento de especies diferentes en zonas similares de los gradientes ambientales a gran escala, siendo la supervivencia resultante un efecto de fenómenos de competencia (Grubb, 1977).

Precisamente, la existencia de microsítios para el establecimiento de los juveniles constituye un mecanismo esencial para explicar el hecho de que especies distintas puedan instalarse simultáneamente en zonas similares del gradiente de recursos, siempre que exista suficiente heterogeneidad a microescala que permita la coexistencia asociada a la segregación en el uso de recursos comunes (Harper *et al.* 1965; Harper, 1977).

Por todo lo anterior, la dinámica de huecos, junto con la hipótesis del *gap partitioning* y el nicho de regeneración natural, se considera, en consecuencia, una teoría alternativa a la teoría clásica de la sucesión, y a la teoría del no-equilibrio, para explicar la diversidad en la composición de especies a nivel de parcela y de paisaje en ecosistemas forestales (**Figura VI.1**) (Yamamoto, 2000; Farina, 2006; Forman, 1995).



**Figura VI.1.** Representación esquemática de las tres teorías de dinámica forestal citadas en el texto. La teoría clásica de la sucesión predice la exclusión de las especies intolerantes a la sombra en condiciones de equilibrio, dado que las especies tolerantes son las únicas que pueden establecerse y crecer bajo dosel cerrado. La teoría de la dinámica de huecos predice que las especies intolerantes pueden subsistir en condiciones de equilibrio a través de la regeneración en los huecos que se forman por pequeñas perturbaciones. La teoría del no-equilibrio predice que la comunidad no alcanzará el estado de equilibrio, porque distintas perturbaciones a gran escala provocan continuas interrupciones en el proceso de sucesión. Tomado de Yamamoto (2000).

La apertura de un hueco, independientemente del tipo de bosque en que se produzca, supone invariablemente una modificación de las condiciones físicas existentes bajo el dosel cerrado (Yamamoto, 2000; Lee, 1978; Denslow, 1980b; Poulson y Platt, 1989). Aunque existe cierta incertidumbre acerca de si la disponibilidad de agua y de nutrientes en el suelo se incrementa en los huecos del dosel (e.g. Vitousek y Denslow, 1986), siempre se produce un patente aumento de los niveles de luz en el sotobosque (Canham, 1984; Chazdon y Fetcher, 1984), matizado por factores como el tamaño del hueco y la altura de los árboles circundantes. En los bosques templados, y en los tropicales, típicamente convergen en los claros mayores niveles de PAR, de humedad en el sustrato y de nutrientes disponibles (Pearcy, 1983; Canham, 1988b; Denslow *et al.* 1990; Pacala *et al.* 1994), como consecuencia de la apertura del dosel y la menor competencia con individuos adultos (Fownes y Harrington 2004). Esta “idoneidad” de condiciones físicas para el asentamiento de nuevos individuos hace de los huecos lugares imprescindibles para la regeneración. No es posible, sin embargo, extrapolar directamente esta afirmación a los ecosistemas forestales mediterráneos. En estos bosques, los niveles de PAR son por lo general más elevados, y la evapotranspiración potencial a menudo es más del doble de la precipitación anual, la cual además presenta notables oscilaciones intra- e interanuales (Gracia *et al.* 2002). La situación puede ser especialmente crítica en los meses de sequía estival, considerada la principal fuente de estrés, limitando la distribución y el crecimiento de las especies vegetales en todas las regiones mediterráneas del mundo (Mooney, 1983). En el caso de las zonas más expuestas, como los huecos del dosel, el aumento de los niveles de PAR y la mayor temperatura del aire hacen que se incrementen la temperatura del suelo y los niveles de evaporación, y que disminuya la humedad disponible en el sustrato, hasta el punto de que han llegado a desarrollarse técnicas alternativas de regeneración que utilizan plantas “nodrizas” para facilitar la germinación de semillas o el establecimiento de nuevas plántulas (e.g. Castro *et al.* 2002).

En cualquier caso, la apertura de un hueco supone la aparición de gradientes ambientales, más o menos pronunciados, entre la zona abierta y el dosel cerrado. La severidad de estos gradientes, además de depender del tipo de sistema forestal, varía con factores tales como la altitud, la latitud, la pendiente del terreno (Canham, 1988a), el tamaño del hueco y la altura los árboles circundantes o la posición dentro del mismo que estemos considerando (Coates, 2000). Las variaciones en el tamaño del hueco suponen, principalmente, una modificación en distinto grado del ambiente lumínico

(e.g. Canham *et al.* 1990; Coates, 2000), mientras que, por ejemplo, se ha comprobado que la posición dentro del hueco tiene un efecto notable sobre las condiciones microclimáticas especialmente a lo largo del eje norte-sur, en sistemas forestales localizados a una latitud considerable (Coates, 2000).

#### VI.1.2. Patrones de regeneración natural en bosques de *Abies pinsapo*.

Dentro de la diversidad de estudios centrados en la especie y los bosques que forma, existen diversos trabajos que han abordado la ecofisiología de *Abies pinsapo* con rigor (véanse, por ejemplo, Linares, 2008, Linares *et al.* 2012; Blanes, 2010; Blanes *et al.* 2013). No obstante, algunos aspectos relacionados con ésta, como la dinámica natural de regeneración, son prácticamente desconocidos (salvo para Arista (1995). Por otro lado, sí está bien descrita la incidencia de un hongo patógeno de raíz (*Heterobasidion abietinum*, el grupo de interesterilidad F de *Heterobasidion annosum*) específico de este abeto (Sánchez *et al.* 2005, Sánchez *et al.* 2007a, 2007b, de Vita *et al.* 2007), cuyo ataque genera un patrón de mortalidad en rodales (**Figura VI.2**), que está dando lugar a la formación de claros en el pinsapar (Sánchez *et al.* 2005, Linares *et al.* 2010a). Su efecto es especialmente notable en la banda latitudinal inferior (1000 – 1300 m), donde la mayor duración de la sequía estival incrementa la susceptibilidad del huésped a los efectos de la infección por un patógeno que generalmente no resulta tan virulento (Korhonen *et al.* 1998; Puddu *et al.* 2003), contribuyendo entre otras causas a un mayor número de individuos afectados (de Vita *et al.* 2007, Linares *et al.* 2009).

La podredumbre que se produce en las raíces hace que los árboles afectados mueran o se vean seriamente dañados, cayendo y generando huecos de mediano tamaño en el pinsapar, dado que la infección por este patógeno se expande hacia árboles vecinos siguiendo un patrón de bandas concéntricas desde un árbol focal infectado anteriormente. La apertura de estos huecos favorece la expansión de especies menos tolerantes a la sombra, sobre todo de los géneros *Pinus* y *Quercus*, con las que el pinsapo contacta en su límite inferior de distribución. Son precisamente estas especies, favorecidas por las condiciones ambientales predominantes, más cálidas y secas, las principales competidoras del pinsapo a esa altitud.

Por otro lado, la política de gestión a que se han visto sometidos los pinsapares en las últimas décadas, caracterizada por la ausencia de intervenciones y la prohibición de prácticas tradicionales de aprovechamiento del monte (ganadería y silvicultura,

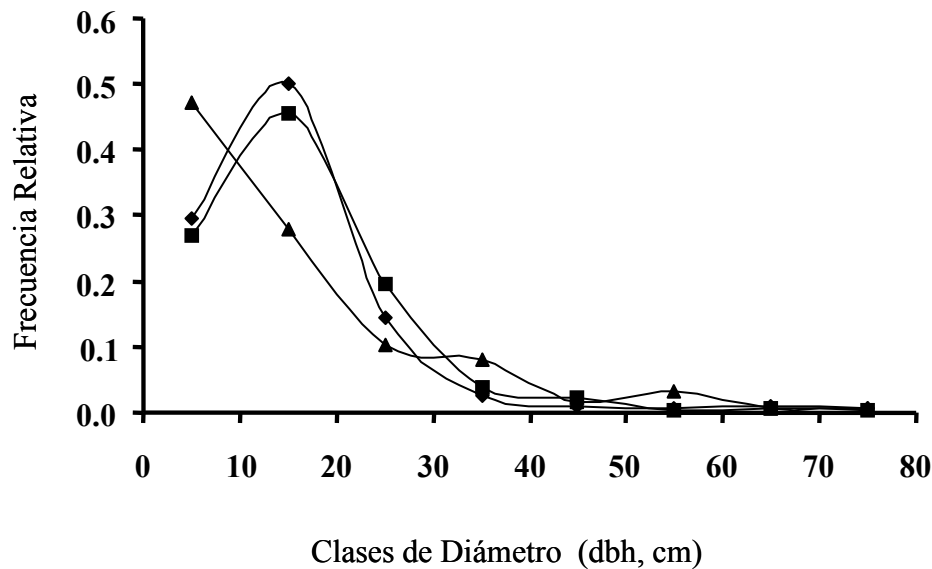
fundamentalmente), ha generado, con el paso del tiempo, bosques con una estructura de edades excesivamente homogénea, carente de equitatividad en las clases de tamaño (**Figura VI.3**) (Linares y Carreira, 2009; Linares *et al.* 2011).



**Figura VI.2.** Una ladera del pinsapar de Yunquera fotografiada en mayo de 2006, en la que se aprecian numerosos individuos adultos afectados por el ataque del hongo. La podredumbre radical que los aqueja destruye por completo sus raíces de anclaje, y éstos mueren en pie o incluso caen en verde. Con el tiempo, la caída de estos árboles y el contagio de los individuos más próximos a ellos genera un evidente patrón de mortalidad en rodales.

Las masas, por lo general jóvenes y en fase agradativa, con intensos procesos de autoaclareo o exclusión de tallos, están caracterizadas por la elevada densidad de pies y una notable competencia intraespecífica por factores ecológicos clave (fundamentalmente agua y luz) (Linares y Carreira, 2009) siendo muy significativa la presencia de individuos suprimidos que no llegan a alcanzar la parte superior del dosel forestal (Arista, 1995) e incluso mueren en estadios intermedios. Recientemente se han llevado a cabo experiencias de gestión encaminadas a aliviar la competencia mediante entresacado de distinta intensidad (eliminación del 30 y del 60% del área basal; Linares 2008). Esta práctica ha supuesto la aparición de huecos artificiales en el dosel forestal, en los que se han investigado los efectos que esta perturbación a pequeña escala de las condiciones ambientales sobre el desenvolvimiento de los individuos adultos afectados

(Linares *et al.* 2010b). No obstante, se desconocen los efectos que puedan producirse sobre el patrón espacial de regeneración natural en las zonas en las que se ha intervenido.



**Figura VI.3.** Frecuencia relativa de clases de diámetro (dbh) en las bandas altitudinales de 1000-1200 m (puntos), 1200-1400 m (cuadrados) y 1400-1600 m (triángulos). Tomado de Linares (2004).

Considerando estas dos causas concretas de introducción de heterogeneidad ambiental en el pinsapar, y el notable desconocimiento que se tiene de la dinámica natural de regeneración en el mismo, es fácilmente deducible el interés del estudio de aspectos ecofisiológicos relacionados con estos procesos para intentar conocer la capacidad de regeneración de las masas de pinsapar asociada a perturbaciones de baja intensidad. Esta información no sólo serviría para ampliar el cuerpo de conocimientos que se tiene de esta especie y completar la elaboración de su perfil ecofisiológico, sino que también contribuiría a una gestión de las masas de pinsapar más eficiente, al poner de manifiesto los efectos que distintas prácticas forestales pueden tener en la dinámica natural de regeneración. Además, ayudaría a prever la evolución temporal de la vegetación natural del pinsapar, especialmente a menor altitud, donde el ataque del hongo, la competencia con otras especies más “mediterráneas” y mejor adaptadas *a priori*, y la mayor severidad de las condiciones ambientales, suponen amenazas reales para la conservación y la gestión del pinsapar (Carreira *et al.* 2008).

El objetivo de este capítulo ha sido evaluar la influencia de la heterogeneidad espacial y temporal de las condiciones ambientales en el establecimiento y la supervivencia de los individuos juveniles de la especie – los mecanismos que rigen la dinámica natural de regeneración en el pinsapar –, así como sobre el comportamiento ecofisiológico de estos individuos. Para ello, se ha llevado a cabo el seguimiento estacional de distintas variables, *ambientales* y *bióticas*, así como de sus *relaciones mutuas*, sobre individuos juveniles localizados en distintos huecos del dosel de origen natural. La estructura espacial del sistema objeto de nuestro estudio, y la fuerte heterogeneidad espacial y temporal impuesta por los gradientes ambientales que lo caracterizan, nos han llevado a considerar una perspectiva espacialmente explícita, que incluya el componente espacial tanto de las variables que lo definen como de las propias variables respuesta.

### *VI.1.3. El análisis espacial como aproximación a los procesos de regeneración natural.*

A pesar de que el rol de la dimensión espacial en los procesos de dinámica ecológica se presumía importante hace ya tiempo (Bascompte y Solé, 2005), sólo recientemente se han desarrollado capacidades de cálculo informático que hagan abordable el análisis de conjuntos grandes de datos espacialmente explícitos (datos que contienen información sobre su localización en el espacio). Así, si la ecología estudia las relaciones recíprocas entre los organismos y su medio ambiente (Begon *et al.* 1995), numerosos estudios han puesto de manifiesto cómo la distribución espacial de distintos factores abióticos sigue complejos patrones espacio-temporales, en ocasiones asociados a los de distintos organismos (Ryel *et al.* 1996; Ettema *et al.* 1998; Bárdossy y Lehmann, 1998; Stenger *et al.* 2002; Gallardo *et al.* 2005). Se ha constatado, por tanto, la importancia del espacio y de las estructuras espaciales en el funcionamiento de los ecosistemas, lo que se conoce con el nombre de “paradigma espacial de la ecología” (Bascompte y Solé, 1995; Tilman y Kareiva, 1997).

En el caso de huecos naturales del dosel forestal, es particularmente evidente que su aparición introduce en la masa forestal notables gradientes ambientales (fundamentalmente, de luz, agua y nutrientes disponibles) en el espacio y en el tiempo, con efectos más que probables tanto para el desempeño de los individuos afectados como para el desarrollo de los procesos de regeneración que traen consigo. Por ello, el seguimiento de huecos naturales en el dosel del pinsapar se llevó a cabo desde una

doble perspectiva, temporal (estacional) y espacial, empleando un análisis espacial basado en índices de distancia: el método SADIE (*Spatial Analysis by Distance Indices*), desarrollado para el análisis de datos espacialmente explícitos en una o dos dimensiones (ej. transectos y superficies) mediante el uso de índices de distancia (Perry y Hewitt, 1991; Perry, 1995; Perry *et al.* 1996; Perry, 1998; Perry *et al.* 1999). Esta herramienta permite caracterizar el patrón espacial de una determinada variable dentro de la zona de estudio y estimar la contribución de cada punto de muestreo al patrón espacial global. También permite evaluar estadísticamente los patrones de asociación/disociación espacial de dos variables en la zona de estudio, y generar índices de asociación/disociación local para cada punto de muestreo.

En nuestro caso, se empleó SADIE para caracterizar tres huecos del dosel del pinsapar empleando registros espacialmente explícitos de variables bióticas y abióticas. En concreto, se tomaron medidas de la cantidad de irradiancia incidente y de la humedad en el sustrato, en tres periodos estacionales distintos, y se describió el patrón espacial de distribución de juveniles de *Abies pinsapo* y de la cobertura de matorral acompañante. A partir de esta información, se identificaron seis microambientes distintos, en los cuales se realizó el seguimiento de juveniles de la especie, respecto a su crecimiento y su comportamiento ecofisiológico, para intentar conocer los mecanismos que rigen la dinámica natural de regeneración del pinsapar.

## **VI. 2. Localización, diseño experimental y variables de estudio.**

### *VI.2.1. Sitio de estudio.*

El trabajo de campo se desarrolló en el pinsapar de Yunquera (**Figura VI.4**), en el interior del Parque Natural de la Sierra de las Nieves (provincia de Málaga). Se trata de un pinsapar joven, agradable, con procesos intensos de exclusión de tallos, caracterizado por elevados valores de densidad (promedio:  $\sim 1200$  árboles  $\text{ha}^{-1}$ ; máximos:  $>2000$  pies  $\text{ha}^{-1}$ ) y de área basal (promedio:  $\sim 35$   $\text{m}^2$   $\text{ha}^{-1}$ ; máximos:  $>60$   $\text{m}^2$   $\text{ha}^{-1}$ ), especialmente en altitudes medias (Linares, 2004; Linares *et al.* 2011). Asimismo, esta masa presenta una gran homogeneidad en su estructura de edades, predominando los individuos con una edad media estimada que ronda los 30 años (Liétor y Carreira, 2001; Linares y Carreira, 2009). Se asienta sobre una zona caliza, aproximadamente entre los 1100 y los 1600 metros. En este rango altitudinal, *Abies pinsapo* se distribuye

como especie dominante. Las poblaciones situadas a menor altitud crecen bajo condiciones de mayor aridez, y el pinsapar contacta con especies xerófilas típicamente mediterráneas, como *Quercus rotundifolia* Lam., *Quercus faginea* Lam. o *Pinus halepensis* Mill. (Blanca *et al.* 1999) (**Figura VI.5**). En el límite superior de su distribución (>1600 m), estas poblaciones de pinsapo presentan una menor limitación hídrica pero el crecimiento se encuentra limitado por las bajas temperaturas, y aparecen individuos de otras especies arbóreas, propias de ambientes más fríos y húmedos, como *Quercus alpestris* Boiss., *Sorbus aria* L., *Taxus baccata* L., o *Acer opalus* subsp. *granatense* Boiss.



**Figura VI.4.** Existen poblaciones de pinsapo en la Sierra del Pinar (Grazalema, Cádiz) y en distintos puntos de la provincia de Málaga: la Sierra de las Nieves (Yunquera), la Serranía de Ronda, Los Reales de Sierra Bermeja (cerca de Estepona) y Sierra Real (en el término de Istán, cerca de Marbella). El área de estudio se localiza en el pinsapar de Puerto Saucillo, en el término municipal de Yunquera.

En el pinsapar inalterado, con cobertura arbórea al 100%, son escasas las plantas en el sotobosque, dominado en este caso por musgos, líquenes y especies nemorales como *Daphne laureola* o *Helleborus foetidus* y algún caméfito lianescente como *Rubia peregrina* (Cabezudo *et al.* 1998). Sin embargo, en el pinsapar de Yunquera, son frecuentes los claros, en los que abundan los individuos de especies de matorral como *Ulex baeticus*, *Rubia peregrina* o *Rosmarinus officinalis*. También aparecen frecuentemente en el sotobosque *Ononis reuterii*, *Crataegus monogyna*, *Juniperus*

*phoenicea*, *Hedera helix* y *Rosa canina*, así como distintas especies de los géneros *Phlomis*, *Thymus* y *Cistus*, entremezcladas con plántulas y juveniles de *Quercus ilex* y, especialmente, *Abies pinsapo*. A mayor altitud, comienzan a aparecer especies de matorral tipo piorno (**Figura VI.6**).



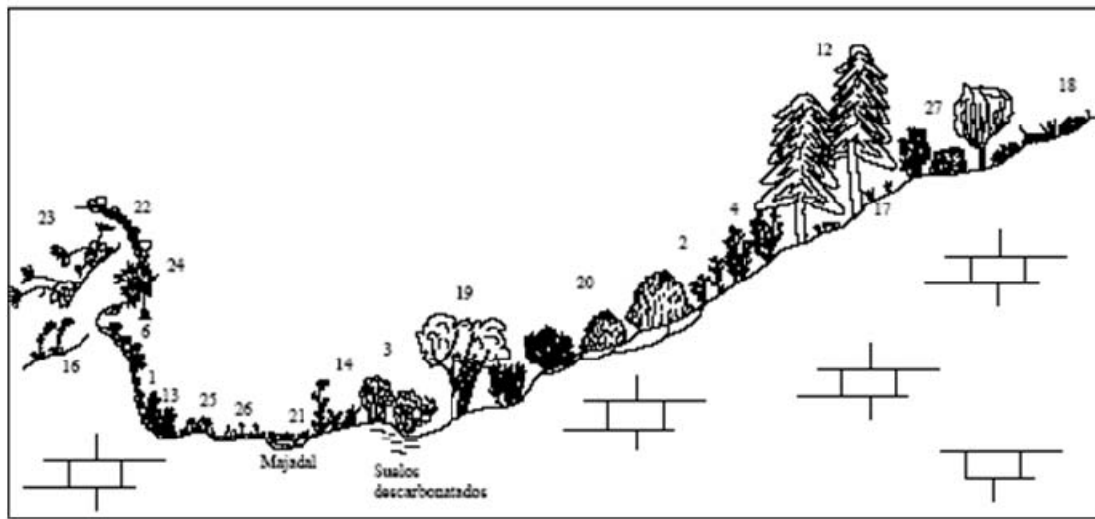
**Figura VI.5.** En la banda altitudinal inferior, el pinsapar se entremezcla con especies de los géneros *Pinus* y *Quercus*, que desaparecen en cotas más altas.

#### VI.2.2. Localización y selección de huecos. Caracterización de las parcelas.

Tras un muestreo extensivo en las proximidades de Puerto Saucillo (a 1200 m.s.n.m. aprox., en el término municipal de Yunquera, Málaga), se optó por incluir en el estudio tres huecos adyacentes situados en una ladera próxima, de orientación noroeste (**Figuras VI.7, VI.8 y VI.9**). En la selección de los mismos se consideró tanto su accesibilidad como el hecho de que compartiesen orientación y un tamaño medio, para que la toma de datos, con la resolución adecuada, constituyese un esfuerzo de muestreo abordable.

Una vez localizados y seleccionados los huecos, sobre cada uno de ellos se proyectó una retícula de 1 m<sup>2</sup> de luz mediante la colocación en paralelo de un conjunto de cuerdas de nylon, marcadas en tramos de 1 m (**Figura VI.10**). Este sistema mallado se prolongó desde los huecos hacia el interior del dosel, para incrementar la superficie

de muestreo bajo cobertura arbórea. La retícula permaneció sobre las tres “parcelas” (cada claro, con la zona de dosel circundante) durante todo el período de estudio.

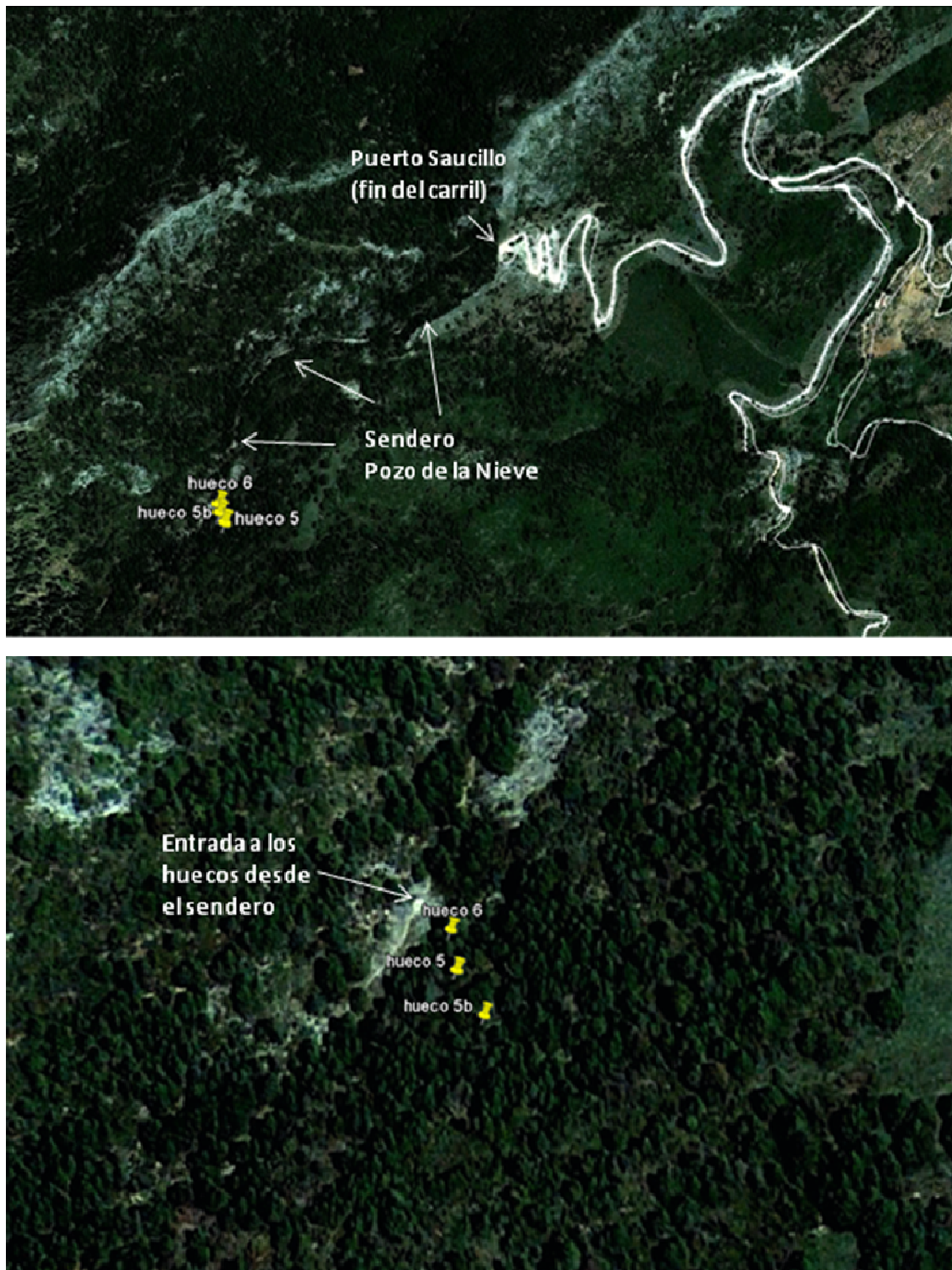


**Figura VI.6.** Serie de vegetación *Paenio broteroi* – *Abieteto pinsapi* S. (pinsapares), faciación calcícola. Tomado de Cabezudo *et al.* (1998). 1. *Chaenorrhino villosae* – *Campanuletum mollis*. 2. *Centaureo baetici* – *Carlinetum corymbozae*. 3. Comunidad de *Cistus laurifolius*. 4. Comunidad de *Helichrysum italicum* subsp. *serotinum*. 6. *Rhamno pumili* – *Saxifragetum granatensis*. 12. *Paenio broteroi* – *Abietetum pinsapo*. 13. *Parietarietum judaicae*. 14. *Phlomidio lychnitidis* – *Brachypodietum ramosi (retusi)*. 16. *Stachydetum circinatae*. 17. Comunidad de *Geranium lucidum*. 18. *Astragalo nevadensis* – *Bupleuretum spinosi*. 19. Comunidad de *Crataegus monogyna*. 20. *Cytiso plumosi* – *Ulicetum baetici*. 21. Comunidad de *Poa bulbosa*. 22. *Seselido granatensis* – *Festucetum hystricis arenarietum erinacei*. 23. *Rhamno myrtifolii* – *Saxifragetum granatensis athamantetosum vayredani*. 24. *Sarcocapno baetici* – *Centaureetum clementei*. 25. *Medicago* – *Aegilopetum geniculatae*. 26. *Viola demetriae* - *Jonopsidietum prolongoi*. 27. *Pruno mahalebo* – *Berberidetum hispanicae*.

En la **Tabla VI.1** se muestra las coordenadas UTM adscritas al centro de cada hueco, su orientación y altitud. Los tres son de tamaño mediano, según las clasificaciones de distintos autores, como Coates (1999) o Albanesi *et al.* (2008).

**Tabla VI.1.** Coordenadas UTM, orientación y altitud (en m.s.n.m.) en las parcelas seleccionadas.

	hueco nº 5b	hueco nº 5	hueco nº 6
<b>Coordenadas UTM</b>	30 S 0324042 4065494	30 S 0324036 4065508	30 S 0324036 4065520
<b>Orientación</b>	NW 308	NW 312	NW 310
<b>Altitud</b>	1210 m	1207 m	1204 m



**Figura VI.7.** Localización de las parcelas de estudio. En las imágenes se muestra el carril que conduce desde Yunqueira a Puerto Saucillo (arriba) y el sendero que hay que tomar hasta llegar a los tres huecos (debajo).



**Figura VI.8.** El carril que conduce a Puerto Saucillo visto desde el mirador de éste. Al fondo, Sierra Cabrilla y Sierra Prieta, y a sus pies, tapado por la niebla matinal, el pueblo de Yunquera.



**Figura VI.9.** El sendero del Pozo de la Nieve, a medio camino entre Puerto Saucillo y el lugar en el que se localizaron las “parcelas” de estudio.



**Figura VI.10.** Aspecto que presentaba el borde superior del hueco 5b tras la colocación de las cuerdas de nylon en paralelo. Nótese la transición entre la zona sombreada, bajo el dosel, y la zona más expuesta, en el centro del claro.

Una vez establecidos los límites de cada parcela, se procedió a su caracterización, identificando las especies que aparecían y su posición, tomando como referencia la malla establecida. Para cada cuadrícula se determinaron las siguientes variables: coordenadas X e Y sobre un sistema cartesiano con origen de coordenadas en el punto más septentrional de la parcela, porcentaje de cobertura, y presencia/ausencia de distintas especies del matorral acompañante (*Ulex baeticus*, *Rubia peregrina*, *Daphne laureola*, *Helleborus foetidus*, *Juniperus oxycedrus*, *Rosa canina*, *Cistus albidus*, *Phlomis* sp., **Figura VI.11**). Además, cada cuadrícula se asignó a una categoría distinta atendiendo a si estaba en el claro, bajo el dosel o en la zona de transición entre ambos. Esta clasificación previa, llevada a cabo *de visu* en el campo, fue respaldada por el registro de los niveles de irradiancia en los huecos efectuado *a posteriori*, en julio de 2007: las distintas unidades espaciales se asignaron a dosel, cuando el nivel de PAR registrado no superó los  $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; a claro, cuando el nivel fue superior a los  $450 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; y a la zona de borde, cuando el nivel se mantuvo entre ambos límites. Para las tres categorías, se comprobó que ambas clasificaciones coincidían en la mayor parte de los casos.



**Figura VI.11.** Una de las especies de matorral más abundante en las parcelas de estudio fue *Ulex baeticus* (a la izquierda). A la derecha, ejemplar de *Cistus albidus*.

### VI.2.3. Localización y selección de individuos juveniles de *Abies pinsapo*. Medidas de crecimiento y caracterización ecofisiológica.

Todos los individuos juveniles de *Abies pinsapo* hallados en las parcelas fueron marcados y localizados respecto al sistema mallado de referencia. En cada uno de ellos se midió el diámetro del fuste a nivel basal y la altura, y se hizo una estima de su edad mediante el conteo de las brácteas internodales que separan los tramos de edad de las ramas en esta especie, lo que permitió dividirlos en cuatro clases de edad (1-2 savias, 3-5, 6-10 y más de 10). Para caracterizar su microambiente, también se consideró si el individuo se encontraba bajo el dosel, en la zona de transición entre el dosel y el claro, o en el interior del claro, acompañado por una cobertura de matorral inferior al 50 % (clase “suelo desnudo”), o superior al 50 % (clase “matorral”) (**Figura VI.12**). El crecimiento anual promedio de cada individuo se calculó midiendo la longitud de los tramos correspondientes a los seis últimos años, en dos ramas con distinta exposición, siempre que fue posible.

Para realizar el seguimiento de la dinámica estacional de distintas variables ecofisiológicas, se tomó un subconjunto del total de individuos encontrado, considerando como criterios de selección la edad del individuo, el microambiente en que se encontraba y su posición relativa respecto al centro de cada parcela y al eje norte-sur de la misma, dado que las variaciones en el nivel de recursos y condiciones microclimáticas pueden ser especialmente significativas a lo largo de este gradiente, según Coates (2000). En base a estos criterios, y de forma que estuviesen representados

de forma equitativa todos los niveles considerados de los factores indicados, se seleccionaron 55 individuos distribuidos en seis microambientes diferenciados (dosel norte, borde norte, claro con suelo desnudo, claro con matorral, borde sur y dosel sur), con una edad comprendida entre los 5 y los 10 años, resultando 3-4 individuos por microambiente, en cada una de las tres parcelas. En estos individuos se midieron distintas variables relacionadas con la fijación de carbono, el estatus hídrico y la eficiencia en el uso de recursos (Tabla VI.2). En las Secciones VI.2.7, VI.2.8 y VI.2.9 de este capítulo se encuentra una descripción detallada de cómo se registraron estas variables.



**Figura VI.12.** Los individuos juveniles hallados en las “parcelas” fueron censados, señalizados y localizados respecto al sistema de referencia mallado. A la izquierda, individuos del claro que aparecen entremezclados con especies del matorral como *Ulex baeticus* o *Rubia peregrina*. A la derecha, individuos localizado también en el claro pero sobre lo que denominamos “suelo desnudo”.

#### VI.2.4. Dinámica estacional de variables abióticas: humedad del sustrato y luz incidente.

Para caracterizar ambientalmente las parcelas, se midieron en tres momentos distintos del año, la humedad del sustrato y la cantidad de luz incidente, tanto a ras de suelo

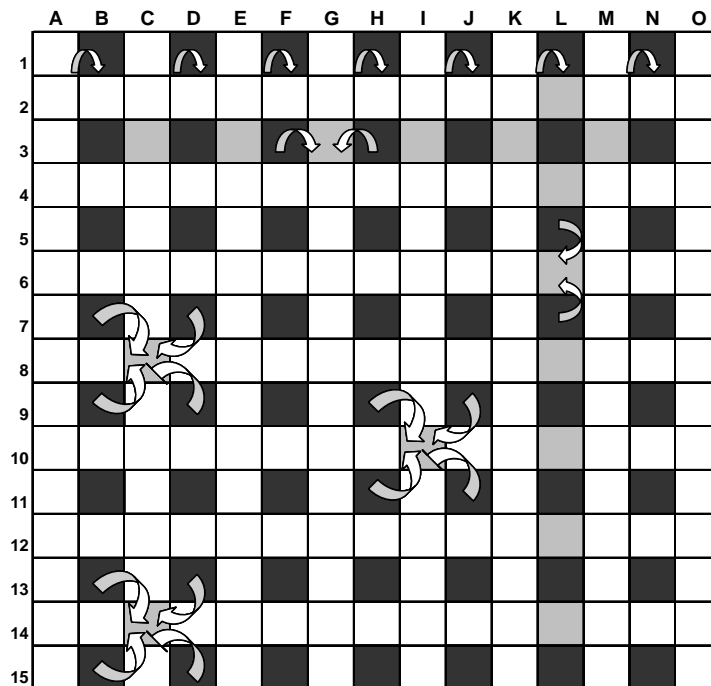
como a nivel del matorral (a un metro del suelo, aproximadamente). Para describir adecuadamente la cantidad de agua disponible en el sustrato, se optó por diferenciar entre el contenido en humedad del propio suelo y el del horizonte más superficial del mismo, compuesto por una mezcla de suelo y hojarasca, en los puntos en que hubiese una clara distinción entre ambos.

**Tabla VI.2.** Variables medidas en una selección de individuos juveniles de los seis microambientes diferenciados y unidades de medida de las mismas.

Variables	Unidades
Fotosíntesis neta ( $A_n$ )	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Conductancia estomática al agua ( $g_s$ )	$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Concentración intercelular de $\text{CO}_2$ ( $C_i$ )	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$
Eficiencia intrínseca en el uso del agua ( $iWUE$ )	$\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol H}_2\text{O}$
Eficiencia relativa instantánea en el uso de la luz ( $irLUE$ )	$\mu\text{mol CO}_2 / \mu\text{mol fotón}$
Potencial hídrico xilemático ( $\Psi$ )	bares
Tasa de crecimiento promedio (elongación de ramas)	cm / año
Contenido foliar en azúcares libres de bajo peso molecular	% (en p.s.)
Contenido foliar en almidón	% (en p.s.)
Contenido foliar en carbohidratos no estructurales	% (en p.s.)

Las cuatro variables descritas (denominadas en adelante “%H hojarasca”, “%H suelo”, “PAR incidente” y “PAR suelo”) se midieron respectivamente a primera hora de la mañana y en torno al mediodía. Se necesitaron entre 3 y 4 días consecutivos para completar el registro de estas variables en cada ocasión. Las medidas se tomaron en puntos localizados en nodos alternos de la malla superpuesta sobre las parcelas. Para poder relacionar posteriormente estas variables ambientales con aquéllas medidas sobre las cuadrículas, los valores encontrados en los nodos se adscribieron a la cuadrícula más próxima en dirección sur (situada por encima y a la derecha de los nodos empleados; **Figura VI.13**, casillas de color gris oscuro).

En las cuadrículas para las que no se disponía de datos experimentales, se asignó un valor mediante la interpolación de los valores adscritos a las cuadrículas más próximas (las de ambos lados, la inmediatamente superior e inferior, o las situadas alrededor, según la posición de la casilla; **Figura VI.13**, casillas de color gris claro).



**Figura VI.13.** Representación esquemática de la forma en que se relacionaron los nodos alternos del sistema mallado, sobre los que se midieron el PAR incidente y la humedad en el sustrato, con las cuadrículas empleadas como unidades espaciales de referencia para el resto de variables medidas.

*VI.2.5. Análisis espacial de variables abióticas y bióticas. Empleo de SADIE y de ClusterShell.*

Partiendo de los valores registrados de distintas variables abióticas (las cuatro relacionadas con el PAR y la humedad del sustrato) y bióticas (presencia de juveniles de pinsapo, tasa de crecimiento promedio, porcentaje de cobertura de matorral), se empleó el análisis espacial basado en índices de distancia del *software* SADIE y módulos afines (SADIEShell v. 1.22., K.F. Conrad e IACR-Rothamsted, Reino Unido, 2001) (Perry *et al.* 1996) para obtener índices de agregación global ( $I_a$ , *index of aggregation*) y local ( $v$ , *index of clustering* o índice de agrupamiento). Estos índices permiten conocer, respectivamente, el patrón espacial que muestra cada una de las variables estudiadas, y en qué medida cada unidad espacial contribuye a la heterogeneidad u homogeneidad halladas, es decir, el grado de heterogeneidad espacial a pequeña escala con que se manifiestan estas variables en cada momento del tiempo.

Además, y empleando únicamente datos de presencia/ausencia de juveniles de pinsapos, adscritos a una malla rectangular, se empleó el paquete ClusterShell, afín a SADIE, para conocer la posición y composición de los *clusters* existentes en el conjunto de datos suministrado; es decir, los conjuntos de cuadrículas caracterizados por la homogeneidad en su composición, respecto a otras zonas en los que la variable medida cambia a una escala muy fina.

*VI.2.6. Asociación espacial entre pares de variables. Variación estacional de la heterogeneidad espacial a pequeña escala. Empleo de N y de Association Extractor.*

Además de analizar por separado el patrón espacial de las variables consideradas, SADIE permite analizar conjuntamente pares de variables que hayan sido tomadas en las mismas coordenadas, para conocer la existencia de relaciones de asociación/disociación entre ambas (e.g. Maestre y Cortina, 2002), o bien para analizar distintos registros de una misma variable para ver cómo cambia ésta a lo largo del tiempo (e.g. Conrad *et al.* 2006).

En nuestro caso, se empleó la aplicación N\_a.exe (un módulo afín a SADIE) al objeto de conocer la existencia o no de asociación entre pares de variables registradas de forma espacialmente explícita (por ejemplo, la cantidad de agua disponible en el sustrato y la irradiancia incidente, la humedad del sustrato y la presencia de individuos juveniles, la irradiancia incidente y el crecimiento anual promedio encontrado en los individuos, etc.).

Tomando como datos de partida los valores del *index of clustering* calculados de forma previa, N\_a.exe permite comparar pares de conjuntos de datos, y conocer en qué medida son similares ambos patrones espaciales, generando en este proceso índices de asociación espacial a nivel local y global. Además, la aplicación lleva a cabo simultáneamente una simulación mediante aleatorización cuyo resultado, en forma de valores límite correspondientes a distintos niveles de significación, permite comprobar estadísticamente la relevancia de los valores obtenidos para ambos índices.

N\_a.exe se empleó asimismo para comparar una misma variable medida en distintos momentos del tiempo (la irradiancia incidente, o la humedad disponible en el sustrato, que fueron medidas en distintas estaciones), lo que permitió concluir sobre la existencia de cambios significativos en el tiempo para esa variable.

#### VI.2.7. Contenido xilemático en carbohidratos no estructurales.

Se hizo un seguimiento de la dinámica estacional del contenido en carbohidratos no estructurales (NSC, *non-structural carbohydrates*), al objeto de evaluar en qué medida las condiciones microambientales en que se encuentran los individuos juveniles pueden determinar la cantidad de C fijado y el porcentaje de dicho suministro que estos individuos podrían destinar a crecer. Este contenido a menudo se interpreta como un indicador del nivel de suministro de C de que goza cada individuo, y como estimador de la bondad del microambiente, entendida ésta en términos de los requerimientos/necesidades energéticas de los individuos.

Las muestras se tomaron en tres momentos distintos del año: a principios de mayo, antes de la ruptura de las yemas; a finales de julio, justo tras concluirse la fase de elongación de los brotes nuevos; y a principios de noviembre, al finalizar la estación de crecimiento. Se tomaron muestras en los tramos de ramas correspondientes a edades de 3 y 4 años, y en un plazo máximo de seis horas tras su recolección, se procedió a desnaturalizar las enzimas presentes en las muestras siguiendo las recomendaciones de Popp *et al.* (1996), mediante choque térmico en un horno microondas (600 W de potencia, durante 90 s). Posteriormente, las muestras se secaron en una estufa a 75° C hasta peso constante. Una vez secas, se eliminaron las acículas y la corteza, y se redujeron a un polvo muy fino mediante un molino de bolas, diferenciando entre el xilema correspondiente al tercer y al cuarto año. Las muestras así preparadas se conservaron en un recipiente hermético, sobre un lecho de gel de sílice y a 4 °C, hasta su empleo en los análisis. La muestra analizada finalmente se compuso a partir de una cantidad conocida del xilema de ambas edades.

La descripción de cómo se analizó el contenido en azúcares libres de bajo peso molecular, en almidón y carbohidratos no estructurales totales se encuentra en la **Sección II.3.3 del Capítulo 2** de esta memoria, dedicado a “Material y Métodos”.

#### VI.2.8. Potencial hídrico xilemático.

La descripción detallada de cómo se midió el potencial hídrico xilemático ( $\Psi$ ) en los juveniles seleccionados se encuentra en la **Sección II.3.5 del citado Capítulo 2**. Esta variable se midió a primera hora de la tarde, los mismos días en que se tomaron las medidas de intercambio gaseoso.

### VI.2.9. Medidas de intercambio gaseoso

En los individuos seleccionados (ver **Sección VI.2.3**) se midieron las tasas instantáneas de intercambio gaseoso, al objeto de conocer la variabilidad estacional de variables como la fotosíntesis neta o la conductancia estomática al agua, y las diferencias que pudiesen exhibir los individuos localizados en los distintos microambientes, respecto a su capacidad de fijación de C y su eficiencia en el uso del agua o de la luz incidente. En definitiva, para conocer hasta qué punto las características de los distintos microambientes condicionan la cantidad de C fijado por los individuos, y por ende, su crecimiento y supervivencia a largo plazo.

Estas medidas de intercambio gaseoso, bajo las condiciones propias de cada uno de los microambientes, se tomaron en las horas centrales de la mañana. Generalmente fueron necesarios 3-4 días consecutivos sin lluvia y con condiciones atmosféricas similares para completar las medidas en cada ocasión. Mediante el empleo de un IRGA portátil, modelo LI – 6400 acoplado a una cámara de coníferas modelo LI – 6400 – 05 (LiCor Inc., Lincoln, Nebraska, EE.UU.), se registraron, simultáneamente, las tasas instantáneas de fotosíntesis (tasa neta de fijación de C,  $A_n$ ) y de conductancia estomática al agua ( $g_s$ ). Este dispositivo también proporcionó la concentración intercelular de  $CO_2$ , cuyo cálculo se detalla en la **Sección II.3.6.1** del Capítulo 2.

A partir de estas variables “directas”, se calcularon, además, el ratio entre la tasa neta de fijación de carbono y de conductancia al agua, y el ratio entre la tasa neta de fijación de carbono y la cantidad de irradiancia PAR incidente. El primero es la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE, del inglés *intrinsic water-use efficiency*) por parte de un individuo, y a diferencia de la eficiencia en el uso del agua (WUE, el cociente entre el incremento de biomasa aérea (crecimiento) o de C (fotosíntesis) y la pérdida de agua por transpiración (Lambers *et al.* 1998)), se considera menos condicionada por los valores instantáneos de temperatura y humedad ambientales, de ahí que refleje más fielmente propiedades fisiológicas del individuo (Comstock y Ehleringer, 1992; Jones, 1992; Yu *et al.* 2005).

El cociente entre la tasa instantánea de fijación de C y la cantidad de irradiancia PAR incidente, registradas en paralelo, se puede considerar una medida de la eficiencia relativa instantánea en el uso de la luz por parte del individuo, a partir de la ecuación propuesta por Gamon *et al.* (2001). La elección de esta variable está relacionada con la

decisión de tomar las medidas de intercambio gaseoso en el microambiente propio de cada individuo, cualquiera que fuese el ambiente lumínico que lo caracterizase en cada momento del tiempo. Dado que la cantidad de irradiancia PAR es muy variable entre microambientes, comparar directamente la cantidad de C fijado por los individuos no es tan representativo de las características propias de los individuos de cada microambiente como la capacidad de usar este recurso de una forma eficiente bajo distintas condiciones lumínicas.

Se emplearon, siempre que fue posible, tramos de un año de edad, con acículas maduras. Los datos se registraron durante 5 minutos por individuo, con una frecuencia de 5 segundos. Una vez tomadas las medidas, se escindieron los tramos empleados en cada caso para medir su área foliar real, y poder así expresar los resultados obtenidos en función de la misma.

#### VI.2.10. Tratamiento gráfico y estadístico de los datos.

##### VI.2.10.1. Análisis espacial de variables ambientales y no ambientales.

Los resultados de los análisis espaciales efectuados sobre distintas variables ambientales (básicamente índices de agregación y de asociación locales proporcionados por SADIE y por *Association Extractor (N\_a.exe)* para los registros del PAR y la humedad del suelo) se han representado mediante gráficos de superficie elaborados con Surfer 8 (Golden Software Inc., 1993-2002.)

La descripción del patrón espacial de las poblaciones de juveniles se apoyó, además de en SADIShell y ClusterShell, en el cálculo del índice de dispersión de Blackman (I):

$$I = \frac{S^2}{\bar{X}} \quad (13)$$

donde  $S^2$  es la varianza, y  $\bar{X}$  el promedio, de cada “población” considerada (los individuos hallados en cada una de las “parcelas”). De acuerdo con este índice, se considera una distribución agregada aquella para la que I es significativamente mayor que la unidad, una distribución regular si I es significativamente mayor que 1, y una distribución al azar cuando I no es significativamente distinto de 1 (Blackman, 1942).

Para evaluar el grado de asociación entre la presencia de individuos juveniles de *Abies pinsapo* y la presencia de otras especies, se empleó el test de  $\chi^2$  sobre una tabla de contingencia de 2 vías. En cuanto al análisis espacial de los datos (patrón espacial de distribución, evaluación de la heterogeneidad ambiental a pequeña escala, asociación entre pares de variables espacialmente explícitas, cuantificación de la variabilidad estacional en variables espacialmente explícitas...), se empleó el *software* basado en los principios de SADIE, con un nivel de significación del 95%.

#### *VI.2.10.2. Tratamiento de las variables ecofisiológicas.*

Cada una de las variables ecofisiológicas registradas (intercambio gaseoso, concentración intercelular de CO<sub>2</sub>, eficiencia en el uso del agua y de la luz, contenido en carbohidratos no estructurales – azúcares libres, almidón y totales – y potencial hídrico), se analizó mediante un ANOVA anidado de medidas repetidas para explorar la existencia de diferencias significativas a lo largo del tiempo entre los microambientes de las tres parcelas. Todos los análisis incluyeron los microambientes como efecto principal fijo, y los árboles encontrados en cada hueco como un factor aleatorio anidado dentro del principal, y fueron llevados a cabo con un GLM. El test post-hoc de Tukey HSD se empleó para realizar comparaciones múltiples cuando se encontraron diferencias significativas entre distintos tiempos. El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo con Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 1984-2004). El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95%. De forma previa a cualquier análisis estadístico, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de las varianzas de Cochran, respectivamente. En los casos en que no se cumplieran ambas condiciones, se procedió a la transformación de los datos (Zar, 1999).

Para el conjunto de todas las variables ecofisiológicas registradas en cada momento del tiempo, se efectuó un análisis de componentes principales, al objeto de generar un espacio de fases en el cual, la posición de los distintos individuos en el mismo estuviese determinada por el comportamiento que éstos presentan respecto a las variables seleccionadas para el análisis, representativas en su conjunto del comportamiento ecofisiológico que presentan los individuos hallados en cada microambiente. Este tipo de análisis se realizó tomando como casos los valores medios de las variables registrados por hueco y microhábitat. Para evitar el empleo de

información redundante, como paso previo se exploraron las correlaciones entre variables con SigmaPlot 8.0 (Systat Software Inc., 2006), lo que redujo el número de variables a incluir en el análisis a cinco (tasa neta de fotosíntesis, eficiencia intrínseca en el uso del agua (*iWUE*), eficiencia intrínseca relativa en el uso de la luz (*irLUE*), potencial hídrico xilemático y contenido total en carbohidratos no estructurales).

#### VI.2.10.3. Análisis conjunto de variables ambientales y espaciales.

Considerando el marcado carácter espacial de los procesos de regeneración natural, y la existencia de notables gradientes ambientales en los tres huecos estudiados, se optó por llevar a cabo análisis que permitiesen incluir todas las variables simultáneamente, y que recogiesen la fuerte heterogeneidad espacial y temporal de las variables registradas. Además, y teniendo en cuenta la localización en el espacio de estos huecos, adyacentes entre sí a lo largo de una misma ladera, se optó por considerarlos para estos análisis como una única unidad espacial continua, aumentando así el número de réplicas y la potencia estadística.

En primer lugar, mediante una traslación lineal de los ejes de coordenadas preexistentes, correspondientes a cada uno de los huecos, se recalcularon las coordenadas de las distintas cuadrículas (empleadas como referencia para el registro del porcentaje de cobertura de matorral y la presencia de otras especies acompañantes), y se determinó la posición de los individuos juveniles de pinsapo censados respecto al nuevo sistema de referencia, único para los tres huecos. Asimismo, se recalculó la posición espacial de los puntos de muestreo de las variables ambientales monitorizadas en los tres momentos del tiempo (disponibilidad de PAR y porcentaje de humedad en el suelo), así como de los juveniles seleccionados para el seguimiento de las variables ecofisiológicas medidas simultáneamente (nuevas coordenadas X e Y) (**Tabla VI.2**).

A partir de esta información, se obtuvo la “versión espacial” del resto de variables mencionadas, usando nuevamente SADIE. En particular, usamos uno de los índices generados por este método, el *index of clustering* ( $v$ ) o índice de agrupamiento, que proporciona el grado de agrupamiento de los datos en “parches” (áreas donde hay una mayor concentración, con valores de  $v$  - por convenio,  $v_i$  - mayores de 1.5) y en “huecos” (áreas de baja concentración, con valores de  $v$  - por convenio,  $v_j$  - inferiores a -1.5, y cuya representación en un mapa de dos dimensiones permite conocer el tipo de distribución espacial de la variable estudiada.

Se llevó a cabo un análisis SADIE independiente para cada una de las variables consideradas en el estudio, usando el *software* SADIEShell versión 1.22 (Kelvin F. Conrad e IACR-Rothamsted, 2001) con un mismo número de permutaciones (2340 permutaciones). En el caso de la presencia de individuos juveniles de pinsapo y del resto de especies acompañantes, se emplearon como datos los valores brutos de presencia /ausencia (1/0). En el caso del PAR, el porcentaje de humedad en el sustrato, y el porcentaje de cobertura de matorral, se emplearon los valores enteros de dichas variables de acuerdo con los requisitos del análisis con SADIE. El índice de agrupamiento calculado así para cada variable (y cada momento del tiempo, en su caso) se considera en este trabajo su “versión espacial”, constituyendo en conjunto el grupo de variables espaciales, frente a las variables originales, consideradas puramente “ambientales”.

Para evaluar la existencia de una relación funcional entre la presencia de individuos juveniles y las variables “ambientales” y “espaciales” especificadas, se llevó a cabo una regresión logística (Hosmer y Lemeshow, 1989; Maestre *et al.* 2003), y se realizó la partición de la varianza siguiendo el método de Borcard *et al.* (1992), para evaluar la importancia relativa de los distintos grupos de variables. Así, se desarrollaron modelos construidos únicamente sobre variables ambientales (las registradas originalmente), sobre variables espaciales (coordinadas e índices de agregación de las variables ambientales) y sobre ambos conjuntos de variables simultáneamente, al objeto de conocer la fracción de la varianza explicada atribuible al efecto “puro” de las primeras (fracción a), al efecto “puro” de las segundas (fracción c), la explicada de forma compartida por ambos conjuntos (fracción b), y la varianza no explicada ni por variables ambientales ni por variables espaciales (fracción d). Para calcular estas fracciones, se llevaron a cabo los siguientes análisis: una regresión logística de la presencia/ausencia determinada por una matriz de variables ambientales (W, 12 columnas x 727 filas), que extrajo la fracción de varianza  $a+b$ ; una regresión logística de la presencia/ausencia en función de una matriz de variables espaciales (X, 14 columnas x 727 filas), que proporcionó la fracción de varianza  $b+c$ ; y una regresión logística de la presencia/ausencia determinada por W y X simultáneamente, que extrajo la fracción de varianza  $a+b+c$ . En la **Tabla VI.3** se indican las variables que constituyeron las matrices X y W. Los análisis fueron realizados con PASW Statistics 18 (IBM Corporation, 2009). En cada uno de ellos, se empleó el estadístico  $R^2$  de Nagelkerke (Nagelkerke, 1991) para cuantificar la proporción de variación explicada.

Las fracciones individuales se obtuvieron conforme a lo descrito en Legendre y Legendre (1998). Los análisis se repitieron para los tres momentos del tiempo (primavera, verano e invierno). La bondad del ajuste de los distintos modelos construidos se evaluó mediante un contraste  $\chi^2$ -cuadrado (Hosmer y Lemeshow, 1989). Para la construcción de cada modelo, las variables fueron introducidas mediante una selección por pasos hacia delante (*forward stepwise selection*), empleando como niveles de significación a la entrada y a la salida 0.05 y 0.10, respectivamente. Para evaluar la importancia de cada variable considerada individualmente, se empleó el estadístico de Wald.

De forma previa a cualquier análisis, se comprobó la normalidad de las variables independientes – salvo las de tipo binario –, a pesar de no ser una asunción de la regresión logística (Tabachnick y Fidell, 2007). Asimismo, se comprobó la posible colinearidad entre las variables ambientales, llevando a cabo múltiples regresiones lineales entre pares de variables relacionadas.

**Tabla VI.3.** En la columna de la izquierda, las variables “ambientales”, medidas en campo. En la columna derecha, su versión “espacial”, el correspondiente índice de agrupamiento obtenido mediante SADIE. Tanto el PAR (suelo e incidente) como el porcentaje de humedad (en suelo y en hojarasca) fueron medidos en primavera y verano de 2007, y en invierno de 2008.

VARIABLES “ambientales” (matriz W)	VARIABLES “espaciales” (matriz X)
PAR suelo	vPAR suelo
PAR incidente	vPAR incidente
% H suelo	v% H suelo
% H hojarasca	v% H hojarasca
% cobertura de matorral	v% cobertura de matorral
Presencia de <i>Ulex</i>	vPresencia de <i>Ulex</i>
Presencia de <i>Rubia</i>	vPresencia de <i>Rubia</i>
Presencia de <i>Daphne</i>	vPresencia de <i>Daphne</i>
Presencia de <i>Helleborus</i>	vPresencia de <i>Helleborus</i>
Presencia de <i>Juniperus</i>	vPresencia de <i>Juniperus</i>
Presencia de <i>Rosa</i>	vPresencia de <i>Rosa</i>
Presencia de <i>Phlomis</i>	vPresencia de <i>Phlomis</i>
--	Coordenada X
--	Coordenada Y

En cuanto a la actividad ecofisiológica de los brinzales de pinsapo, estimada a partir de distintas variables fisiológicas medidas en individuos seleccionados en tres estaciones distintas, se llevó a cabo un análisis de redundancia (RDA) para conocer hasta qué punto la forma en que estos individuos se desenvuelven en campo puede explicarse a través de los grupos de variables ambientales y espaciales antes

mencionados. Así, se llevaron a cabo análisis de redundancia (Zuur *et al.* 2007), en los que se consideraron todas las variables fisiológicas como variables respuesta (en adelante, Y), y se incluyeron las variables ambientales y espaciales de la **Tabla VI.3** como dos grupos diferenciados de variables explicativas (en adelante, W y X, respectivamente). Para estos análisis, ambas matrices contaron con un número de filas notablemente inferior (55 frente a las 727 del anterior análisis), al restringirse los datos a los puntos en que se encontraban los individuos seleccionados para las distintas medidas.

Para obtener la contribución relativa de las variables ambientales y espaciales al comportamiento ecofisiológico registrado, se llevó a cabo una partición de la varianza, calculándose la varianza total explicada, el efecto puro de W, el efecto puro de X, la fracción de varianza explicada compartida por ambos grupos de variables (efecto compartido) y la cantidad de variación residual (fracción de la varianza no explicada). Este análisis se repitió para cada momento de tiempo. Para obtener las distintas fracciones de la varianza, se llevaron a cabo los siguientes análisis: *i*, en primer lugar, se realizó un análisis de redundancia (en adelante, RDA) sobre Y frente a X y W conjuntamente; a continuación, se realizaron dos RDA, sobre Y frente a X, y sobre Y frente a W; finalmente, se aplicó un análisis de redundancia parcial (pRDA) sobre Y frente a W, tomando X como covariables, y un pRDA sobre Y frente a X, tomando W como covariables. Usando la suma total de los valores propios que proporciona cada análisis (equivalente al valor  $R^2$  de una regresión), pueden calcularse el efecto puro de X, el efecto puro de Y, el efecto compartido y la variación residual como un porcentaje de la variación total (Zuur *et al.* 2007). Además, y para saber qué variable explicativa considerada individualmente fue la más importante, los análisis fueron llevados a cabo empleando una selección hacia delante de las variables. Este procedimiento proporciona los denominados efectos marginales (el valor propio que correspondería a cada variable en caso de haberse empleado ésta para la obtención de un primer y único eje (Zuur *et al.* 2007). En función de estos valores, pueden ordenarse de mayor a menor importancia las variables que contribuyen significativamente a explicar la varianza hallada en el comportamiento ecofisiológico exhibido por los individuos juveniles en función de la probabilidad del test (estadístico F).

Todos los análisis de redundancia se realizaron con Brodgar, versión 2.4.1 (Highland Statistics Ltd., 2005).

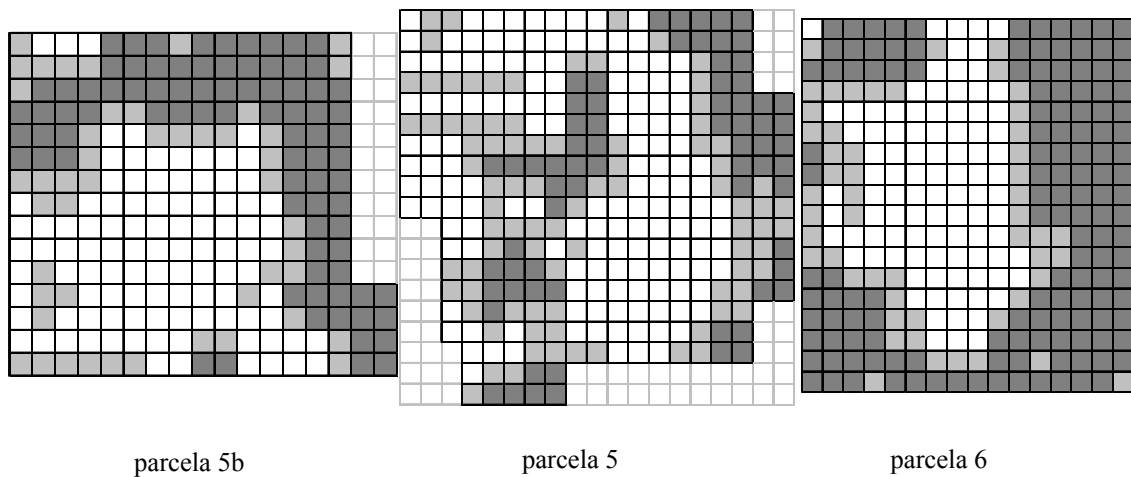
### VI.3. Resultados.

#### VI.3.1. Esfuerzo de muestreo y caracterización de las parcelas seleccionadas.

El esfuerzo de muestreo realizado en total en cada parcela, y la distribución de unidades espaciales entre el claro, el dosel y la zona de transición se muestra en la **Tabla VI.4**. En la **Figura VI.14** se representa gráficamente este reparto entre los distintos ambientes de las tres parcelas.

**Tabla VI.4.** Esfuerzo de muestreo bajo dosel, en el claro y en la zona de transición, y superficie total muestreada en cada una de las parcelas objeto de estudio.

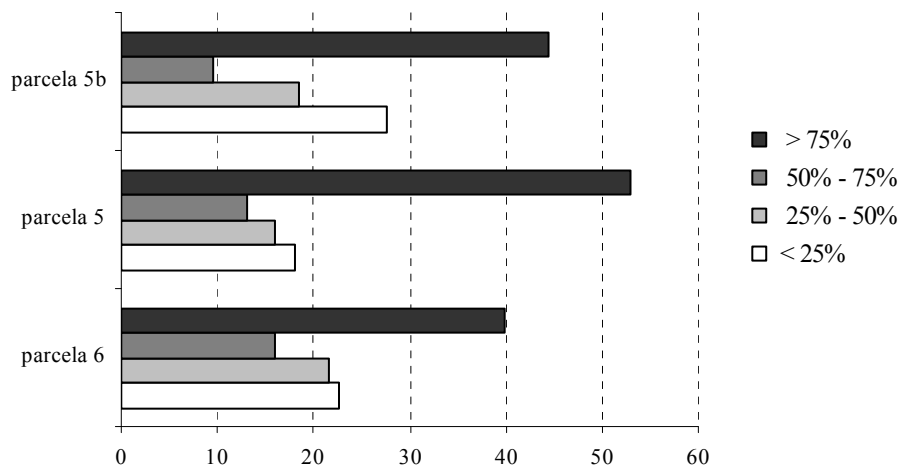
	Parcela 5b	Parcela 5	Parcela 6
Total	237 m <sup>2</sup>	304 m <sup>2</sup>	288 m <sup>2</sup>
Dosel	86 m <sup>2</sup>	67 m <sup>2</sup>	138 m <sup>2</sup>
Claro	102 m <sup>2</sup>	149 m <sup>2</sup>	96 m <sup>2</sup>
Borde	49 m <sup>2</sup>	88 m <sup>2</sup>	54 m <sup>2</sup>



**Figura VI.14.** Las tres “parcelas”, colocadas de mayor a menor altitud. Cada unidad del sistema reticulado equivale a 1 m<sup>2</sup>. Se muestra la distribución del dosel (en gris oscuro), del claro (en blanco) y de la zona de transición entre ambos (en gris claro).

La distribución de la cobertura de matorral acompañante, expresada en tanto por ciento respecto a la superficie de cada unidad de muestreo, aparece en la **Figura VI.15**. La mayor densidad de matorral se concentra en el interior de los claros, fundamentalmente en la zona norte de los mismos (**Figura VI.16**), lo cual era de esperar

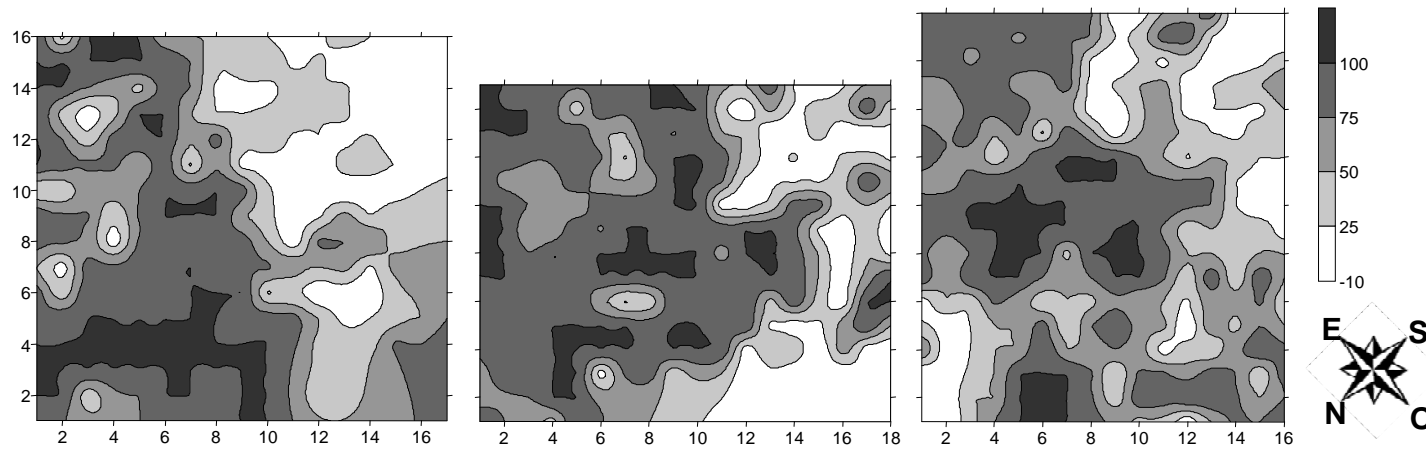
considerando que se trata de la zona más expuesta al sol, y que el matorral está dominado por especies heliófilas. En la **Figura VI.17**, se muestra la distribución y abundancia de los juveniles de *Abies pinsapo* censados en las tres parcelas; la presencia de las distintas especies de matorral acompañante, con referencia a la retícula superpuesta a las parcelas, se muestra en la **Figura VI.18** (a modo de ejemplo, se representa sólo el caso de la parcela 5b). Obsérvese que las dos especies más abundantes son la heliófila *Ulex baeticus* y la liana *Rubia peregrina* (**Tabla VI.5**).



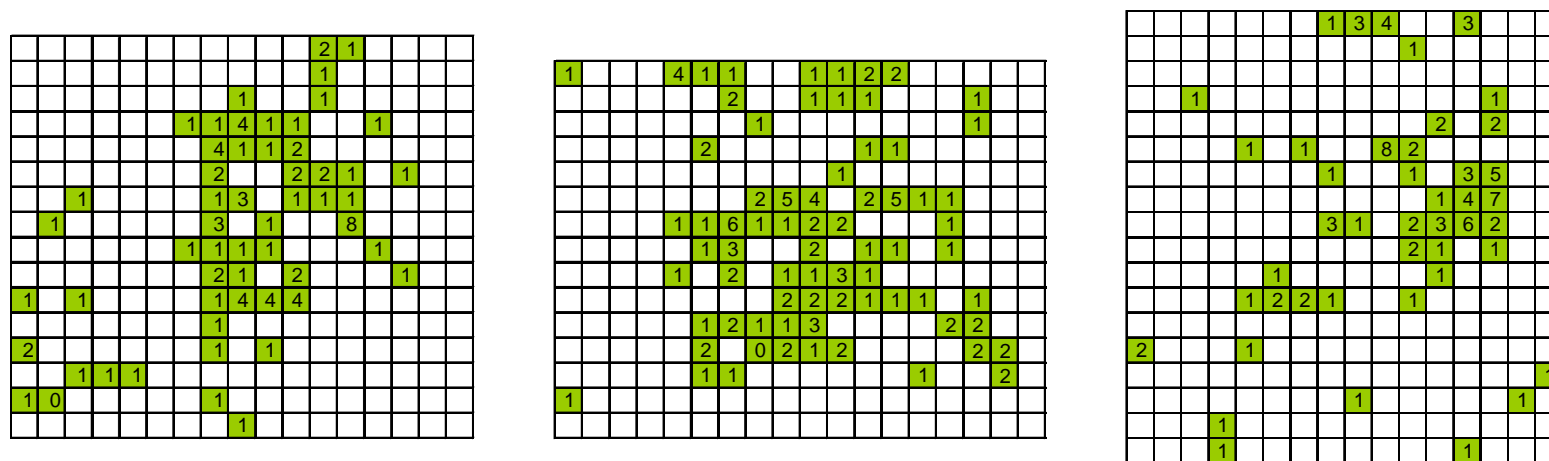
**Figura VI.15.** Distribución de las unidades espaciales de cada parcela en función del porcentaje de cobertura que supone la presencia tanto de juveniles de pinsapo como de distintas especies de matorral acompañante.

**Tabla VI.5.** Abundancia de juveniles de pinsapo, así como de las distintas especies de matorral presentes, expresada como porcentaje de unidades espaciales con presencia de la especie respecto del total de unidades espaciales en cada parcela.

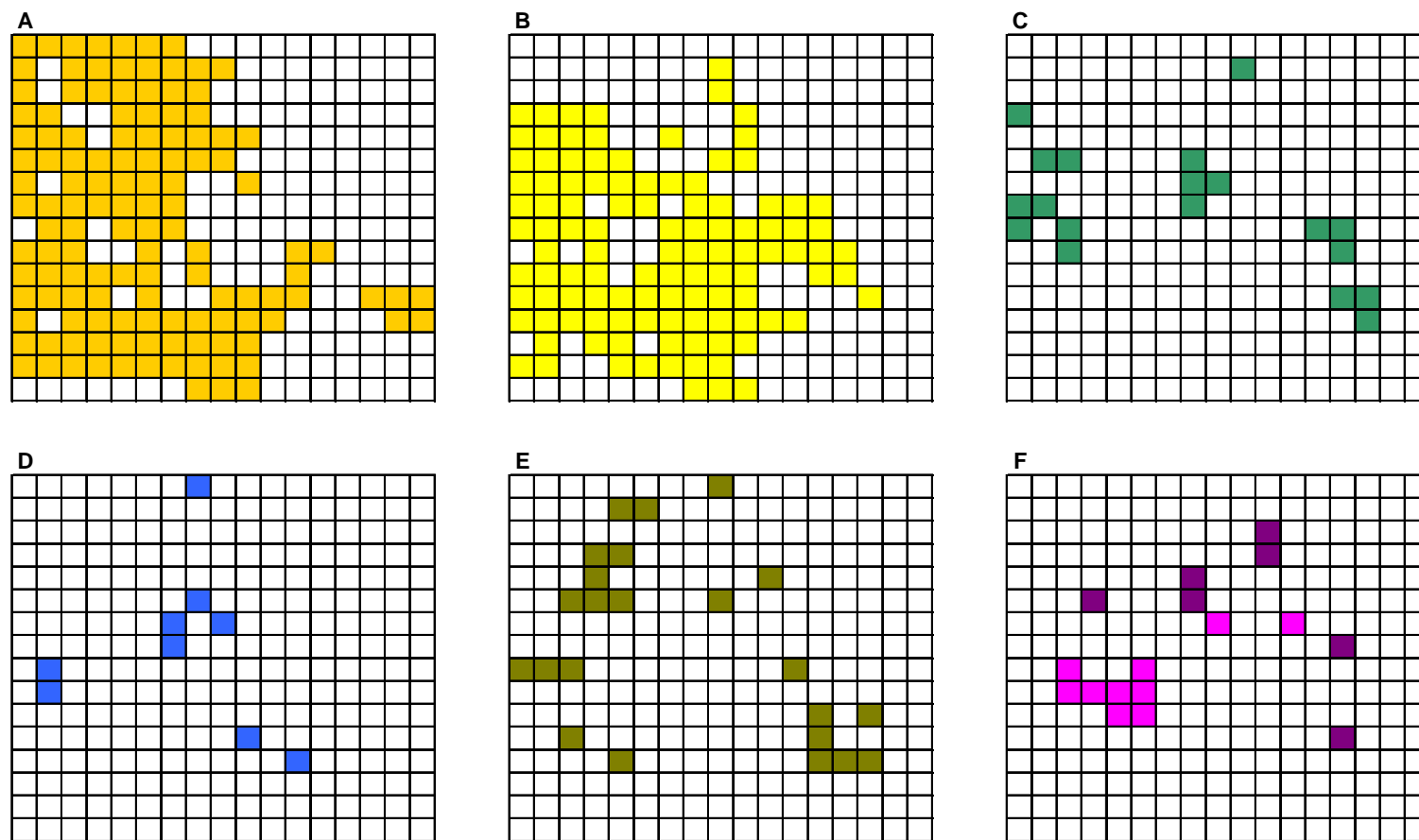
	parcela 5b	parcela 5	parcela 6
<i>Abies pinsapo</i>	21	27	15
<i>Ulex baeticus</i>	47	63	64
<i>Rubia peregrina</i>	40	49	37
<i>Daphne</i> sp.	7	7	7
<i>Helleborus foetidus</i>	3	4	12
<i>Juniperus oxycedrus</i>	8	4	3
<i>Rosa canina</i>	4	4	8
<i>Cistus albidus</i> + <i>Phlomis</i> sp.	3	5	8



**Figura VI.16.** Porcentaje de cobertura de matorral en las tres parcelas, colocadas de mayor a menor altitud. La mayor densidad de matorral, representada con los tonos más oscuros, aparece en el centro de las “parcelas”, coincidiendo con la zona de claro, más expuesta.



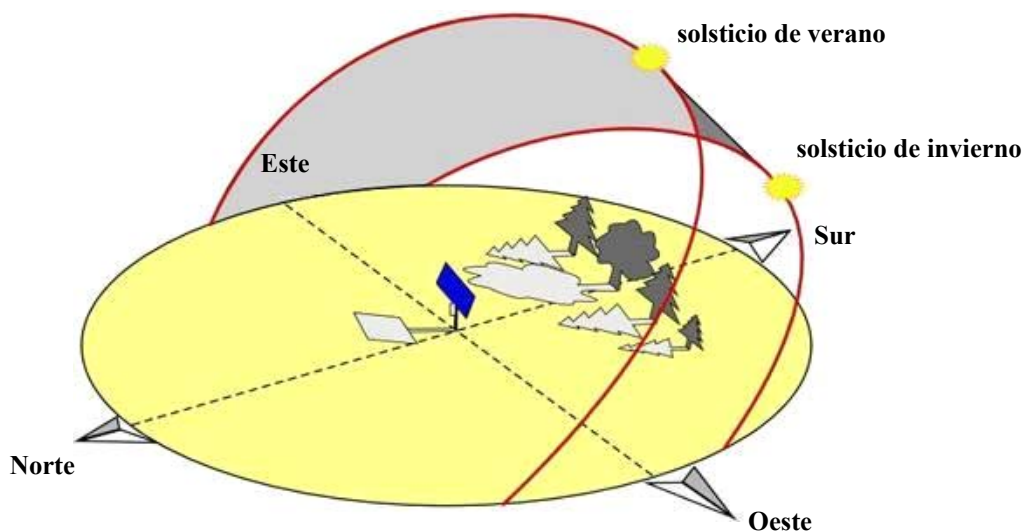
**Figura VI.17.** Distribución de la presencia de individuos de juveniles de *Abies pinsapo* en las distintas “parcelas”, con la misma disposición y orientación que en la **Figura VI.16**. Los valores indican la cantidad de individuos hallada en cada unidad de muestreo.



**Figura VI.18.** Distribución espacial de la presencia/ausencia de especies de matorral acompañante en la parcela 5b. A: Presencia de *Ulex baeticus*; B *Rubia peregrina*; C: *Daphne* sp; D: *Helleborus foetidus*; E: *Juniperus oxycedrus*; F: *Phlomis* sp. y *Cistus albidus* (en morado) y *Rosa canina* (en rosa)

### VI.3.2. Dinámica estacional de la luz incidente y la humedad del sustrato.

La cantidad de luz incidente en los claros, así como el porcentaje de su superficie afectado por niveles de luz similares a los de pleno sol, oscilaron notablemente con el paso de las estaciones. El área que recibe los niveles de luz más altos se encuentra siempre desplazada hacia el borde norte del hueco, como era de esperar considerando la geometría solar (Canham *et al.* 1990), el efecto de la inclinación y orientación de la parcela, y la influencia de los árboles próximos al borde del hueco (Albanesi *et al.* 2008; Coates, 2000) (**Figura VI.19**).



**Figura VI.19.** El recorrido del sol en la bóveda celeste varía con el paso de las estaciones. En el hemisferio norte, el arco trazado es máximo en el solsticio de verano, y mínimo en invierno. Obsérvese como, dada la inclinación de los rayos solares, la sombra de los árboles situados en el borde sur de la parcela se proyectaría en direcciones con componente norte, afectando sobre todo a la zona sur de la misma. Por el contrario, la sombra de los árboles situados en el borde norte de la parcela se proyectaría hacia fuera de la misma, internándose en el dosel forestal. Por tanto, si el tamaño de la parcela es suficiente en relación a la altura de los árboles de su borde, la zona norte de la misma permanece más expuesta al sol que la sur..

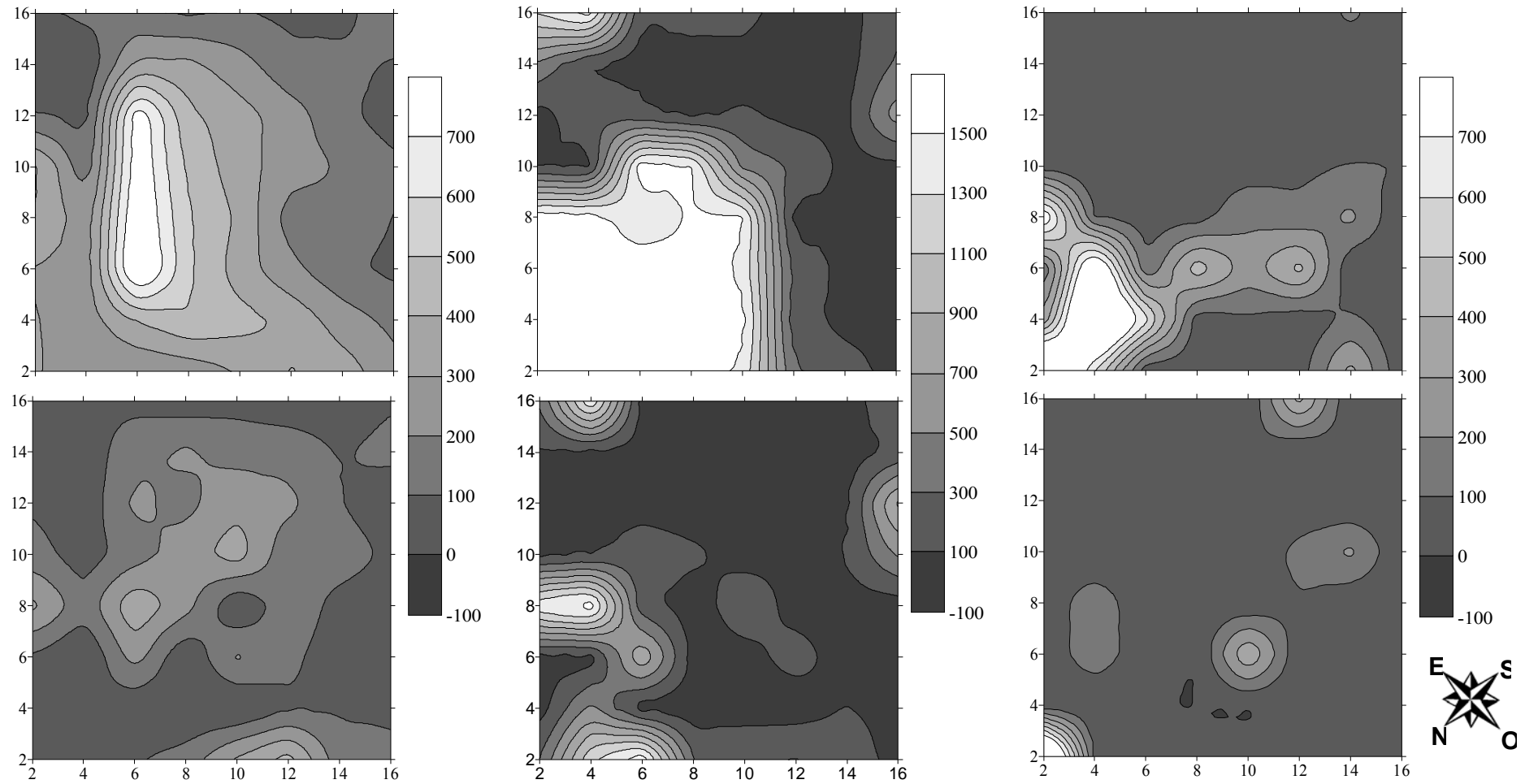
La evolución estacional de la irradiancia PAR incidente sobre las parcelas 5b, 5 y 6 se representa en las **Figuras VI.20, VI.21 y IV.22**, respectivamente. En cada caso, la fila superior de gráficas muestra la irradiancia incidente registrada sobre la superficie del matorral (aproximadamente a un metro del suelo); la fila inferior, la radiación incidente registrada a ras de suelo. Nótese cómo la proyección de los rayos solares tiende a desplazarse hacia la zona norte de las tres parcelas (esquina inferior izquierda de cada una de las gráficas), especialmente en los registros efectuados a un metro sobre el suelo.

Con SADIE, se exploró el grado de correlación entre los patrones espaciales hallados para ambas variables en los distintos momentos, al objeto de conocer en qué medida las condiciones ambientales de irradiancia eran susceptibles de cambiar significativamente con el transcurso de las estaciones. Estas correlaciones se exploraron para los tres posibles pares de conjuntos de datos: la irradiancia registrada en primavera y en verano, la registrada en verano y en invierno, y la registrada en primavera y en invierno.

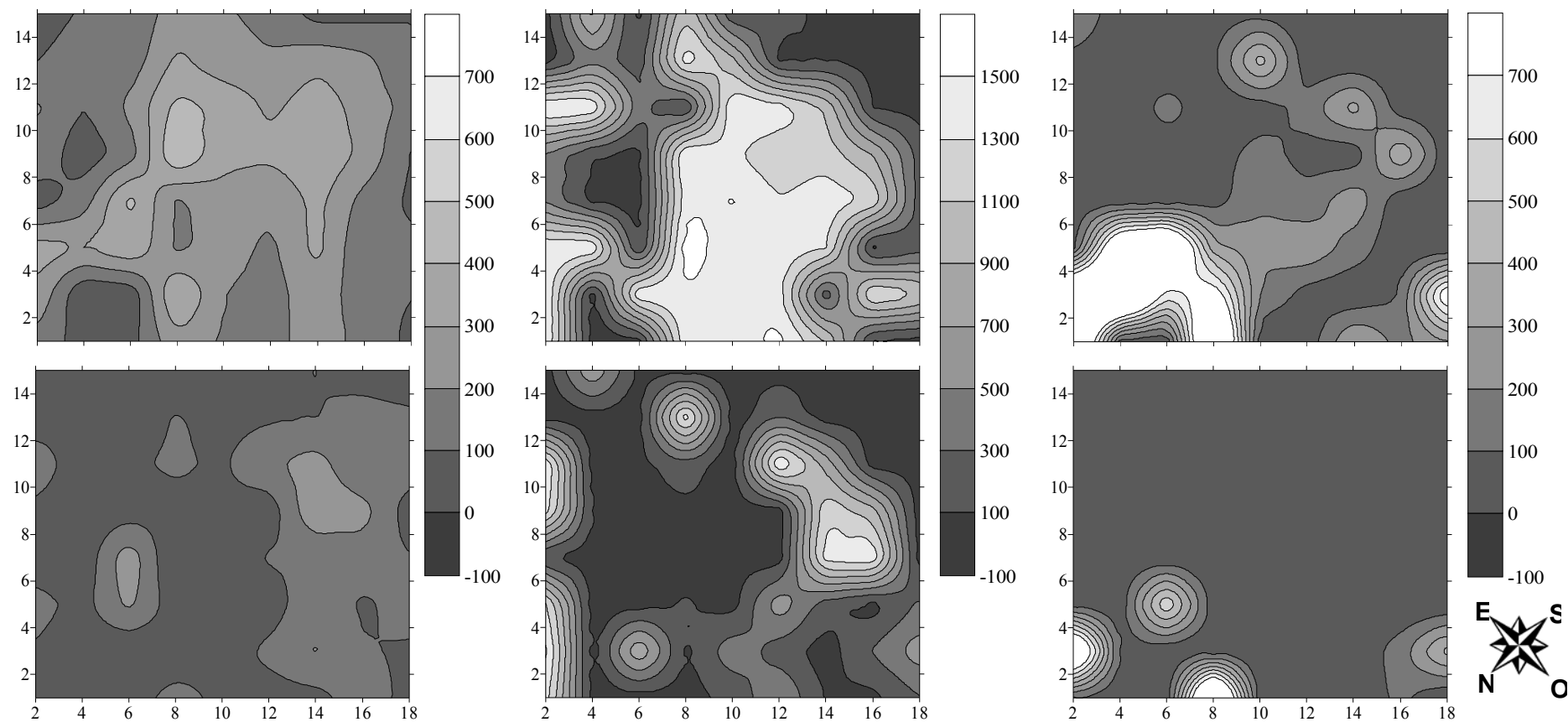
En la irradiancia registrada a un metro del suelo, se halló prácticamente en todos los casos una correlación positiva entre los registros efectuados en estaciones consecutivas (**Tabla VI.6**); sin embargo, para la irradiancia registrada a ras de suelo, no se halló correlación alguna en la mayor parte de las comparaciones efectuadas.

En la **Figura VI.23** se muestra, a modo de ejemplo, la evolución estacional del contenido de humedad en el suelo hallado en la parcela 6. Al igual que en el caso de la irradiancia PAR, se han representado, de derecha a izquierda, los registros efectuados en primavera de 2007, verano de 2007 e invierno de 2008. Las gráficas de la parte superior presentan el contenido de humedad encontrado en cada punto de muestreo, ya se encontrase éste sobre sustrato o en la hojarasca acumulada; en la parte inferior, el contenido de humedad presente en el suelo propiamente dicho. Nótese cómo, al contrario que en el caso de la irradiancia PAR, no existe un patrón espacial claro para el contenido de humedad del suelo, existiendo una fuerte heterogeneidad a pequeña escala. El patrón estacional sí es más evidente, con los niveles de humedad más bajos y homogéneos correspondiendo a la época estival.

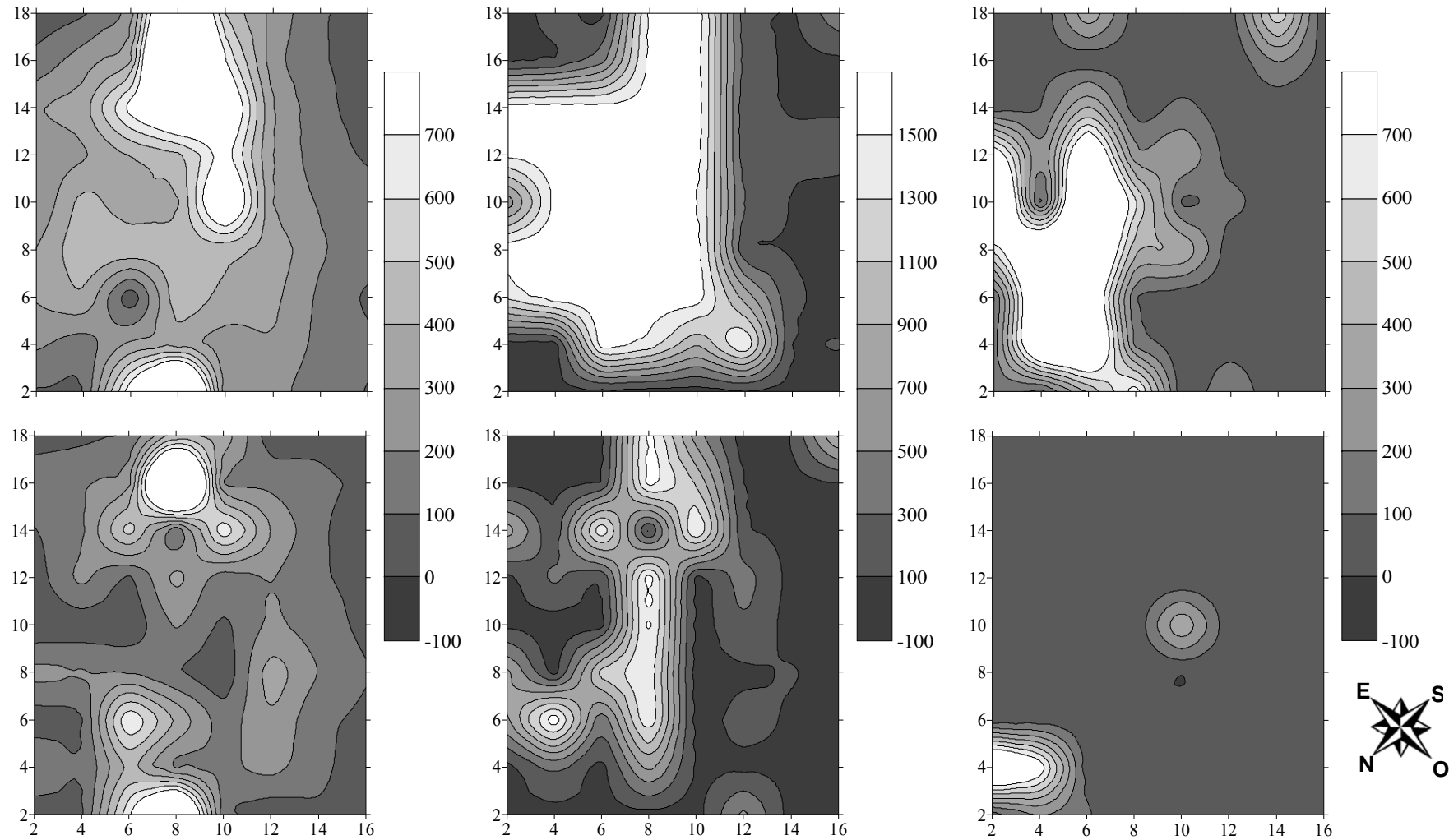
Al igual que en el caso de la irradiancia, se empleó SADIE para explorar el grado de correlación entre los patrones espaciales de humedad del suelo, hallados en los distintos momentos del tiempo, con el objetivo de conocer en qué medida las condiciones de disponibilidad de agua en el sustrato eran susceptibles de variar significativamente con el transcurso de las estaciones. Nuevamente, las correlaciones se exploraron para los tres posibles pares de conjuntos de datos: primavera vs. verano, verano vs. invierno y primavera vs. invierno.



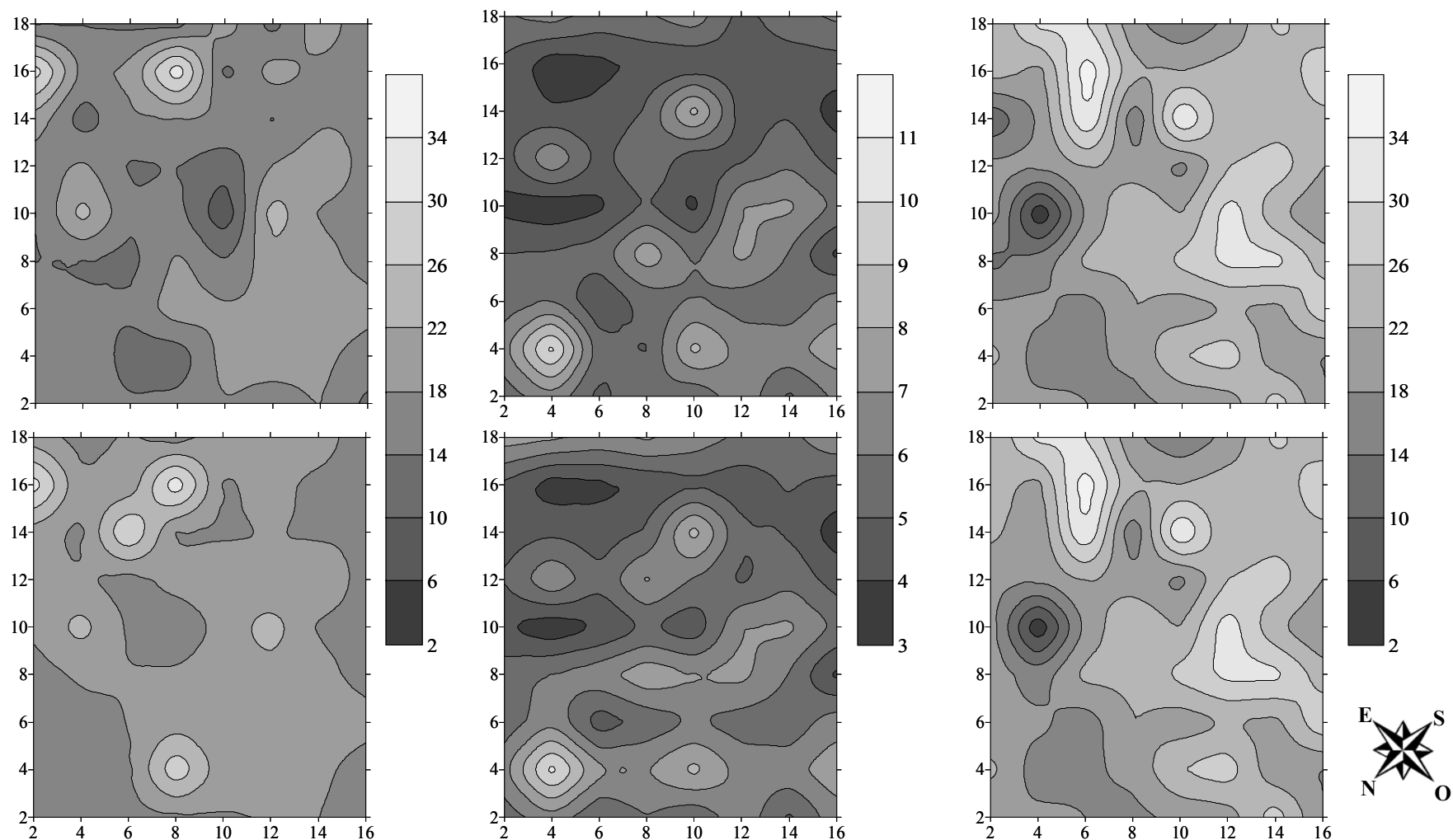
**Figura VI.20.** Irradiancia PAR registrada en la parcela 5b, en primavera, verano e invierno. En la fila superior, la irradiancia registrada a un metro del suelo. En la fila inferior, la registrada justo a ras de suelo. Nótese la diferencia de escala entre las distintas estaciones.



**Figura VI.21.** Irradiancia PAR registrada en la parcela 5, en primavera, verano e invierno. En la fila superior, la irradiancia registrada a un metro del suelo. En la fila inferior, la registrada justo a ras de suelo. Nótese la diferencia de escala entre las distintas estaciones.



**Figura VI.22.** Irradiancia PAR registrada en la parcela 6, en primavera, verano e invierno. En la fila superior, la irradiancia registrada a un metro del suelo. En la fila inferior, la registrada justo a ras de suelo. Nótese la diferencia de escala entre las distintas estaciones.



**Figura VI.23.** Contenido de humedad en el sustrato registrado en la parcela 6, en primavera, verano e invierno. En la fila superior, la humedad registrada en el sustrato más superficial. En la fila inferior, la registrada en el suelo propiamente dicho. Nótese la diferencia de escala entre estaciones.

**Tabla VI.6.** Grado global de asociación espacial entre la cantidad de irradiancia PAR incidente (a ras de suelo y a un metro sobre éste) registrada en las tres fechas de muestreo. Se indica si existe asociación positiva (+), asociación negativa (-), o si tal asociación no existe (0), así como el valor de obtenido para X (la distribución de asociación global generada por randomización) y la probabilidad *p* asociada (ajustada teniendo en cuenta la corrección de Dutilleul). Para un nivel de significación de 0.05, hay asociación si *p* es inferior a 0.025 y disociación si *p* es superior a 0.975 (P-V: contraste entre los datos registrados en primavera y verano. V-I: ídem para verano e invierno. P-I: ídem para primavera e invierno. En negrita se resaltan los resultados significativos).

<b>parcela 5b</b>									
	P-V			V-I			P-I		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Irradiancia (1 m)	+	0.5876	< <b>0.0001</b>	+	0.68	< <b>0.0001</b>	+	0.4095	<b>0.0001</b>
Irradiancia (0 m)	0	-0.1413	0.8619	0	-0.0003	0.4951	0	0.0143	0.4345

<b>parcela 5</b>									
	P-V			V-I			P-I		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Irradiancia (1 m)	+	0.4535	< <b>0.0001</b>	+	0.3904	<b>0.0001</b>	0	0.1118	0.119
Irradiancia (0 m)	+	0.2159	<b>0.0213</b>	0	0.0268	0.41	0	0.0706	0.2254

<b>parcela 6</b>									
	P-V			V-I			P-I		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Irradiancia (1 m)	+	0.6612	< <b>0.0001</b>	+	0.5661	< <b>0.0001</b>	+	0.3305	<b>0.0002</b>
Irradiancia (0 m)	+	0.5476	< <b>0.0001</b>	0	0.0701	0.2809	0	0.0616	0.3042

Para el porcentaje de humedad registrado en el nivel más superficial del suelo, se halló una asociación espacial positiva en la mayor parte de los casos (**Tabla VI.7**, resultados “%H hojarasca”). En cambio, en lo referente al contenido de humedad registrado en el sustrato (“%H suelo”), se encontró una asociación espacial positiva en la mayor parte de las transiciones entre primavera y verano, y primavera e invierno, desapareciendo esta correlación en la transición entre el verano y el invierno, que constituiría así el cambio estacional más significativo en lo que respecta a la disponibilidad de agua para las raíces. El efecto de la presencia de hojarasca en el suelo fue más patente en verano y en la parcela situada a menor altitud.

Por último, y nuevamente empleando SADIE, se procedió a explorar el grado de asociación espacial existente entre los patrones de heterogeneidad espacial hallados para las variables relacionadas con la irradiancia PAR registrada y la cantidad de humedad disponible en el suelo en cada momento del tiempo. Los resultados se muestran en la **Tabla VI.8**. Como era de esperar, no es posible apreciar un patrón espacial claro en la relación entre ambos grupos de variables. En general, las parcelas 5 y 5b mostraron un comportamiento distinto al de la parcela situada a menor altitud. En la primavera, predominaron las asociaciones de signo positivo, mientras que en verano o hubo asociación negativa o no hubo ningún tipo de asociación. La relación para la que se encontraron resultados más homogéneos fue “PAR incidente vs. %H hojarasca”, que siempre mostró asociación negativa o ningún tipo de asociación.

*VI.3.3. Localización espacial de individuos juveniles: patrón espacial, relación con variables abióticas y bióticas (gradientes de agua y luz, cobertura de matorral acompañante). Selección de individuos en distintos microambientes.*

La localización exacta de todos los individuos censados en las parcelas de estudio aparece en la **Figura VI.24**. Su distribución espacial se caracteriza por dos rasgos: i, el número y la densidad de individuos en el claro son superiores a los registrados bajo dosel (**Tabla VI.9**); y ii, los individuos aparecen distribuidos a lo largo del eje N-S de cada parcela, aunque existe una clara preferencia por el borde sur de los huecos, más umbrío, frente a la zona norte, expuesta y más soleada. Como excepción, el hueco de posición intermedia, de contorno más irregular y en el que el dosel sur no está completamente cerrado, lo que podría explicar que la mayor concentración de pinsapos no aparezca en esa zona.

**Tabla VI.7.** Grado global de asociación espacial entre la cantidad de humedad disponible registrada en distintos momentos del tiempo, diferenciando entre % H suelo y % H hojarasca. Se indica si existe asociación positiva (+), asociación negativa (-), o si tal asociación no existe (0), así como el valor de obtenido para X (la distribución de asociación global generada por randomización) y la probabilidad  $p$  asociada (ajustada teniendo en cuenta la corrección de Dutilleul). Para un nivel de significación de 0.05, hay asociación si  $p$  es inferior a 0.025 y disociación si  $p$  es superior a 0.975 (P-V: contraste entre los datos registrados en primavera y verano. V-I: ídem para verano e invierno. P-I: ídem para primavera e invierno. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican: \*\*\*, resultados significativos para  $\alpha < 0.05$ ; \*, sólo significativos para  $\alpha = 0.1 - 0.3$ ).

<b>parcela 5b</b>									
	P-V			V-I			P-I		
	asociación	X	$p$	asociación	X	$p$	asociación	X	$p$
% H hojarasca	+	0.3605	<b>0.0006***</b>	+	0.4496	<b>&lt; 0.0001***</b>	+	0.3255	<b>0.0007***</b>
% H suelo	+	0.2939	<b>0.0057***</b>	0	0.1863	0.107	+	0.3545	<b>0.0012***</b>

<b>parcela 5</b>									
	P-V			V-I			P-I		
	asociación	X	$p$	asociación	X	$p$	asociación	X	$p$
% H hojarasca	+	0.6746	<b>&lt; 0.0001***</b>	+	0.4721	<b>&lt; 0.0001***</b>	+	0.5910	<b>&lt; 0.0001***</b>
% H suelo	+	0.2705	<b>0.0017***</b>	0	-0.0305	0.6245	+	0.1374	<b>0.0868*</b>

<b>parcela 6</b>									
	P-V			V-I			P-I		
	asociación	X	$p$	asociación	X	$p$	asociación	X	$p$
% H hojarasca	+	0.1413	<b>0.0511*</b>	0	0.0145	0.4324	+	0.4497	<b>&lt; 0.0001***</b>
% H suelo	0	0.0277	0.376	0	-0.065	0.7712	+	0.228	<b>0.0121***</b>

**Tabla VI.8.** Grado global de asociación espacial entre la humedad disponible y cantidad de irradiancia PAR registradas en distintos momentos del tiempo, considerando las dos variables distintas medidas para cada factor ambiental (“PAR incidente”, “PAR suelo”, “%H hojarasca”, “%H suelo”). Se indica si existe asociación positiva (+), asociación negativa (-), o si tal asociación no existe (0), así como el valor de obtenido para X (la distribución de asociación global generada por randomización) y la probabilidad *p* asociada (ajustada teniendo en cuenta la corrección de Dutilleul). Para un nivel de significación de 0.05, hay asociación si *p* es inferior a 0.025 y disociación si *p* es superior a 0.975. (primavera: contraste entre los datos registrados para cada par de variables en primavera; verano: ídem para verano; invierno: ídem para invierno. Em negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican: \*\*\*, resultados significativos para  $\alpha < 0.05$ ; \*\*, resultados significativos sólo para  $\alpha = 0.05 - 0.1$ ; \*, sólo para  $\alpha = 0.1 - 0.3$ ).

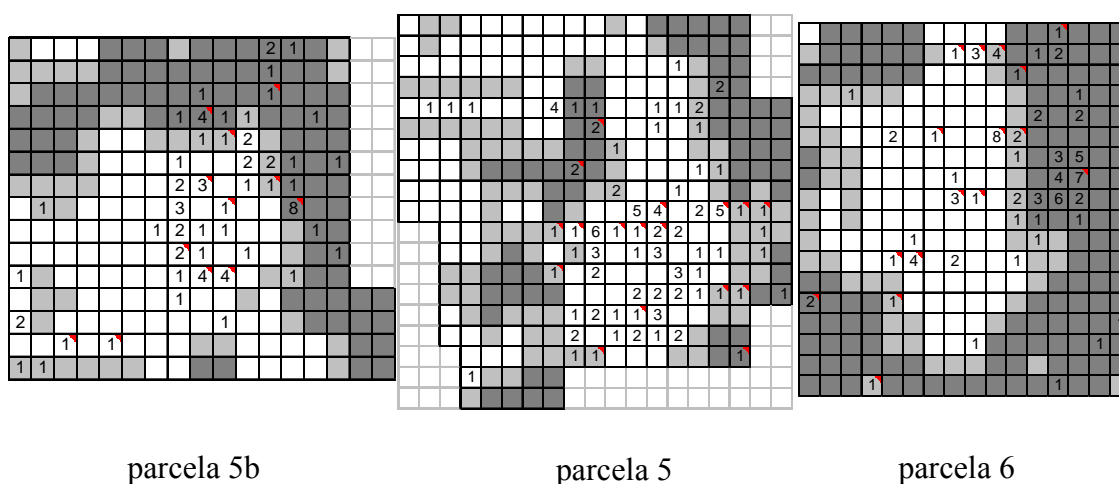
parcela 5b									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
PAR incidente vs. %H hojarasca	0	0.1313	0.1318	-	-0.4974	> <b>0.9999***</b>	-	-0.4122	> <b>0.9999***</b>
PAR incidente vs. %H suelo	0	0.1553	0.1114	-	-0.3326	<b>0.9911***</b>	+	0.236	<b>0.0276**</b>
PAR suelo vs. %H hojarasca	+	0.3647	<b>0.0002***</b>	-	-0.4010	<b>0.9998***</b>	+	0.1454	<b>0.0665*</b>
PAR suelo vs. %H suelo	+	0.2457	<b>0.0171***</b>	-	-0.3733	<b>0.9964***</b>	+	0.2977	<b>0.0028***</b>

parcela 5									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
PAR incidente vs. %H hojarasca	0	-0.0435	0.7120	0	-0.0743	0.8056	0	0.1499	0.0902
PAR incidente vs. %H suelo	0	0.008	0.4746	0	-0.0576	0.7371	+	0.2153	<b>0.0182***</b>
PAR suelo vs. %H hojarasca	+	0.5015	< <b>0.0001***</b>	0	0.0051	0.5255	+	0.1417	<b>0.0897*</b>
PAR suelo vs. %H suelo	+	0.3194	<b>0.0011***</b>	0	-0.0394	0.6647	0	0.1232	0.1172

parcela 6									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
PAR incidente vs. %H hojarasca	-	0.2698	<b>0.9930***</b>	-	-0.2131	<b>0.9909***</b>	-	-0.5409	> <b>0.9999***</b>
PAR incidente vs. %H suelo	+	0.2805	<b>0.0037***</b>	0	-0.0556	0.7315	-	-0.5294	> <b>0.9999***</b>
PAR suelo vs. %H hojarasca	-	-0.2047	<b>0.9611**</b>	-	-0.2351	<b>0.9956***</b>	-	-0.4121	> <b>0.9999***</b>
PAR suelo vs. %H suelo	+	0.2644	<b>0.0103***</b>	0	-0.0336	0.6406	-	-0.3720	<b>0.9998***</b>



**Figura VI.24.** Distribución espacial de los individuos juveniles censados. Las cuadrículas donde se encontraron individuos aparecen marcadas con un número (el valor designa el total de juveniles por unidad de muestreo). Las marcas rojas señalan la posición de los individuos seleccionados para el seguimiento de variables ecofisiológicas. Las parcelas se han dispuesto de mayor a menor altitud.

En todas las parcelas, los individuos mostraron un patrón de distribución en agregados, confirmado tanto a través del cálculo del índice de Blackman como mediante el cálculo del índice de agregación espacial propuesto por SADIE (**Tabla VI.10**).

#### VI.3.3.1. Relación con la presencia de otras especies y el porcentaje total de cobertura de matorral.

Se exploró la posible correlación entre el porcentaje de cobertura de matorral presente en cada unidad de muestreo y la presencia de juveniles de *Abies pinsapo*, mediante una prueba Chi cuadrado de dos colas, para las tres parcelas y cuatro porcentajes de cobertura distintos (inferior al 25 %, entre el 25 y el 50 %, entre el 50 y el 75 %, y superior al 75 %). En la parcela 5 se halló asociación entre la presencia de juveniles y la mayor cobertura de matorral. Pero en el resto de parcelas y casos, esta correlación nunca fue significativa.

Con SADIE se exploró la posible correlación espacial entre los patrones de heterogeneidad espacial del par de variables “nº juveniles presentes” y “porcentaje de cobertura” por unidad de muestreo, hallándose únicamente una asociación espacial negativa en las parcelas 5b (para  $\alpha = 0.1$ ) y 6 (para  $\alpha = 0.05$ ).

También a partir de las frecuencias observadas y una prueba Chi cuadrado de dos colas, se exploró la posible correlación entre la presencia de juveniles de *Abies*

*pinsapo* y la de las especies de matorral acompañante presente en las parcelas. Sólo se encontró tal relación con la especie *Ulex baeticus* en la parcela 5b ( $\chi^2$  esperada = 3.84,  $\chi^2$  observada = 13.48, para un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla VI.9.** Distribución de los individuos juveniles censados entre la zona de claro, el dosel, y la zona de transición entre ambos, expresada como suma de las tres parcelas. **(1):** Grado de concentración de los individuos presentes, expresada como el ratio entre el número de individuos censados en cada zona y la superficie (número de unidades espaciales) en que éstos fueron hallados. **(2):** Densidad poblacional, calculada como el ratio entre el número de individuos hallado y la superficie total muestreada en las distintas zonas.

	número individuos	superficie con individuos (m <sup>2</sup> )	total superficie muestreada (m <sup>2</sup> )	% superficie con presencia	concentración de individuos (1)	densidad de individuos (2)
<b>claro</b>	151	82	348	<b>23.6</b>	1.8	<b>0.4</b>
<b>borde</b>	42	34	185	18.4	1.2	0.2
<b>dosel</b>	83	42	292	14.4	2.0	0.3

**Tabla VI.10.** Patrón espacial de los individuos juveniles censados en las tres parcelas. I: índice de dispersión de Blackman; n: número de unidades muestrales. I (n-1) en todos los casos estuvo fuera del intervalo delimitado por los valores de  $\chi^2$  para los que  $0.975 > p > 0.025$  ([33.17, 72.61]). I<sub>a</sub>: índice de agregación global obtenido con SADIE. P<sub>a</sub>: probabilidad de que los individuos censados se encuentren distribuidos al azar entre las unidades muestrales consideradas.

	I	I (n-1)	I <sub>a</sub>	P <sub>a</sub>
<b>parcela 5b</b>	2.24	518.37	1.464	0.0107
<b>parcela 5</b>	1.85	448.58	1.585	0.0050
<b>parcela 6</b>	3.11	756.32	1.768	0.0007

### VI.3.3.2. Relación con variables abióticas: gradientes ambientales de luz y de humedad disponible en el sustrato.

El resultado de los análisis espaciales llevados a cabo con SADIE para explorar el grado de correlación espacial entre la presencia de juveniles de *Abies pinsapo* y la cantidad de irradiancia incidente a ras de suelo y a un metro de éste aparece en la **Tabla VI.11**. Asimismo, se exploró el grado de correlación existente entre la distribución de los juveniles de la especie y la cantidad de humedad disponible en el sustrato. En ninguno de los casos se halló un patrón claro de asociación espacial entre las variables consideradas, salvo quizá la asociación positiva con la irradiancia registrada en primavera en todos los casos.

### *VI.3.3.3. Selección de individuos para seguimiento de variables ecofisiológicas.*

De entre todos los individuos censados en las parcelas de estudio, se seleccionaron juveniles de edades similares para la monitorización de una batería de variables ecofisiológicas (ver **Sección VI.2.3**), indicativas del “éxito” de los individuos localizados bajo distintas condiciones. En la medida de lo posible, esta selección fue representativa de seis microambientes diferenciados a lo largo de un gradiente de dirección S-N que atraviesa el centro de cada parcela (**Figura VI.24**): dosel norte y sur, borde norte y sur, claro con escasa cobertura de matorral y claro con cobertura de matorral superior al 50%.

### *VI.3.4. Potencial hídrico xilemático.*

El potencial hídrico xilemático fue medido en los individuos seleccionados al objeto de explorar las posibles diferencias entre los localizados en microambientes distintos, en términos de su estatus hídrico y su capacidad de uso y gestión de este recurso. Estas medidas, simultáneas con las de fijación de C, se tomaron en tres ocasiones, coincidiendo con la primavera, el pleno verano y el invierno.

Se hallaron diferencias significativas asociadas a los distintos momentos de medida ( $p = 0.000$ ), con los valores más negativos registrados en la época estival, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los distintos microambientes (**Figura VI.25.F, Tabla VI.12**).

### *VI.3.5. Medidas instantáneas de intercambio gaseoso*

#### *VI.3.5.1. Conductancia estomática al agua.*

De manera similar a lo ocurrido con el potencial hídrico se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo, pero no entre microambientes, siendo el efecto de la estación independiente del microambiente considerado (**Tabla VI.12**). La llegada del verano supuso un descenso dramático de las tasas de conductancia en todos los microambientes (**Figura VI.25.B**). Con el invierno, las tasas nuevamente se recuperaron, llegando a superar a las registradas en primavera en las zonas más expuestas.

**Tabla VI.11.** Grado global de asociación espacial entre la presencia y distribución de los juveniles censados (la variable “conteo pinsapos”) y los valores de humedad disponible y cantidad de irradiancia PAR registrados en distintos momentos del tiempo, considerando las dos variables distintas medidas para cada factor ambiental (“PAR incidente”, “PAR suelo”, “%H hojarasca”, “%H suelo”). Se indica si existe asociación positiva (+), asociación negativa (-), o si tal asociación no existe (0), así como el valor de obtenido para X (la distribución de asociación global generada mediante aleatorización) y la probabilidad *p* asociada (ajustada teniendo en cuenta la corrección de Dutilleul). Para un nivel de significación de 0.05, hay asociación si *p* es inferior a 0.025 y disociación si *p* es superior a 0.975. (primavera: contraste entre los datos registrados para cada par de variables en primavera; verano: ídem para verano; invierno: ídem para invierno. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican: \*\*\*, resultados significativos para  $\alpha < 0.05$ ; \*\*, resultados significativos sólo para  $\alpha = 0.05 - 0.1$ ; \*, sólo para  $\alpha = 0.1 - 0.3$ ).

<b>parcela 5b</b>									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Conteo pinsapos vs. PAR incidente	+	0.1535	<b>0.0594*</b>	0	-0.0106	0.5486	0	-0.0578	0.7136
Conteo pinsapos vs. PAR suelo	+	0.3246	<b>0.0005***</b>	-	-0.3431	<b>&gt; 0.9999***</b>	+	0.2883	<b>0.0009***</b>
Conteo pinsapos vs. %H hojarasca	+	0.3688	<b>0.0001***</b>	0	-0.0146	0.5693	+	0.2833	<b>0.0007***</b>
Conteo pinsapos vs. %H suelo	+	0.1502	<b>0.046**</b>	0	0.0513	0.3167	+	0.3827	<b>0.0001***</b>

<b>parcela 5</b>									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Conteo pinsapos vs. PAR incidente	+	0.3449	<b>&lt; 0.0001***</b>	+	0.2527	<b>0.0014***</b>	0	0.0807	0.1502
Conteo pinsapos vs. PAR suelo	0	0.0018	0.4989	-	-0.1668	<b>0.9734**</b>	-	-0.1082	<b>0.9019*</b>
Conteo pinsapos vs. %H hojarasca	0	-0.0076	0.5367	0	0.0498	0.2486	0	-0.0523	0.7157
Conteo pinsapos vs. %H suelo	-	-0.1421	<b>0.9464*</b>	+	0.131	<b>0.0422**</b>	0	-0.0633	0.7657

<b>parcela 6</b>									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Conteo pinsapos vs. PAR incidente	+	0.1098	<b>0.1224*</b>	0	0.0144	0.4346	-	-0.1819	<b>0.9836***</b>
Conteo pinsapos vs. PAR suelo	0	0.0876	0.1889	+	0.1196	<b>0.1004*</b>	0	-0.0973	0.8502
Conteo pinsapos vs. %H hojarasca	0	0.0863	0.1831	0	-0.0838	0.8428	+	0.3945	<b>&lt; 0.0001***</b>
Conteo pinsapos vs. %H suelo	0	0.0588	0.2662	0	-0.02	0.5932	+	0.3748	<b>&lt; 0.0001***</b>

#### VI.3.5.2. Tasa neta de fijación de C.

A diferencia de las variables descritas anteriormente, en este caso se encontraron diferencias significativas no sólo en el tiempo sino también entre los distintos microambientes. No obstante, el efecto del microambiente sobre las tasa de fijación de C no fue independiente de la estación del año, como indica un efecto de interacción significativo (**Tabla VI.12**). Las tasas de fijación de C fueron, considerando el conjunto de los distintos microambientes, máximas en primavera, disminuyeron notablemente en verano, y volvieron a incrementarse moderadamente en invierno (**Figura VI.25.A**), aunque no alcanzaron los valores registrados en primavera, salvo en el dosel norte. La variabilidad entre microambientes fue asimismo máxima en primavera (en el caso del microambiente “dosel norte”, el valor medio registrado en esta estación fue incluso su mínimo anual), pero se vio muy reducida en las otras estaciones. En cualquier caso, las mayores tasas de fijación de C se hallaron asociadas a los microambientes más soleados y expuestos.

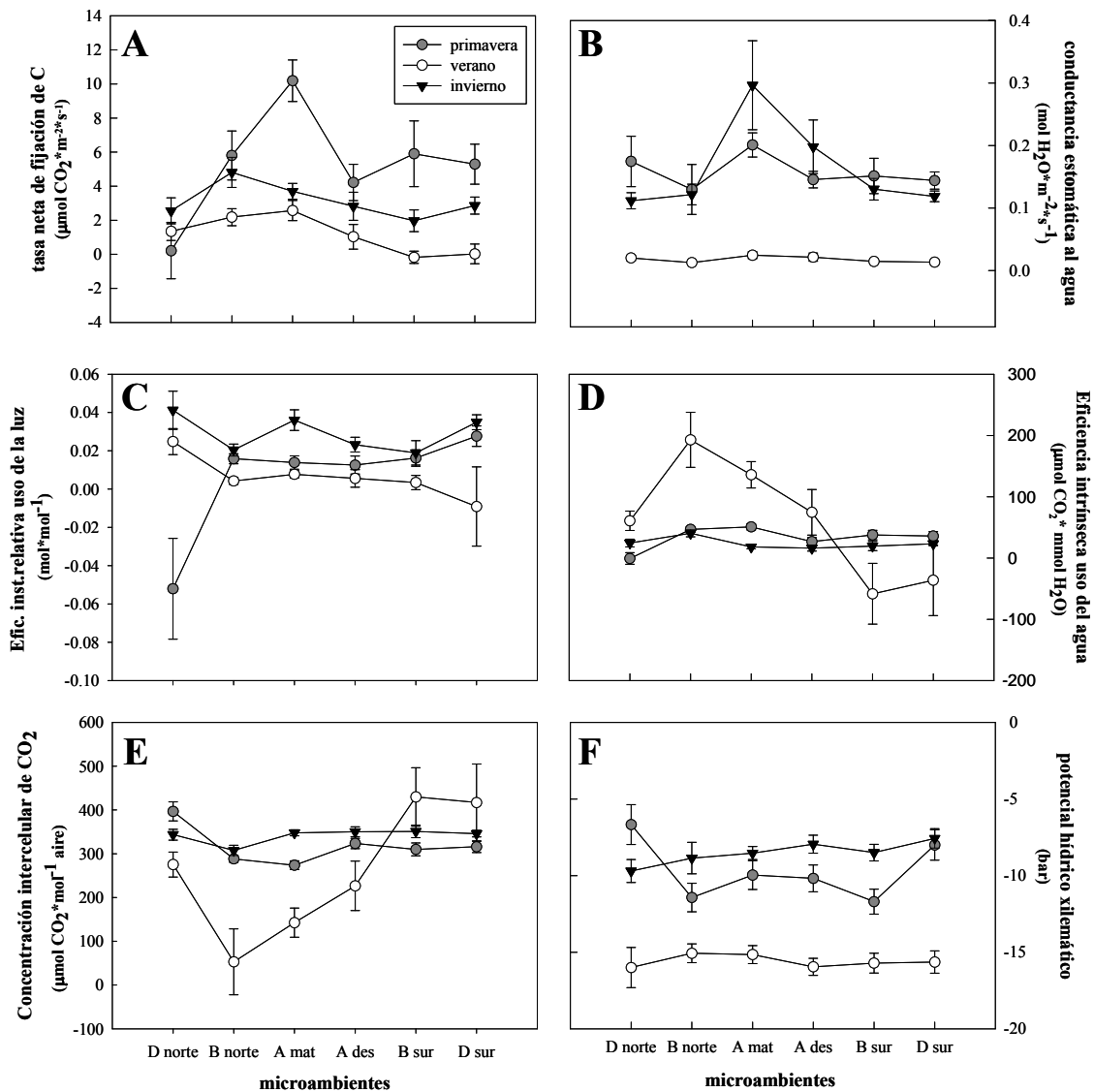
#### VI.3.5.3. Concentración intercelular de CO<sub>2</sub>.

El registro estacional de esta variable no exhibió el mismo patrón estacional que las anteriores, si bien se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo y entre los distintos microambientes, así como derivadas de la interacción entre ambos factores (**Tabla VI.12**). Así, la llegada del verano únicamente supuso un descenso significativo de la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> para los microambientes más soleados y expuestos (borde norte y zonas de claro con distinta cobertura, **Figura VI.25.E**), en consonancia con el patrón exhibido por las tasas de fijación de C.

#### VI.3.5.4. Ratio fotosíntesis vs. conductancia: eficiencia intrínseca en el uso del agua.

En lo que respecta a la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE, *intrinsic water use efficiency*), de nuevo se encontró un efecto significativo de la interacción entre el microambiente y fecha de muestreo considerada, además de hallarse diferencias significativas a lo largo del tiempo y entre los distintos microambientes (**Tabla VI.12**). Así, si bien las tasas registradas en primavera y en invierno son muy similares, en el

registro estival es muy patente la diferencia entre los microambientes orientados al sur, más sombreados, en los cuales se produce un descenso en la eficiencia del uso del agua, y las posiciones orientadas al norte, más expuestas, donde la eficiencia en el uso del agua aumenta considerablemente durante la época estival (Figura VI.25.D).



**Figura VI.25.** Tasa neta de fijación de carbono (A), tasa instantánea de conductancia estomática al agua (B), eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz (C), eficiencia intrínseca en el uso del agua (D), concentración intercelular de  $\text{CO}_2$  (E) y potencial hídrico xilemático (F) en individuos juveniles localizados en los distintos microambientes (dispuestos conforme al gradiente N-S que atraviesa el centro de cada parcela). Estas variables se registraron en tres estaciones distintas (D: dosel; B: borde; A: zona abierta de claro; mat: cobertura de matorral superior al 50%; des: cobertura de matorral inferior al 50%). Las barras de error representan el error estándar.

VI.3.5.5. Ratio fotosíntesis vs. PAR: eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz.

Para la eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz (irLUE, *instantaneous relative light use efficiency*), se hallaron diferencias significativas en el tiempo (con los mayores valores en invierno, **Figura IV.25.C**), así como las debidas a la propia selección y localización de los huecos, que no se confirmaron *a posteriori* (**Tabla VI.12**). A pesar de que no se hallaron diferencias significativas entre los distintos microambientes, sí se hallaron para la interacción “tiempo x microambiente”. En primavera y verano, la eficiencia en el uso de la luz fue menor, sin encontrarse diferencias significativas entre estas fechas.

**Tabla VI.12.** Resultado del análisis estadístico para las diferencias entre microambientes, así como entre huecos (considerando este factor anidado dentro del anterior) para las tasas instantáneas de fijación neta de C ( $A_n$ ), de conductancia estomática al agua ( $g_s$ ), la concentración intercelular de  $CO_2$ , la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE), la eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz (irLUE, del inglés “instantaneous relative light-use efficiency) y el potencial hídrico xilemático ( $\Psi$ ). (GLM con ambos factores anidados y análisis de medidas repetidas, seguido de un test *a posteriori* Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	$A_n$	$g_s$	$C_i$	iWUE	irLUE	$\Psi$
Microambiente	6.23 (5)	1.76 (5)	7.14 (5)	6.145 (5)	1.37 (5)	1.06 (5)
	<b>0.000*</b>	0.149	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	0.261	0.405
Huecos(microambiente)	1.98 (11)	0.54 (11)	1.98 (11)	2.085 (11)	2.23 (11)	2.23 (11)
	0.064	0.862	0.064	0.051	<b>0.038</b>	<b>0.041</b>
Tiempo	31.94 (2)	20.11 (2)	11.97 (2)	6.478 (2)	16.77 (2)	91.23 (2)
	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.003*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Tiempo*microambiente	2.6 (10)	1 (10)	4.3 (10)	4.483 (10)	2.19 (10)	1.235 (10)
	<b>0.010*</b>	0.453	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.029*</b>	0.289
Tiempo*huecos(microambiente)	2.66 (22)	1.25 (22)	2.42 (22)	2.374 (22)	4.63 (22)	1.86 (22)
	<b>0.001*</b>	0.239	<b>0.000*</b>	<b>0.004*</b>	<b>0.000*</b>	<b>0.032*</b>

VI.3.6. Determinación de carbohidratos no estructurales en el xilema.

VI.3.6.1. Azúcares solubles.

No se encontraron diferencias significativas respecto a la concentración de azúcares solubles libres, de bajo peso molecular, ni entre microambientes ni a lo largo del tiempo (**Tabla VI.13**, **Figura VI.26.A**). La mayor variación la experimentaron los

microambientes situados en el borde de los huecos en el paso de la primavera al verano, aunque ésta no fue significativa en ningún caso.

#### *VI.3.6.2. Almidón.*

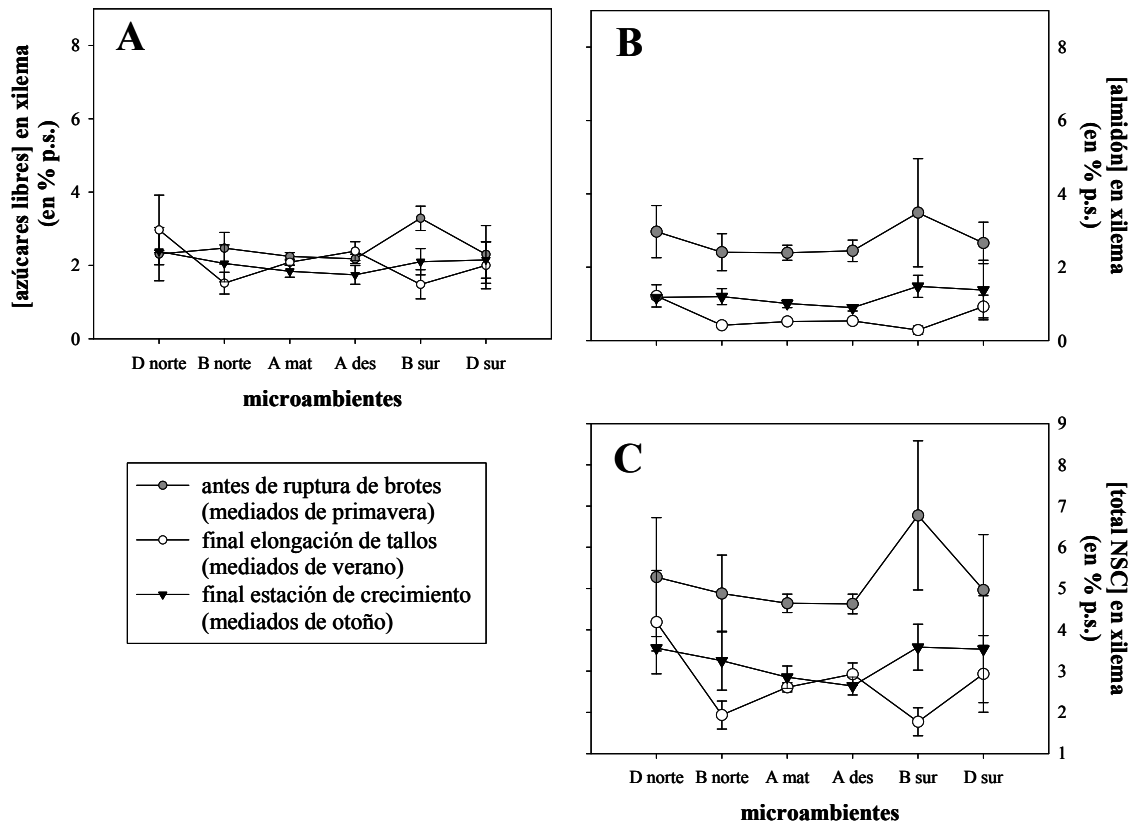
Al igual que en el caso anterior, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos microambientes en lo que respecta al contenido en almidón (**Tabla VI.13**); sin embargo, el patrón estacional de este compuesto fue evidente, encontrándose diferencias significativas respecto al tiempo, entre los niveles registrados en primavera y verano, y los de verano e invierno. Como era de esperar, en todos los microambientes, la concentración de almidón fue máxima en primavera, disminuyendo ostensiblemente con el paso del tiempo y permaneciendo ya los niveles bajos hasta el final de la estación de crecimiento, aunque con diferencias entre microambientes. Así, los test *a posteriori* efectuados (Tukey HSD) revelaron que no hubo diferencias significativas entre las distintas fechas de muestreo en los microambientes localizados bajo el dosel, y que, sin embargo, se hallaron diferencias significativas entre los niveles registrados en primavera y en verano en los microambientes correspondientes a las zonas con mayores niveles de irradiancia, y con mayores tasas de fijación de C y crecimiento: las zonas de transición norte y sur (“B norte” y “B sur”) y el claro (“A mat” y “A des”). Para estos últimos incluso existieron diferencias entre el inicio y el final de la estación de crecimiento, en otoño.

#### *VI.3.6.3. Carbohidratos no estructurales totales.*

En lo que respecta al contenido en carbohidratos no estructurales totales, los análisis estadísticos revelaron la ausencia de diferencias significativas entre microambientes (**Figura VI.26.C, Tabla VI.13**). Sí se hallaron diferencias debidas a la propia selección y localización de los huecos estudiados (el factor anidado en los análisis), aunque éstas no se confirmaron *a posteriori*.

Por otro lado, estos niveles de carbohidratos totales mostraron en general un comportamiento similar al del almidón, con un descenso significativo en el tiempo que media entre el inicio y el final de la elongación de los brotes. Sin embargo, desde ese momento y hasta el final de la estación de crecimiento no se produjo un aumento significativo en la concentración de carbohidratos totales, hallándose diferencias

significativas entre los valores registrados en primavera y otoño. El test *a posteriori* efectuado (nuevamente Tukey HSD) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre el inicio y el final del periodo de elongación de brotes, únicamente en los microambientes “B norte”, “B sur” y “A mat”.



**Figura VI.26.** Concentración de azúcares solubles (A), almidón (B) y carbohidratos no estructurales totales (C), en el xilema de 3 y 4 años de individuos juveniles localizados en los distintos microambientes. Estas variables se registraron en tres momentos distintos de la estación de crecimiento. (D: dosel; B: borde; A: zona abierta de claro; mat: cobertura de matorral superior al 50%; des: cobertura de matorral inferior al 50%). Las barras de error representan el error estándar.

### VI.3.7. Crecimiento primario en ramas.

Las medidas de crecimiento se tomaron en septiembre de 2008 en todos los individuos juveniles censados en las tres parcelas. La tasa de crecimiento anual promedio se calculó a partir del crecimiento experimentado por cada individuo en los seis últimos años, medido en dos ramas con distinta orientación.

Para aquellos individuos empleados en el seguimiento de variables relacionadas con el intercambio gaseoso, esta variable fue analizada con un GLM, siendo el factor

principal los distintos microambientes, y la pertenencia de los individuos muestreados a uno u otro hueco, un factor anidado dentro de éste. Este análisis reveló diferencias significativas entre microambientes (**Tabla VI.14**), con las mayores tasas de crecimiento promedio en los microambientes de claro (“A mat” y “A des”) y en el borde norte (“B norte”) (**Figura VI.27**).

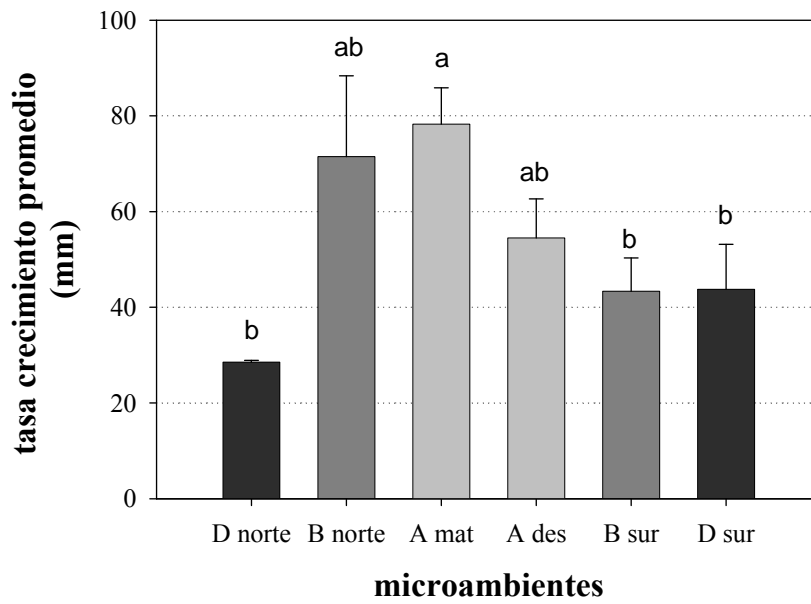
**Tabla VI.13.** Resultado del análisis estadístico para las diferencias entre microambientes, así como entre huecos (considerando este factor anidado dentro del anterior) para las concentraciones de azúcares libres (glucosa + fructosa + sacarosa), almidón y carbohidratos no estructurales totales (NSC = azúcares libres + almidón) (GLM con ambos factores anidados y análisis de medidas repetidas, seguido de un test Tukey HSD). Para cada factor se muestra el valor de F (entre paréntesis los grados de libertad) y el valor de *p*. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

efecto	Azúcares solubles	Almidón	NSC totales
Microambiente	0.030 (5)	1.06 (5)	0.41 (5)
	1	0.408	0.834
Huecos(microambiente)	1.868 (9)	1.45 (9)	2.86 (9)
	0.109	0.225	<b>0.020</b>
Tiempo	1.433 (2)	46.07 (2)	16.48 (2)
	0.249	<b>0.000*</b>	<b>0.000*</b>
Tiempo*microambiente	1.459 (10)	0.87 (10)	1.23 (10)
	0.186	0.567	0.301
Tiempo*huecos(microambiente)	0.442 (18)	0.72 (18)	0.35 (18)
	0.969	0.771	0.991

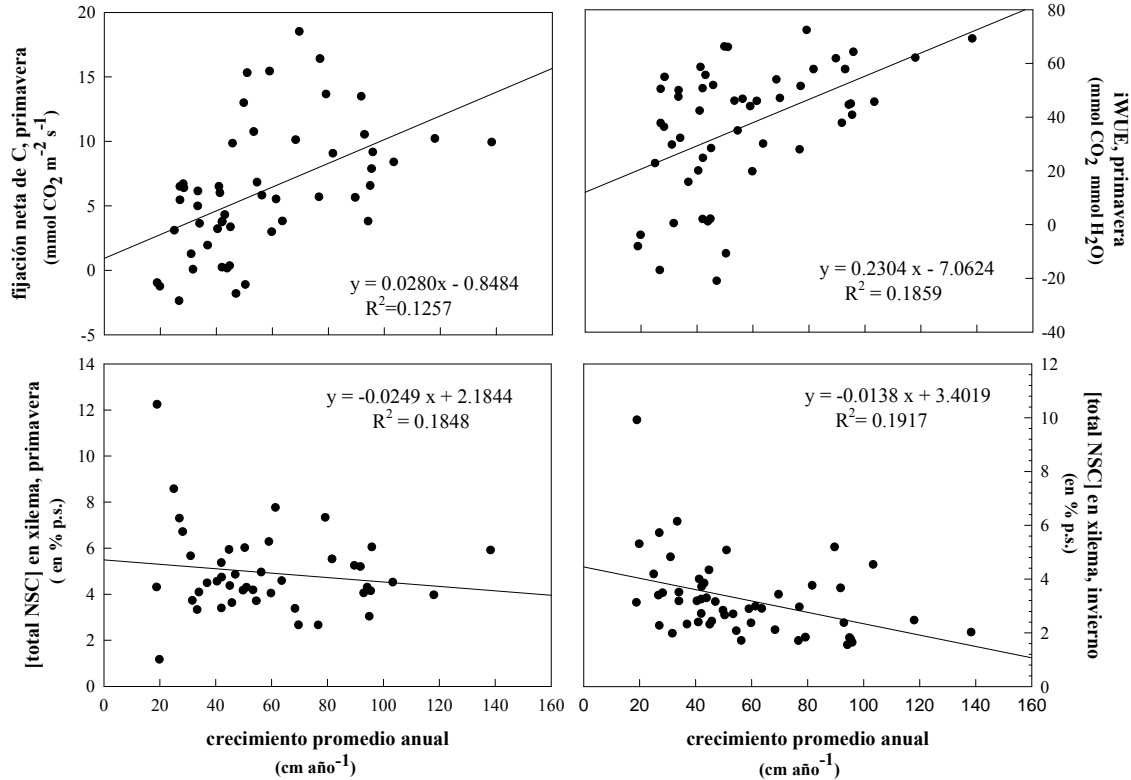
**Tabla VI.14.** Resultado del análisis estadístico para las diferencias entre microambientes, así como entre huecos (considerando este factor anidado dentro del anterior) para las tasas promedio de crecimiento anual (ANOVA anidado seguido de un test de Tukey HSD). En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican la existencia de diferencias *a posteriori*.

	g.l.	F	p
Microambiente	5	5.095	<b>0.001*</b>
Hueco (microambiente)	11	1.535	0.159

Además, se exploró la posible relación entre esta variable y algunas de las relacionadas con la fijación de carbono: fotosíntesis, contenido total en carbohidratos no estructurales y eficiencia intrínseca en el uso del agua. Se halló una correlación significativa para las tasas de fotosíntesis neta registradas en primavera y en verano, y para la eficiencia intrínseca en el uso del agua registrada en primavera (**Figura VI.28**). Respecto al contenido en carbohidratos de reserva, en todos los casos se halló una relación negativa, aunque sólo fue significativa en el registro efectuado en otoño-invierno, al final de la estación de crecimiento.



**Figura VI.27.** Crecimiento promedio de los individuos seleccionados, agrupados conforme a los microambientes en que se hallasen. En gris oscuro, el crecimiento en los microambientes localizados bajo dosel (D). En gris medio, el de los microambientes de la zona de transición (B). En gris más claro, el crecimiento de los individuos hallados en los microambientes del claro (A): suelo desnudo (“des”, % cobertura de matorral inferior al 50%, y cobertura de matorral superior al 50% (“mat”).



**Figura VI.28.** Relaciones funcionales entre la tasa promedio de crecimiento anual y la tasa instantánea neta de fijación de C y la eficiencia intrínseca en el uso del agua en primavera, así como con el contenido total en carbohidratos no estructurales, al inicio y al final de la estación de crecimiento.

Al objeto de explorar el grado de correlación entre la tasa de crecimiento y el patrón espacial de disponibilidad de recursos clave, se empleó la metodología SADIE sobre la distribución espacial de estos recursos y de la tasa de crecimiento promedio, considerando la posición de los individuos censados en cada uno de los tres huecos (según coordenadas x e y). Este análisis permitió concluir acerca del grado de correlación espacial entre los patrones de heterogeneidad a pequeña escala encontrados para ambas variables. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla VI.15**.

*VI.3.8. Ordenación multivariante del comportamiento ecofisiológico de individuos localizados en distintos microambientes.*

Para tratar el conjunto de variables relativas al comportamiento ecofisiológico de los individuos desde un punto de vista integrador y sintético, que extrajese la información más relevante y permitiese un tratamiento gráfico igualmente sinóptico, se llevó a cabo un análisis de componentes principales sobre las variables relacionadas con el intercambio gaseoso, el estatus hídrico y de suministro de carbono. El objetivo de este análisis era evaluar la posibilidad de generar un espacio de fases en el cual, la posición de los distintos individuos, adscritos a distintos microambientes, estuviese determinada por el comportamiento que éstos presentan respecto a las variables seleccionadas para el análisis, esto es, por su comportamiento ecofisiológico.

Como paso previo al análisis de componentes principales, se exploraron las posibles correlaciones entre las distintas variables, para reducir el número de variables a emplear y evitar información redundante. La notable correlación encontrada en los tres momentos del tiempo entre el contenido total en carbohidratos y el contenido en azúcares libre y almidón, así como entre la eficiencia intrínseca en el uso del agua y la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> (**Figura VI.29**), derivada de las relaciones funcionales existentes entre las mismas (e.g. el contenido total de carbohidratos se calcula como la suma del contenido en azúcares libres y almidón), nos permitió eliminar del análisis tres variables del conjunto original de nueve: la concentración en azúcares libres y almidón del xilema, y la concentración intercelular de CO<sub>2</sub>.

**Tabla VI.15.** Grado global de asociación espacial entre el crecimiento promedio experimentado por los juveniles censados en los últimos seis años (la variable “conteo crecimiento promedio”) y los valores de humedad disponible y cantidad de irradiancia PAR registrados en distintos momentos del tiempo, considerando las dos variables distintas medidas para cada factor ambiental (“PAR incidente”, “PAR suelo”, “%H hojarasca”, “%H suelo”). Se indica si existe asociación positiva (+), asociación negativa (-) o si tal asociación no existe (0), así como el valor de obtenido para X (la distribución de asociación global generada por randomización) y la probabilidad *p* asociada (ajustada teniendo en cuenta la corrección de Dutilleul). Para un nivel de significación de 0.05, hay asociación si *p* es inferior a 0.025 y disociación si *p* es superior a 0.975. (primavera: contraste entre los datos registrados para cada par de variables en primavera; verano: ídem para verano; invierno: ídem para invierno. En negrita se resaltan los resultados significativos. Los asteriscos indican: \*\*\*, resultados significativos para  $\alpha < 0.05$ ; \*\*, resultados significativos sólo para  $\alpha = 0.05 - 0.1$ ; \*, sólo para  $\alpha = 0.1 - 0.3$ ).

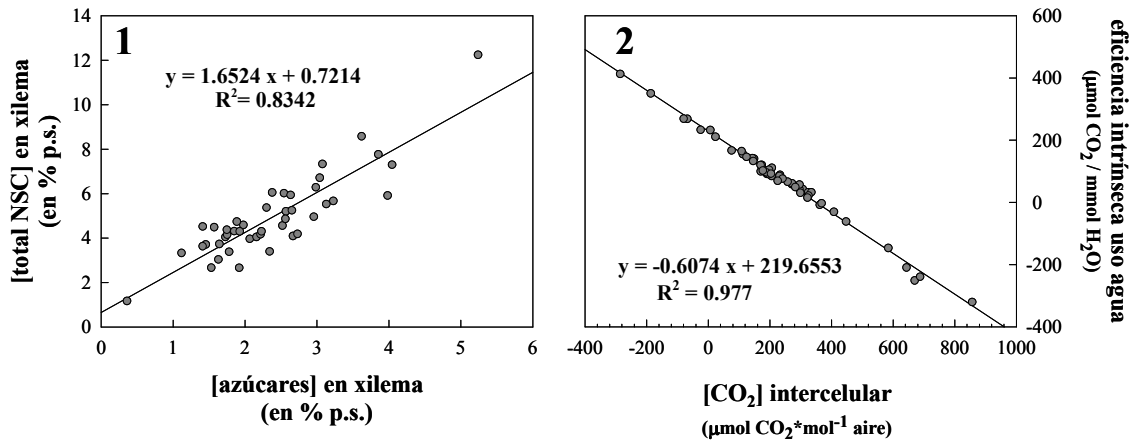
<b>parcela 5b</b>									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Crecimiento promedio vs. PAR incidente	+	0.328	<b>0.0002***</b>	+	0.2585	<b>0.0013***</b>	+	0.2094	<b>0.0183***</b>
Crecimiento promedio vs. PAR suelo	+	0.3495	<b>0.0003***</b>	0	-0.108	0.8688	+	0.286	<b>0.0004***</b>
Crecimiento promedio vs. %H hojarasca	+	0.2612	<b>0.0036***</b>	0	-0.092	0.8213	0	0.032	0.3667
Crecimiento promedio vs. %H suelo	0	0.0832	0.1825	0	0.0401	0.3597	+	0.4681	< <b>0.0001***</b>

<b>parcela 5</b>									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Crecimiento promedio vs. PAR incidente	+	0.3598	< <b>0.0001***</b>	+	0.3772	< <b>0.0001***</b>	+	0.1837	<b>0.0082***</b>
Crecimiento promedio vs. PAR suelo	0	-0.0557	0.753	-	-0.1018	<b>0.8978*</b>	0	0.0101	0.4508
Crecimiento promedio vs. %H hojarasca	-	-0.1987	<b>0.9976***</b>	0	-0.0353	0.687	-	-0.1147	<b>0.9332*</b>
Crecimiento promedio vs. %H suelo	-	-0.1972	<b>0.995***</b>	0	-0.016	0.5899	0	-0.0327	0.6718

<b>parcela 6</b>									
	primavera			verano			invierno		
	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>	asociación	X	<i>p</i>
Crecimiento promedio vs. PAR incidente	0	0.1193	0.1408	0	0.0754	0.2164	0	-0.0422	0.6568
Crecimiento promedio vs. PAR suelo	0	0.0689	0.2798	+	0.1595	<b>0.0814*</b>	0	0.1114	0.1576
Crecimiento promedio vs. %H hojarasca	0	-0.1022	0.8169	0	0.0099	0.4611	+	0.1625	<b>0.0473**</b>
Crecimiento promedio vs. %H suelo	0	0.03	0.3905	0	0.033	0.351	+	0.15	<b>0.0701*</b>



**Figura VI.29.** Ejemplos de la exploración previa de interdependencia entre variables del conjunto de las mismas que podrían emplearse en el análisis multivariante. **1.** Análisis de regresión entre la concentración de carbohidratos no estructurales totales, y de azúcares libres, en xilema, encontradas en primavera. **2.** Análisis de regresión entre la eficiencia intrínseca en el uso del agua y la concentración intercelular de  $\text{CO}_2$ , registradas en verano.

Además, se consideró innecesario emplear la conductancia estomática al agua además de la fotosíntesis y la eficiencia intrínseca en el uso del agua. Las cinco variables que finalmente intervinieron en los análisis fueron la fotosíntesis neta, la eficiencia intrínseca en el uso del agua, la eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz, el potencial hídrico xilemático y el contenido total en carbohidratos no estructurales.

Se realizaron tres análisis de componentes principales, uno para cada momento del tiempo en que se registraron las distintas variables. Como casos, se consideraron los valores promedios obtenidos por microambiente y hueco a partir del conjunto original de individuos juveniles. Los resultados obtenidos muestran que este tipo de análisis consiguió explicar más del 80% de la varianza encontrada en primavera y verano, aunque sólo explicó un 65% en otoño-invierno (**Tabla VI.16**).

En primavera, los dos primeros ejes consiguieron explicar cerca del 90% de la varianza presente en el conjunto de datos original (**Tabla VI.16**). Las variables que más peso mostraron sobre el primer eje fueron las eficiencias en el uso del agua y de la luz, la fijación neta de carbono y el potencial hídrico; esto permitiría interpretar este eje como un gradiente de aptitud ecofisiológica (*fitness*). El segundo eje mostró una fuerte correlación con el contenido total en carbohidratos no estructurales, por lo que puede interpretarse como indicativo del estado del metabolismo del carbono en los árboles (movilización y utilización de reservas). Los individuos localizados en los distintos microambientes, representados en este espacio de fases (**Figura VI.30**) mostraron una

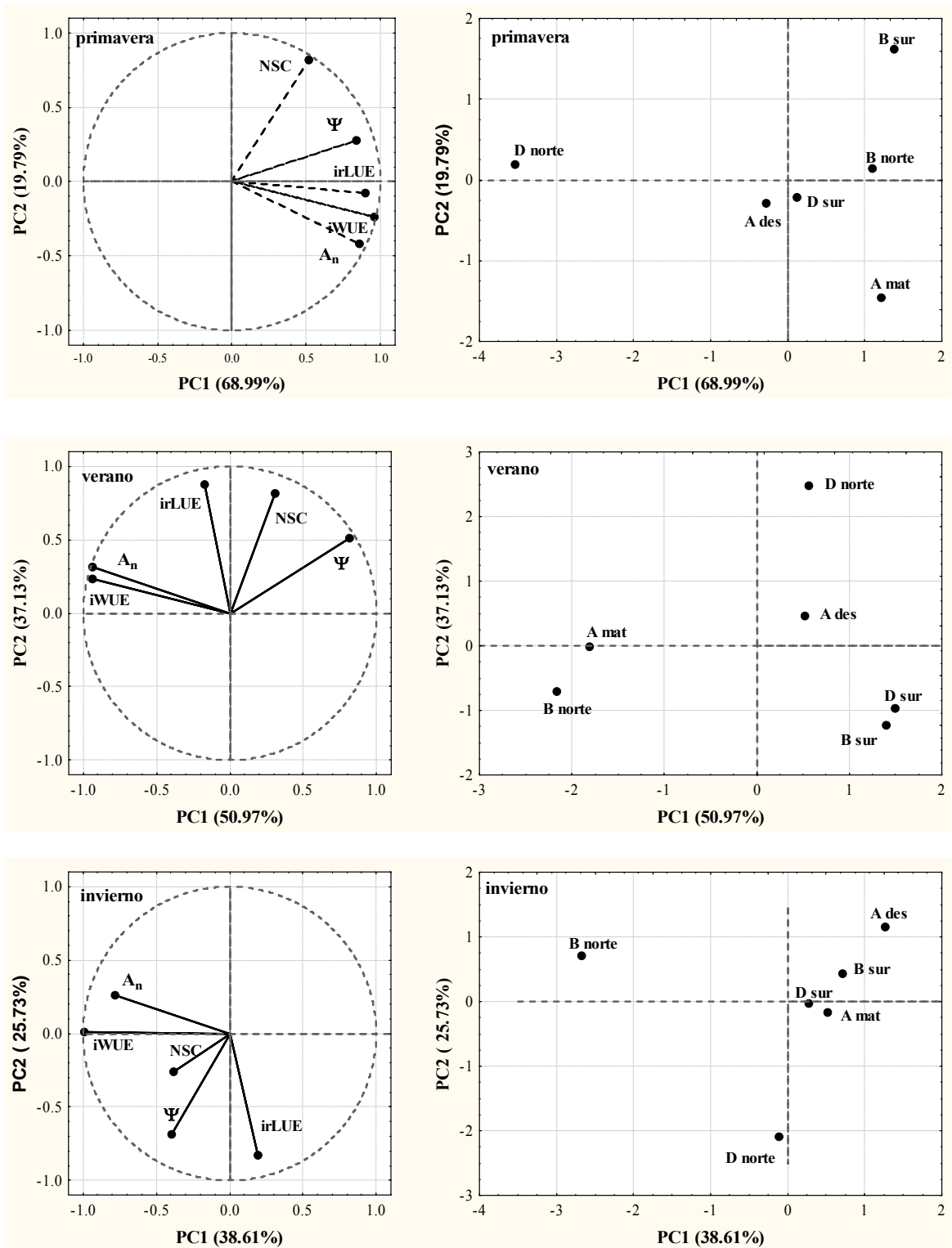
segregación acorde a las condiciones ambientales que determinan cada uno de ellos. Sobre el primer eje, los individuos del dosel norte son los que mostraron una menor aptitud (presentaron los valores más negativos sobre el primer componente principal). En el resto de microambientes, los individuos presentaron una aptitud similar aunque los mayores valores se encontraron en las zonas de transición y en el interior del hueco, en presencia de elevada cobertura de matorral.

**Tabla VI.16.** Resultados del Análisis de Componentes Principales sobre las variables relativas al comportamiento ecofisiológico de los individuos. Porcentaje de varianza explicada conjuntamente por los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) y coeficientes de peso de las variables originales sobre éstos.

		primavera		verano		invierno	
Varianza explicada		88.78 %		88.10 %		64.35 %	
		PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
Peso de las variables sobre los nuevos ejes	$A_n$	<b>0.8610</b>	-0.4208	<b>-0.9366</b>	0.3179	<b>-0.7830</b>	0.2585
	$iWUE$	<b>0.9586</b>	-0.2377	<b>-0.9400</b>	0.2323	<b>-0.9904</b>	0.0108
	$irLUE$	<b>0.9015</b>	-0.0770	-0.1734	<b>0.8797</b>	0.1900	<b>-0.8259</b>
	$\Psi$	<b>0.8422</b>	0.2802	<b>0.8128</b>	0.5097	-0.3955	-0.6853
	Total NSC	0.5171	<b>0.8193</b>	0.3114	<b>0.8171</b>	-0.3797	-0.2608

Al pasar de la primavera al verano, la eficiencia en el uso de la luz deja de tener peso en el primer eje (**Tabla VI.16**), quedando sólo la tasa neta de fijación de C y la eficiencia en el uso del agua como las variables más importantes, con correlación negativa con el mismo; el potencial hídrico mantiene su elevado peso positivo. Por ello, este primer eje puede interpretarse como un gradiente que ordena los individuos según la intensidad del estrés estival que experimentan (e.g. mayor estrés hídrico, menor conductancia estomática, menor fijación de C). Al segundo eje contribuyen principalmente la eficiencia en el uso de la luz y el contenido en carbohidratos. Este eje segrega del resto a los microambientes cuyos individuos se encuentran menos estresados (**Figura VI.30**, véase posición de “dosel norte”), en los que subsistiría cierta actividad residual pese al déficit hídrico general (mayor apertura de estomas y fijación de C). En cualquier caso, y al igual que en primavera, ambos ejes consiguieron explicar cerca del 90% de la varianza.

Con la llegada del invierno,  $A_n$  y  $iWUE$  mantienen coeficientes de carga muy negativos sobre el PC1, pero  $\Psi$  deja de ser importante. En el caso del PC2, la elevada contribución de  $irLUE$  se mantiene, pero no la del contenido en carbohidratos no estructurales, que pasa a tener más peso sobre el primer eje que sobre el segundo.



**Figura VI.30.** Resultados del análisis de componentes principales efectuado a partir de las variables bióticas registradas en tres épocas distintas del año. A la izquierda, el peso de las distintas variables en la interpretación de los nuevos ejes. En la parte derecha, la representación de los distintos casos en el espacio de fase generado para cada momento. (D: dosel, B: borde, A: claro, mat: cobertura de matorral superior al 50%, des: cobertura inferior al 50%.  $A_n$ : fotosíntesis instantánea neta,  $g_s$ : conductancia estomática al agua, iWUE: eficiencia intrínseca en el uso del agua, irLUE: eficiencia instantánea relativa en el uso de la luz,  $\Psi$ : potencial hídrico xilemático, NSC: carbohidratos no estructurales totales).

### VI.3.9. Análisis de regresión logística y partición de la variación encontrada para la presencia de individuos juveniles de pinsapo.

Para evaluar la posible relación funcional entre la presencia de individuos juveniles y las variables “ambientales” registradas (representativas del PAR y de la humedad edáfica), de manera que se incluyese también la distribución espacial de éstas (lo que hemos denominado variables “espaciales”), se llevó a cabo una regresión logística, realizándose *a posteriori* una partición de la varianza para conocer la importancia relativa de ambos grupos de variables.

El análisis que consiguió explicar un mayor porcentaje de varianza en los tres momentos del tiempo fue la regresión logística llevada a cabo con variables ambientales y espaciales simultáneamente (**Tabla VI.17**). A pesar de que los tres modelos construidos consiguieron un buen ajuste de los datos (de acuerdo con la bondad del ajuste proporcionada por la prueba de Hosmer y Lemeshow, que arrojó un nivel de significación superior a 0.05), en los tres momentos del tiempo el porcentaje de varianza que el modelo no es capaz de explicar (la fracción *d*) fue muy superior a la fracción explicada.

La fracción *c* de variación, explicada por las variables de carácter espacial, fue en todo momento muy superior a la fracción *a*, correspondiente a las variables ambientales “puras”. La fracción *b*, correspondiente a la variación que es explicada conjuntamente por ambos tipos de variables, fue negativa, lo que puede ser indicativo de distintas circunstancias: i, X y W tienen un efecto fuerte y directo sobre Y; ii, existe una fuerte correlación entre X y W; iii, X y W ejercen sobre Y efectos de signo contrario; iv, ambos grupos de variables tomados en conjunto explican Y mejor que considerados por separado (Legendre y Legendre, 1998).

En la **Tabla VI.18** se muestran las variables consideradas buenas predictoras de la presencia /ausencia de juveniles para los tres modelos construidos en cada momento del tiempo (estadístico de Wald,  $p < 0.05$ ). Entre las variables “ambientales”, destacó el porcentaje de cobertura existente, significativa en las tres estaciones. El porcentaje de humedad del suelo fue significativo únicamente en invierno. Entre las variables “espaciales”, destacaron la heterogeneidad espacial a pequeña escala (índice de agregación,  $v$ ) de la especie más abundante, *Ulex baeticus*, y de *Juniperus*, así como la posición dentro del hueco (coordenadas X e Y). La heterogeneidad espacial a pequeña escala del ambiente lumínico fue significativa en primavera y verano. La cantidad de

irradiancia *per se* y la presencia del resto de especies no fueron seleccionadas como variables predictoras en ningún momento del tiempo.

**Tabla VI.17.** Resultados de los distintos análisis de regresión logística. El símbolo “-” indica que no se obtuvo ningún resultado para esos análisis en particular.

Fracción de variación <b>variables ambientales (a+b)</b>	Fecha de muestreo		
	primavera	verano	invierno
$\chi^2$	–	–	7.367
g.l.	–	–	8
p	–	–	0.498
R <sup>2</sup>	–	–	0.010
varianza explicada	–	–	1 %
<b>variables espaciales (b+c)</b>	primavera	verano	invierno
$\chi^2$	9.934	15.403	10.649
g.l.	8	8	8
p	0.270	0.052	0.222
R <sup>2</sup>	0.146	0.134	0.110
varianza explicada	14.6 %	13.4 %	11 %
<b>variables ambientales y espaciales (a+b+c)</b>	primavera	verano	invierno
$\chi^2$	9.113	12.354	5.747
g.l.	8	8	8
p	0.333	0.136	0.676
R <sup>2</sup>	0.160	0.137	0.127
varianza explicada	16 %	13.7 %	12.7 %

*VI.3.10. Análisis de redundancia y partición de la variación hallada para las variables de índole ecofisiológica.*

En la **Tabla VI.19** se muestran los resultados de los análisis de redundancia y de redundancia parciales para el conjunto de variables bióticas, detallándose el porcentaje de la varianza explicada atribuible en cada momento del tiempo a variables ambientales, a variables espaciales, y a ambos grupos considerados conjuntamente. El análisis en el que se incluyeron variables ambientales y espaciales simultáneamente (RDA sobre Y frente a X y W) fue el que consiguió explicar un mayor porcentaje de varianza (en torno a un 60%, en los tres momentos del tiempo). La fracción de varianza no explicada fue esta ocasión bastante inferior a la hallada en el caso de la presencia/ausencia de individuos.

**Tabla VI.18.** Variables significativas en los distintos modelos construidos, estadístico de Wald y la probabilidad asociada (*p*). Entre paréntesis se indica el signo de la relación entre cada variable predictora y la variable respuesta.

	primavera			verano			invierno		
	variable	Wald	<i>p</i>	variable	Wald	<i>p</i>	variable	Wald	<i>p</i>
<b>variables ambientales</b>	--	--	--	--	--	--	% H suelo (+)	4.927	.026
	coordenada X (+)	21.013	.000	coordenada X (+)	16.721	.000	coordenada X (+)	9.976	.002
	coordenada Y (+)	34.510	.000	coordenada Y (+)	19.366	.000	coordenada Y (+)	23.498	.000
	v% cobertura (+)	15.433	.000	v% cobertura (+)	6.994	.008	v% cobertura (+)	14.255	.000
<b>variables espaciales</b>	vPAR incidente (+)	11.868	.001	vPAR incidente (-)	18.656	.000			
	vpres <i>Ulex</i> (-)	10.787	.001	vpres <i>Ulex</i> (-)	12.964	.000	vpres <i>Ulex</i> (-)	13.561	.000
	vpres <i>Juniperus</i> (-)	7.105	.008	vpres <i>Juniperus</i> (-)	6.513	.011	vpres <i>Juniperus</i> (-)	4.781	.029
	vPAR suelo (+)	4.893	.027	vPAR suelo (+)	4.478	.034			
							v% H suelo (+)	7.984	.005
<b>variables ambientales y espaciales</b>	coordenada X (+)	21.372	.000	coordenada X (+)	17.522	.000	coordenada X (+)	8.448	.004
	coordenada Y (+)	35.068	.000	coordenada Y (+)	25.082	.000	coordenada Y (+)	24.947	.000
	vpres <i>Ulex</i> (-)	11.018	.001	vpres <i>Ulex</i> (-)	17.560	.000	vpres <i>Ulex</i> (-)	15.573	.000
	vPAR incidente (+)	8.294	.004	vPAR incidente (+)	15.666	.000			
	vpres <i>Juniperus</i> (-)	8.925	.003	vpres <i>Juniperus</i> (-)	7.982	.005	vpres <i>Juniperus</i> (-)	6.113	.013
	vpres <i>Rubia</i> (+)	4.068	.044						
	vPAR suelo (+)	6.976	.008						
	% cobertura (+)	13.558	.000	% cobertura (+)	11.378	.001	% cobertura (+)	20.651	.000
							% H suelo (+)	10.865	.001

Las variables de carácter espacial explicaron un mayor porcentaje de la variación observada en el comportamiento ecofisiológico de los individuos, aunque también un porcentaje significativo de la varianza fuese explicado por variables puramente ambientales, siendo en invierno cuando ocurre la mayor diferencia entre ambos grupos de variables.

En la **Tabla VI.20** se muestra la partición de la varianza obtenida de los análisis, indicándose las distintas fracciones de la varianza explicada y no explicada por éstos. En primavera e invierno, el porcentaje relativamente elevado de varianza compartida hallado indica que las variables ambientales covariaron sensiblemente con las espaciales en esas épocas del año.

**Tabla VI.19.** Resultados de los distintos análisis de redundancia y de redundancia parcial llevados a cabo para las variables bióticas (intercambio gaseoso, crecimiento, potencial hídrico y contenido en NSC; las variables ambientales y espaciales son las que aparecen en la **Tabla VI.3**. La variación total es 1. Los porcentajes se han obtenido dividiendo varianza explicada por la varianza total.

	tipo de análisis	variables explicativas	varianza explicada (%)		
			primavera	verano	invierno
1	RDA, Y vs. X y W	variables ambientales y espaciales	60.0 %	56.6 %	60.2 %
2	RDA, Y vs. W	variables ambientales	37.7 %	26.4 %	31.9 %
3	RDA, Y vs. X	variables espaciales	41.7 %	28.8 %	43.9 %
4	pRDA, Y vs. W, X como COV	variables ambientales, con espaciales como covariables	18.3 %	27.8 %	16.3 %
5	pRDA, Y vs. X, W como COV	variables espaciales, con ambientales como covariables	22.2 %	30.2 %	28.3 %

**Tabla VI.20.** Partición de la varianza obtenida con los distintos análisis de redundancia. Los componentes *a* y *b* coinciden con las varianzas explicadas en los pasos 4 y 5 de la **Tabla VI.19**, respectivamente. El componente *c* es igual a la diferencia entre la varianza del paso 3 y la del paso 5; *d* se calcula como la diferencia entre la varianza total (igual a 1) y la varianza explicada en el paso 1 de la misma tabla.

componente	fuente de variación	varianza explicada (%)		
		primavera	verano	invierno
a	Ambientales (efecto puro)	18.3%	27.8%	16.3%
b	Espaciales (efecto puro)	22.2%	30.2%	28.3%
c	Compartida	19.5%	-1.4%	15.6%
d	Residual	40.0%	43.4%	39.8%
total		100.0%	100.0%	100.0%

En la **Tabla VI.21** se muestran las variables que fueron significativas para los tres modelos construidos en cada momento del tiempo ( $p < 0.05$ ). Entre las variables "ambientales", destaca el porcentaje de cobertura existente, con un efecto significativo en todas las estaciones aunque para distintos análisis. El porcentaje de humedad en el

suelo fue significativo únicamente en verano, para pRDA Y vs. W, tomando X como covariables. Entre las variables "espaciales", destacaron la heterogeneidad espacial a pequeña escala (índice de agregación,  $v$ ) de *Juniperus*, así como la coordenada X del punto en que se midieron las variables bióticas. La disponibilidad de PAR, o bien la heterogeneidad espacial a pequeña escala de este recurso, fueron siempre significativas, aunque en distintos análisis.

#### **VI.4. Discusión.**

##### *VI.4.1. La importancia de los huecos del dosel forestal para los procesos de regeneración natural del bosque: el papel de la heterogeneidad espacial en la dinámica forestal a distintas escalas.*

La heterogeneidad ambiental que introduce en el bosque la aparición de huecos en el dosel constituye un factor esencial de los procesos de regeneración natural del mismo, que se manifiesta a distintas escalas espaciales y temporales. Por un lado, a escala de paisaje, la dinámica de huecos modula la estructuración y el desarrollo del sistema, de modo que, desde esta perspectiva, un bosque maduro puede considerarse un mosaico en el que se encuentran representados distintos estadios que cambian cíclicamente con el paso del tiempo: hueco, fase de construcción o ensamblaje y estadio maduro (Watt, 1947; Whitmore, 1975). Este bosque en permanente cambio es lo que se denomina "complejo de regeneración" (Watt, 1947) o "ciclo de crecimiento forestal" (Whitmore, 1975). Por otro lado, multitud de estudios han puesto de manifiesto la importancia de los huecos del dosel forestal para el mantenimiento y el incremento de la diversidad de especies (ver, por ejemplo, Fenner (1985), Denslow (1987), Whitmore (1989), Brokaw y Scheiner (1989), Poulson y Platt (1989), Busing y White (1997), Coates y Burton (1997) o Gray *et al.* (2002)), considerándose que la dinámica de huecos y la hipótesis del *gap partitioning* explican la persistencia en el espacio y en el tiempo de especies forestales con distintas estrategias vitales. Ello se debe a que la heterogeneidad espacial a pequeña escala ligada a la aparición de estos huecos constituye una dimensión fundamental del nicho de regeneración de las distintas especies arbóreas que conforman el bosque. Así, los individuos juveniles de estas especies, que pueden presentar muy distintas características autoecológicas, pueden distribuirse entre los micrositos que se generen a lo largo del gradiente ambiental y de recursos que caracteriza estos sistemas.

**Tabla VI.21.** Variables significativas en los distintos modelos construidos, ordenadas conforme a los efectos marginales (valores propios), indicativos del porcentaje de varianza explicada atribuible a cada variable considerada individualmente. También se muestra el valor del estadístico F y el nivel de significación *p*.

	primavera				verano				invierno			
	variable	valor propio	F	<i>p</i>	variable	valor propio	F	<i>p</i>	variable	valor propio	F	<i>p</i>
<b>Variables ambientales</b>	--	--	--	--	PAR incidente	0.05	3.053	0.012				
					% H hojarasca	0.03	2.086	0.046	% cobertura	0.04	2.831	0.025
					pres <i>Ulex</i>	0.02	2.189	0.051				
<b>Variables espaciales</b>	vPAR suelo	0.04	2.944	0.019	coordenada X	0.05	0.044	0.036	coordenada X	0.10	6.596	0.001
	v% Cobertura	0.03	2.956	0.013	vpres <i>Juniperus</i>	0.04	-0.011	0.008	vpres <i>Juniperus</i>	0.02	1.394	0.026
					vpres <i>Rosa</i>	0.01	1.634	0.015				
<b>Variables ambientales y espaciales</b>	pres <i>Juniperus</i>	0.16	9.795	0.001					coordenada X	0.17	10.925	0.001
	vpres <i>Juniperus</i>	0.10	2.753	0.019	% cobertura	0.09	5.029	0.001	coordenada Y	0.04	3.197	0.01
	% cobertura	0.07	2.873	0.017	coordenada X	0.05	2.005	0.053	vpres <i>Ulex</i>	0.04	2.669	0.027
	vpres <i>Rosa</i>	0.05	3.581	0.008	vpres <i>Juniperus</i>	0.04	2.597	0.021	vPAR incidente	0.03	3.215	0.01
	pres <i>Ulex</i>	0.04	2.562	0.03					vpres <i>Juniperus</i>	0.03	2.724	0.026
	vPAR suelo	0.04	3.242	0.009								

No obstante, la hipótesis del *gap partitioning* puede considerarse únicamente un caso particular de la teoría del nicho de regeneración, en el que los recursos y las condiciones microclimáticas son los factores principales a tener en cuenta, y tanto los huecos como los micrositos que aparecen actúan como “filtros” estructurales que determinan el patrón de recursos a diferentes escalas espaciales (Gray y Spies, 1997). Es decir, el potencial para el mantenimiento de la diversidad de especies forestales ligado a la heterogeneidad espacial depende de las interacciones entre distintas fuentes de heterogeneidad operando a diversas escalas espaciales (Gray y Spies, 1997): la variabilidad a una escala muy fina (menos de un metro cuadrado) de las condiciones ambientales bajo el dosel forestal se superpone a la variabilidad a una escala más gruesa, representada por los huecos del dosel y otras grandes perturbaciones (Beckage y Clark, 2003). En otras palabras, si la dinámica de huecos a la escala de uno a varios árboles es importante, los procesos que tienen lugar a una escala más fina, a nivel del microambiente que percibe cada plántula, así como a una escala más gruesa, como la del paisaje, juegan también un papel importante en la dinámica de la comunidad (Spies y Franklin, 1989). Por ello, en el estudio de los procesos de regeneración natural de especies forestales ligados a la existencia de huecos en el dosel forestal debe considerarse la estructura espacial de estos sistemas, con los gradientes ambientales y de recursos que los caracterizan a distintas escalas, así como las posibles interacciones entre estos elementos y las especies presentes, de cara a explicar los mecanismos ecológicos que subyacen a estos procesos.

Todo lo anterior, unido al hecho de que se tengan pocos datos referidos al patrón espacial de reclutamiento de *A. pinsapo* (Arista, 1994; Arista, 1995), a pesar de la importancia que los mecanismos de regeneración tienen de cara a la persistencia de especies relictas (García *et al.* 2000; Castro *et al.* 2004; Camarero *et al.* 2005), justifica el énfasis en la perspectiva espacial considerada en este estudio, no sólo para abordar la descripción de la distribución espacial de los individuos juveniles de pinsapo o su éxito medido en términos del comportamiento ecofisiológico que exhiban, sino también para la caracterización de las condiciones microclimáticas de los lugares en los que se han establecido, con la intención de conocer la posible relación entre estos elementos en el marco de los procesos de regeneración natural.

VI.4.2. *El análisis espacial como aproximación para el estudio de los procesos de regeneración natural. Caracterización espacial de los gradientes ambientales de recursos.*

Las condiciones físicas existentes en los huecos del dosel son completamente distintas a las que puedan encontrarse bajo el dosel (ver, por ejemplo, Whitmore, 1975; Lee, 1978; Denslow, 1980b; Poulson y Platt, 1989). Así, la aparición de estos huecos trae consigo generalmente un incremento en los niveles de luz, humedad del sustrato y disponibilidad de nutrientes para el sotobosque (Pearcy, 1983; Canham, 1988b; Denslow *et al.* 1990; Pacala *et al.* 1994). La variación en los niveles de luz está determinada principalmente por el tamaño del hueco generado (Denslow, 1980a, 1980b; Brokaw, 1985; Canham *et al.* 1990; Abe *et al.* 1995), de modo que en los huecos más grandes aumenta la probabilidad de regeneración de especies intolerantes a la sombra en el sotobosque (Yamamoto, 2000).

A su vez, el propio sotobosque puede modificar la heterogeneidad de los recursos disponibles a una escala tan fina que afecte al establecimiento y supervivencia de las plántulas (Korstian y Coile, 1938; Harmon y Franklin, 1989; Veblen, 1989; Facelli, 1994; Lorimer *et al.* 1994; Berkowitz *et al.* 1995; George y Bazzaz, 1999a, 1990b). Así, por ejemplo, en bosques templados la vegetación del sotobosque crea micrositios sombreados sobre el suelo del bosque, y al mismo tiempo puede agotar la humedad y los nutrientes disponibles en el mismo (Gray y Spies, 1997). En ambientes mediterráneos, la presencia de matorrales reduce la radiación solar incidente y la temperatura del suelo, e incrementa la humedad del suelo y del aire, lo que podría mejorar el estatus hídrico de las plántulas establecidas bajo ellos (Castro *et al.* 2002, 2004).

Existen en la literatura científica numerosos trabajos dedicados al estudio de los procesos de regeneración de especies forestales ligados a la existencia de huecos en el dosel forestal (véanse, por ejemplo, Gray y Spies (1997), Coates (2000), Beckage y Clark (2003) o Albanesi *et al.* (2008)) o a la influencia de distintas variables bióticas o abióticas en los mismos (e.g. Castro *et al.* 2004 o Gómez-Aparicio *et al.* 2005). Sin embargo, son pocos los que hayan abordado la perspectiva espacial de estos procesos, incluyendo por ejemplo la descripción del patrón espacial de la especie objeto de estudio, o la distribución espacial de los recursos clave a lo largo de los gradientes ambientales que definen estos sistemas.

En nuestro caso, se procedió a la descripción de los gradientes ambientales característicos, mediante el registro de la irradiancia PAR incidente y los niveles de humedad disponible en el sustrato en las parcelas de estudio. La representación gráfica de los valores registrados de irradiancia PAR en tres momentos del tiempo muestra claramente el fuerte gradiente existente en las tres parcelas, al menos en lo referente a la irradiancia registrada a un metro del suelo, que es la que perciben los individuos del sotobosque y los brinzales de pinsapo de cierto porte; la situación cambia radicalmente para la irradiancia registrada a ras de suelo, la que perciben las semillas y las plántulas de menor tamaño, con niveles especialmente bajos y homogéneos durante el invierno (**Figuras IV.20, VI.21 y VI.22**).

La exploración del grado de correlación entre los patrones espaciales hallados en las distintas estaciones puso de manifiesto que el paso de la primavera al verano fue el cambio menos drástico en lo referente al ambiente lumínico, como demuestra la asociación positiva hallada en la mayor parte de los casos. La correlación positiva hallada para la irradiancia registrada a un metro del suelo (**Tabla IV.6**), sugiere que, en general, el ambiente lumínico que perciben los individuos del matorral y los juveniles de cierto porte en el lugar en que se encuentren no sufre variaciones notables con el paso de las estaciones, en el sentido de que, en aquellos puntos en los que hay menos luz en invierno, tiende a haber también menos luz en primavera y verano, y viceversa. Por su parte, la ausencia de correlación en la irradiancia registrada a ras de suelo podría explicarse por la conjunción del cambio en el ángulo de inclinación solar con la propia distribución del matorral. En cualquier caso, estos análisis de asociación espacial pusieron de manifiesto que el cambio en el ambiente lumínico asociado al paso de las estaciones es más acusado a ras de suelo que a un metro sobre el mismo; esto es, que el ambiente lumínico que en cada punto perciben los individuos de cierto porte cambia con el paso del tiempo menos drásticamente que el que perciben los individuos de menor porte. Así, si bien la irradiancia incidente sobre los huecos sigue un mismo patrón espacial a lo largo del año (corregido por el ángulo de incidencia), caracterizado por un fuerte gradiente desde el interior del dosel hacia la zona abierta y una preferencia por el borde norte de los huecos, la presencia del matorral en combinación con lo anterior altera el ambiente lumínico a ras de suelo, que pasa a ser espacialmente más homogéneo, pero temporalmente más heterogéneo, con mayores cambios estacionales.

Los niveles de irradiancia incidente bajo el dosel fueron muy similares, independientemente del punto considerado. Igualmente sucedió con los niveles

registrados en los claros (**Figuras VI.20, VI.21 y VI.22**). Sin embargo, en las zonas de transición entre el dosel y el claro, existen manifiestas diferencias entre las orientaciones norte y sur de las distintas parcelas, estando los mayores niveles de irradiancia claramente desplazados hacia el borde norte de los huecos, a pesar de que la zona de estudio no se encuentre a una gran latitud (Coates, 2000). Estas diferencias, consecuencia directa de la propia geometría solar (Canham *et al.* 1990) no se encuentran más atenuadas debido seguramente al tamaño no excesivamente grande de los claros (Coates, 2000), lo que hace que haya una mayor influencia de la orientación de la ladera, la inclinación de la pendiente y la presencia de los árboles que bordean el hueco (Albanesi *et al.* 2008).

En lo que respecta a la humedad del suelo, y al contrario que en el caso de la irradiancia PAR, es de destacar la ausencia de un patrón espacial claro (**Figura IV.23**), existiendo una fuerte heterogeneidad a pequeña escala impuesta, presumiblemente, por la interacción entre la irradiancia incidente en cada momento (resultado de la posición de cada punto respecto al dosel), la presencia de matorral acompañante y la variabilidad en propiedades del suelo (como la textura, el contenido de materia orgánica...) que modifican la capacidad de retención de agua del mismo. Esto explicaría el patrón observado en la disponibilidad de este recurso, irregular a una escala muy fina. En cualquier caso, este patrón es prácticamente imperceptible en la época estival, en la que se observaron los valores más bajos y más homogéneos desde el punto de vista espacial, como era de esperar considerando la típica sequía estival que se produce año tras año. Por otro lado, el análisis de asociación espacial entre los valores registrados en las distintas estaciones mostró que el cambio estacional más significativo (cuando deja de haber asociación espacial entre los patrones registrados) tiene lugar entre el verano y el invierno (**Tabla IV.7**), lo que sería consecuencia de las notables diferencias existentes en la disponibilidad de agua en el sustrato entre ambas estaciones (por la recarga del suelo con las lluvias otoñales) sumada a la influencia de otros factores antes mencionados. Por su parte, el mayor efecto de la presencia de hojarasca en el hueco situado a menor altitud podría deberse a una mayor acumulación de hojarasca en el mismo.

Finalmente, el mismo tipo de análisis, efectuado esta vez sobre los registros que, en cada estación, se habían hecho de las distintas variables monitorizadas, mostró resultados muy heterogéneos, de los que difícilmente puede extraerse un patrón que relacione la disponibilidad de agua con la de luz en las parcelas de estudio (**Tabla**

**VI.8).** Esto es consecuencia de la existencia de factores de control propios de la luz (e.g., (el cambio estacional en la irradiancia incidente), del agua (e.g. la heterogeneidad textural del suelo o el cambio estacional en las precipitaciones) así como factores que afectan a ambas variables (e.g., la posición respecto al dosel forestal o la presencia de matorral con diferente nivel de cobertura). y ponen de manifiesto la dificultad que entraña la caracterización de los microambientes en las parcelas, dado que los recursos clave estudiados presentan una heterogeneidad acusada, mayor desde una perspectiva espacial o temporal en función de las distintas estaciones. Esto refuerza la hipótesis de que es necesario considerar la descripción de su distribución espacial y su variación con el paso del tiempo, de cara a la interpretación de otras variables como la presencia de juveniles o su comportamiento ecofisiológico; y justifica el hecho de que se optase por i) estudiar la posible relación entre la distribución espacial de los juveniles censados y la distribución espacial de estos recursos clave, y ii) diferenciar entre seis microambientes distintos, dispuestos a lo largo del eje norte-sur de cada parcela y caracterizados por su posición respecto al dosel y el porcentaje de cobertura del suelo por parte de especies del matorral, para la selección de juveniles sobre los que medir las distintas variables ecofisiológicas.

*VI.4.3. El patrón espacial de distribución de juveniles censados: la influencia del ambiente lumínico, la disponibilidad de agua y la presencia de matorral.*

La distribución de los juveniles censados en las parcelas de estudio (**Figura VI.24**), que adoptó un patrón espacial en agregados e indicó una mayor concentración de los mismos en las zonas de claro, aunque con preferencia por el borde sur, menos expuesto que el opuesto, confirma hallazgos de trabajos de investigación previos, que sugerían una cierta dependencia de niveles de irradiancia altos por parte de los procesos de regeneración natural del pinsapar (Arista, 1995). No obstante, no es posible concluir que exista un patrón claro de asociación espacial entre esta distribución y las variables relacionadas con la disponibilidad de agua y luz que sea consistente en las parcelas (**Tabla VI.11**), salvo quizá la asociación positiva con la irradiancia PAR registrada en primavera (cuya coincidencia temporal con los niveles térmicos e hídricos adecuados es necesaria para el crecimiento), y la asociación negativa con la irradiancia a ras de suelo en verano hallada en dos de las tres parcelas (que podría contribuir al incremento en los niveles de evaporación del suelo y la menor disponibilidad hídrica para las plántulas de

menor porte), por lo que habría que considerar, además del efecto combinado de ambos recursos, la injerencia de otros factores, no abordados explícitamente, que también se expresan a una escala espacial muy fina (como la dispersión de la lluvia de semillas o las características del sustrato, por ejemplo). Del mismo modo, esto explicaría que no se haya podido extraer una relación sencilla entre la presencia de juveniles y el porcentaje de cobertura de matorral o la presencia/ausencia de las distintas especies que lo forman. En este sentido, otros trabajos previos relativos a la especie han considerado una mayor intensidad de la lluvia de semillas (Arista, 1995), mejor capacidad de germinación (Arista, 1993b) y mayores tasas de supervivencia de las plántulas de pinsapo en las zonas de hueco (Arista, 1994). En cualquier caso, parece obvio que la injerencia de distintos factores, operando a distintas escalas espaciales y temporales, influyen sobre la distribución espacial de plántulas y juveniles de la especie, que queda así “desacoplada” de los patrones espaciales que puedan establecerse inicialmente con la dispersión de las semillas (Augsburger y Kitajima, 1992).

#### *VI.4.4. Diferencias en el desempeño ecofisiológico de individuos localizados en distintos microambientes.*

Las distintas condiciones de suministro hídrico y luminoso existentes en los microambientes diferenciados tuvieron, como era de esperar, una clara influencia sobre el desempeño de cada individuo, a juzgar por la existencia de claras diferencias respecto a las variables ecofisiológicas consideradas entre individuos localizados en microambientes distintos (**Figura VI.25**). Así, para algunas de las variables relacionadas con el intercambio gaseoso y la disponibilidad de luz (tasa neta de fijación de C, concentración intercelular de CO<sub>2</sub>, eficiencia intrínseca en el uso del agua), además de encontrarse diferencias significativas con el paso de las estaciones, también se hallaron diferencias entre microambientes, sobre todo entre los que ocupan posiciones más expuestas, soleadas, y los que se hallan en la umbría. De hecho, los individuos situados en los primeros (especialmente los de “A mat” y “B norte”) mostraron las mayores tasas netas de fijación de C, sobre todo en primavera, como consecuencia de los mayores niveles de irradiancia PAR incidente, y la mayor eficiencia en el uso del agua y las menores tasas de concentración intercelular de CO<sub>2</sub> en la época estival, consecuencia de la confluencia de niveles altos de irradiancia con el cierre estomático parcial que provocarían la sequía estival y la menor disponibilidad de agua

en el sustrato. El hecho de que, sin embargo, no se hallasen diferencias entre microambientes en lo que respecta a la eficiencia intrínseca en el uso de la luz, que únicamente varió de forma significativa entre estaciones, pone de manifiesto la mayor influencia sobre esta variable de los niveles de irradiancia incidente, y la aparente menor plasticidad en el uso de este recurso por parte de los individuos de esta especie.

Por su parte, el descenso observado en la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> en los microambientes más expuestos con la llegada de la época estival estaría fundamentalmente relacionado con una disminución de la tasa de fotosíntesis ligada al desarrollo de procesos de fotoinhibición dinámica (Lambers *et al.* 1998), simultáneos a una disponibilidad hídrica limitada, dado que, por su parte, el descenso estacional en las tasas de conductancia estomática fue similar a lo largo de todo el gradiente ambiental.

En lo que respecta a las variables más directamente relacionadas *a priori* con la disponibilidad de agua, como el potencial hídrico xilemático, indicativo del estatus hídrico del individuo, y la conductancia estomática al agua, el hecho de que se hallase en todos los casos una fuerte estacionalidad, con los menores potenciales (valores más negativos) y las menores tasas de conductancia en verano, de forma muy similar para individuos localizados en microambientes totalmente distintos (**Figura VI.25**), tendría que ver lógicamente con la intensidad de la sequía estival típicamente mediterránea. Por su parte, el patrón irregular a una escala muy fina de humedad en el sustrato hallado atenuaría las posibles diferencias entre microambientes en primavera e invierno.

Es de destacar la elevada tasa de fijación de C registrada en primavera en los brinzales localizados en el hueco asociado al matorral (“A mat”), probablemente debido a que se están dando simultáneamente condiciones adecuadas de irradiancia y disponibilidad hídrica, y el contraste que suponen los valores registrados en otras zonas menos expuestas, como los microambientes de dosel. Por otro lado, durante el verano se registraron los menores valores en la zona de suelo desnudo (“A des”) y en las zonas de dosel y borde sur (“B sur”, “D sur”), lo que podría deberse a una parada de la actividad fotosintética asociada a la menor disponibilidad hídrica durante este periodo (especialmente en el suelo desnudo) y a los menores niveles de irradiancia de los microambientes que quedan menos expuestos, al abrigo del dosel. La recuperación de los niveles de conductancia con la llegada del invierno y una mayor disponibilidad de agua en el sustrato, sugiere que la mayor disponibilidad de luz en determinados microambientes permitiría un incremento en la tasa de fijación de C.

El patrón estacional hallado para la eficiencia intrínseca en el uso del agua contrasta con el hallado tanto para el potencial hídrico xilemático como para la conductancia estomática al agua, de lo que se deduce que los niveles de irradiancia incidente así como la activación de la maquinaria fotosintética por parte de ésta juegan un papel fundamental en la resolución del *tradeoff* sobre el par de recursos agua-luz que se establece para estos individuos.

*VI.4.5. Estado de suministro de C y crecimiento primario en individuos localizados en microambientes distintos.*

La reserva no estructural de carbono en organismos vegetales (la fracción lábil del mismo) comprende distintas clases de compuestos: carbohidratos, lípidos, ácidos orgánicos, fenoles, taninos y una multitud de metabolitos secundarios (Chapin *et al.* 1990). En principio, la mayoría de estos compuestos puede ser considerada como una reserva potencial de C (Glerum y Balatinezc, 1980). En especies forestales, esta reserva suele hallarse en forma de almidón, azúcares solubles y lípidos, fundamentalmente triacilglicerol (Fischer y Höll, 1991, 1992), siendo particularmente abundantes los azúcares de bajo peso molecular (glucosa, fructosa, sacarosa, etc.) y el almidón. En el caso particular de las coníferas, los carbohidratos no estructurales, como el almidón, y los lípidos, han sido identificados como la principal reserva de C (Sinnott 1918; Kramer y Kozlowski, 1979), siendo el almidón el principal de estos compuestos (Webb 1981).

La concentración de carbohidratos no estructurales constituye un buen indicador del estado de aprovisionamiento de C en organismos vegetales (Körner, 2003), ya que ésta se incrementa o decrece en función del equilibrio en la relación fuente-sumidero para el carbono (fotosíntesis vs. gastos respiratorios y de crecimiento - Mooney 1972; Chapin *et al.* 1990); es decir, el tamaño de este *pool* es el resultado medible del equilibrio entre el suministro de C vía fotosíntesis y la demanda para el crecimiento y el metabolismo (Chapin *et al.* 1990). La importancia funcional de estos compuestos reside en que constituyen, junto con reservas de otro tipo, el capital con que cada árbol cuenta para el crecimiento tras la dormancia, y en que, aunque no todo el carbono “almacenado” está disponible para el individuo, estos reservorios actúan como un tampón capaz de amortiguar los problemas derivados de situaciones en las que la demanda excede el suministro de carbono (Chapin *et al.* 1990), por ejemplo, una actividad fotosintética insuficiente a causa del mal tiempo o la pérdida de follaje.

La dinámica estacional en la concentración de estos compuestos está muy relacionada con las funciones que desempeñan, y con las características de las distintas especies y su fenología. En climas templados, los carbohidratos de reserva pueden disminuir hasta incluso agotarse en la época de dormancia, cuando el individuo se ve desprovisto de tejidos fotosintéticos (en especies caducifolias) o éstos están inactivos (especies perennes) (Hoch *et al.* 2003). En el caso particular de las coníferas, Kramer y Kozlowski (1979) y Piispanen y Saranpää (2001) han sugerido que esta variación estacional es más pronunciada que en especies caducifolias, dado que éstas han de almacenar grandes reservas de C para permitir la generación de follaje y de los anillos de crecimiento con la llegada de la primavera. También en la fase de máximo crecimiento (a finales de primavera y principios de verano) puede producirse un fuerte disminución en la concentración de carbohidratos no estructurales, cuando la demanda de C puede exceder el suministro vía fotosíntesis, y es preciso movilizar estas reservas para satisfacer la demanda (Hoch *et al.* 2003).

A pesar de estas variaciones estacionales, lógicamente relacionadas con la fenología, los organismos vegetales tienen una libertad de acción limitada respecto al agotamiento de estos reservorios, existiendo ciertos límites por debajo de los cuales estas reservas se mantienen intactas, salvo en situaciones de verdadera emergencia para esto. El déficit de agua, por ejemplo, afecta a la contribución de los azúcares solubles y el almidón al *pool* total de carbohidratos (Correia *et al.* 2006), inhibiendo la síntesis de almidón y provocando un cambio en la partición de los carbohidratos de nueva síntesis hacia azúcares solubles (Freeden *et al.* 1991; Zrenner y Stitt, 1991; Quick *et al.* 1992). Estos compuestos, por sus propiedades osmorreguladoras, se han hallado en mayores concentraciones durante la época estival en distintas especies, como estrategia para aminorar los efectos de la sequía a través de la retención osmótica de agua en los tejidos (Morgan, 1984; Chaves *et al.* 2003).

Con el propósito de conocer el estado de suministro de C en los individuos juveniles seleccionados para el seguimiento de variables de tipo ecofisiológico, se evaluó la concentración de carbohidratos no estructurales (totales) en épocas en las que la demanda de éstos varía a causa de la fenología de la especie. En particular, se ha determinado la concentración de azúcares libres solubles, de bajo peso molecular (glucosa, fructosa, sacarosa), de almidón, y de carbohidratos no estructurales totales (como la suma de los dos anteriores), en tres momentos diferentes del tiempo: a mediados de primavera, justo antes de la ruptura de las yemas con los nuevos brotes; a

mediados de verano, momento en el que la sequía estival provoca el fin de la elongación de los nuevos brotes; y a mediados de otoño, cuando la bajada de las temperaturas propia de la época pone fin a la estación de crecimiento. El objetivo era, a través de la medida de la concentración de estos reservorios en cada momento del tiempo, conocer las reservas con que afrontan el invierno, la demanda de carbono para el crecimiento primario y el consumo que tiene lugar a lo largo de la estación de crecimiento completa. Por otro lado, es de destacar que estos reservorios se midieron en el xilema, y no en el tejido foliar, si bien es cierto que existen evidencias de una evolución estacional similar del comportamiento de estos reservorios en ambos tipos de tejidos en *A. alba* y otras especies de coníferas (Hoch *et al.* 2003), que podría deberse a la proximidad física del xilema empleado a los sumideros de C que constituyen los propios brotes.

La ausencia de diferencias significativas entre distintos microambientes o entre distintos momentos del tiempo en lo que respecta al contenido en azúcares libres, sugiere que no se produjo, en ningún microambiente, una acumulación de este tipo de compuestos por su carácter osmorregulador para afrontar la sequía estival (lo que concuerda con resultados previos que pusieron de manifiesto la ausencia de patrón estacional en el potencial osmótico – Linares, 2008). Esto apuntaría a que quizá esta época de carestía hídrica no fue tan severa para la especie como cabría esperar en un principio, o más probablemente a la incapacidad de la especie para ejercer esta regulación, lo que podría a su vez impedir la inhibición de la fotosíntesis durante la época estival por procesos de retroalimentación (Goldschmidt y Huber, 1992; Souza *et al.* 2004).

La evolución estacional del contenido en almidón, altamente significativa, mostró, en primer lugar, la máxima concentración de este compuesto en primavera, como resultado probable de la existencia de condiciones óptimas para el desarrollo de la actividad fotosintética. El brusco descenso experimentado a finales de la primavera es fruto de la movilización de este recurso para destinar el carbono necesario a crecimiento estructural en la fase de elongación de tallos (Hoch *et al.* 2003). Posteriormente, los niveles de almidón, aunque experimentaron un ligero incremento, como provisión de reservas al individuo para afrontar el invierno, permanecieron ya bajos hasta el final de la estación de crecimiento, y no se recuperaron los niveles registrados inicialmente, posiblemente por la limitación en la fijación de C impuesta por la sequía estival (**Figura VI.26.B**). Las diferencias significativas encontradas entre los niveles registrados al inicio y al final del periodo de elongación de brotes correspondieron a los

microambientes con mayores niveles de irradiancia, y con mayores tasas de fijación de C y crecimiento.

La evolución temporal del contenido en carbohidratos no estructurales totales fue muy similar a la experimentada por los niveles de almidón, lo que es lógico si consideramos el mayor contenido promedio de este compuesto respecto al de los azúcares solubles, y el hecho de que frente a la escasa variación detectada en el contenido en azúcares solubles, el patrón estacional detectado en el contenido de almidón fue altamente significativo (**Figura VI.26**). Así, los niveles de carbohidratos no estructurales totales mostraron en general un comportamiento similar al del almidón, especialmente acusado en los microambientes “B norte”, “B sur” y “A mat”, para los que se hallaron diferencias entre el inicio y el final del periodo de elongación de brotes. Estos resultados sugieren de nuevo que el efecto de estímulo de la luz sobre la elongación de brotes (crecimiento primario) de los juveniles es más complejo que su simple acción directa y coetánea sobre la fotosíntesis. Durante el periodo primaveral, en los microambientes más expuestos concurren adecuación térmica y disponibilidad hídrica, pero también una mayor irradiancia incidente respecto al resto de microambientes, motivo por el que se registraron las mayores tasas de fijación de C en estos microambientes más expuestos. Pero el crecimiento en estos microambientes también se vería incentivado adicionalmente merced al consumo proporcionalmente mayor de las reservas de carbohidratos de reserva que se ha observado en los mismos.

Esta argumentación es coherente, en general, con los resultados de crecimiento primario en ramas (**Figura IV.27**), que fue significativamente mayor en los individuos localizados en los microambientes más expuestos. Además, la tasa de crecimiento se correlacionó positivamente con la fijación de C en los muestreos de primavera y verano, y con la eficiencia intrínseca en el uso del agua en el de primavera; pero negativamente con el contenido en carbohidratos totales medido al finalizar la estación de crecimiento (**Figura VI.28**). Por tanto, los individuos de las zonas más expuestas son los que más crecieron y más carbono fijaron, pero también los que más reservas movilizaron en el periodo de actividad vegetativa, afrontando el invierno con las reservas más mermadas. Por su lado, los individuos de las zonas menos expuestas, frecuentemente suprimidos, mostraron un menor crecimiento junto con un mayor contenido en carbohidratos no estructurales totales al finalizar la estación de crecimiento. Esto concuerda con estudios previos que han hallado una mayor inversión en reservas en condiciones de baja irradiancia (Kobe, 1997; Canham *et al.* 1999); estos estudios plantean la hipótesis de

que existe un *tradeoff* entre el crecimiento de biomasa aérea y el almacenamiento de carbohidratos de reserva (Kozlowski, 1992; Canham *et al.* 1999), e incluso que variaciones en la alocaión de carbohidratos constituyen un mecanismo para la variación interespecífica en la supervivencia bajo condiciones de baja irradiancia (Kobe, 1997). Cuando el crecimiento de los individuos que menos C fijan y que menos crecen se ralentiza hasta el punto de convertir esa situación de supresión en algo crónico, disminuyen por lo general los costes derivados del gasto respiratorio (Veneklas y den Ouden, 2005), lo que podría contribuir a afianzar esos mayores reservorios en individuos raquíuticos con el paso del tiempo. No obstante, a pesar de que existe la relación inversa entre el contenido en carbohidratos y la tasa de crecimiento promedio, el hecho de que no se hallaran diferencias significativas entre microambientes podría deberse a que los individuos que más crecen son lo que más carbono fijan, parte del cual puede fácilmente constituir reservas notables de carbohidratos en estos individuos.

Por otro lado, y a pesar de que no pueda deducirse un patrón evidente de asociación espacial entre la tasa de crecimiento y el patrón espacial de recursos clave, es de destacar que la distribución espacial de la irradiancia incidente a nivel del suelo no explique en casi ningún caso las diferencias halladas en la tasa de crecimiento de individuos localizados en distintos microambientes, siendo la irradiancia incidente registrada a un metro del suelo mucho más explicativa de este fenómeno. Así, el ambiente lumínico que perciben los individuos a un metro del suelo explica en mayor medida el crecimiento experimentado por individuos localizados en distintas microambientes, siendo incluso mejor que otras variables como la disponibilidad hídrica en el sustrato.

#### *VI.4.6. Aproximación al comportamiento ecofisiológico de individuos localizados en distintos microambientes.*

El análisis de componentes principales realizado sobre una batería de variables ecofisiológicas aportó una visión de conjunto de las diferencias que existen entre individuos localizados en distintos microambientes, en base a su desempeño en las condiciones en que se encuentran. El hecho de que este tipo de análisis haya conseguido explicar un porcentaje de varianza mayor en primavera y verano que en invierno podría ser indicativo de que, en lo referente al comportamiento ecofisiológico, existen mayores diferencias entre microambientes en las dos primeras estaciones, lo cual es lógico

considerando la dormancia y ralentización de procesos que tienen lugar con la bajada de temperaturas invernal.

El ACP realizado sobre los datos de primavera ordenó los microambientes según dos gradientes principales que se han interpretado como indicativos de aptitud ecofisiológica o *fitness* y movilización/utilización de reservas (PC2). Así, los individuos para los que se registraron las mayores tasas de fijación de C son los que presentaron una mayor aptitud conforme a estos resultados, mientras que los individuos localizados en el microambiente de dosel norte se segregó claramente del resto en el espacio de fases PC1-PC2, denotando una menor aptitud ecofisiológica y movilización de reservas. Esto a su vez concuerda con el pobre crecimiento promedio mostrado por estos individuos, el mínimo de los registrados (**Figura VI.30**).

En verano, el ascenso de las temperaturas y la menor disponibilidad hídrica hacen que tenga más peso sobre el primer eje la eficiencia en el uso del agua, aunque en sentido inverso, en detrimento de la eficiencia en el uso de la luz, como era de esperar si consideramos el *tradeoff* existente entre ambas, que se desencadena cuando existe limitación en algún recurso clave, como en este caso la disponibilidad hídrica. Este primer eje, determinado asimismo por la fijación de C, también en sentido inverso, y por el potencial hídrico, se interpreta como un indicador del grado de estrés ambiental, fundamentalmente hídrico,) y la forma en que los individuos afrontan esta situación. El segundo eje, sobre el que pesaron más la eficiencia en el uso de la luz y el contenido en carbohidratos, se podría interpretar como indicativo de la actividad residual que desarrollan individuos de ambientes menos estresante en este periodo.

La segregación de microambientes hallada durante la época estival es indicativa de las notables diferencias que existen entre los individuos adscritos a uno u otro microambiente en esta época del año. Los individuos de las zonas más soleadas y expuestas (“B norte” y “A mat”) son los que exhiben una mayor eficiencia en el uso del agua y una mayor tasa de fijación de C. El hecho de que los niveles de PAR se desplacen hacia la zona norte de las parcelas (**Figuras VI.20, VI.21 y VI.22**) hace que los individuos con orientación sur (microambientes “D sur”, “B sur” y “A des”) muestren menores tasas de fijación de C y una menor eficiencia en el uso del agua, motivo por el que se segregan de los microambientes antes citados. Por su parte, los individuos localizados en el dosel norte, al encontrarse menos estresados desde el punto de vista hídrico, parecen desarrollar cierta actividad residual relacionada con el contenido en carbohidratos, que les permite diferenciarse de otros microambientes.

En invierno, el principal cambio en la interpretación se debe al contenido en carbohidratos no estructurales, que pasa a tener más peso en el primer eje que sobre el segundo, lo que podría estar reflejando la importancia que tiene la disponibilidad de reservas de cara a afrontar esta estación. Además, las bajas temperaturas de este periodo ponen fin a la segunda fase (periodo otoñal) del crecimiento secundario (Woodward, 1987), por lo que cualquier extra en la producción de fotosintatos puede destinarse a la generación y/o mantenimiento de estas reservas. Estos cambios permiten distinguir claramente a los individuos del borde norte, seguramente por el desplazamiento de los mayores niveles de PAR incidente hacia este microambiente (**Figura VI.22**), y con ello la posibilidad de fijar carbono. Por su parte, la segregación de individuos del dosel norte estaría relacionada con la mayor reserva de carbohidratos (son los individuos que mostraron un menor crecimiento). El resto de microambientes, agregados y separados de los dos mencionados, parecen albergar individuos que se encuentran menos activos durante la época invernal, a juzgar por su posición en este espacio de fases.

*VI.4.7. Influencia del medio ambiente abiótico y biótico en la distribución de juveniles de pinsapo: una aproximación mediante análisis de regresión logística.*

Los múltiples análisis realizados previamente, que trataban de hallar la posible relación existente entre la distribución de los juveniles de pinsapo y la variabilidad espacial y temporal de los principales recursos clave, carecían de una perspectiva global, en la que se considerasen las distintas variables simultáneamente.

Los análisis de regresión logística brindan la posibilidad de describir la ocurrencia y distribución de los individuos censados empleando todas las variables registradas simultáneamente. Además, han permitido considerar la inclusión de la versión “espacial” de estas variables - el patrón de distribución espacial que han mostrado en las distintas estaciones- , y de la propia posición del individuo respecto al sistema de referencia (“coordenada X” y coordenada Y”), lo que consiguió explicar en mejor medida el patrón espacial de la regeneración natural en las parcelas de estudio. Así, la partición de la varianza realizada mostró que, a pesar de que el análisis no consiguió explicar un porcentaje muy importante de la misma, los modelos que han considerado en conjunto las variables “ambientales” y “espaciales” explicaron un porcentaje significativo de la misma. Es más, las variables “espaciales” siempre explicaron por sí mismas un porcentaje muy superior al obtenido con las variables

“ambientales” puras, lo que indica que, más que la disponibilidad de recursos registrada puntualmente, es la distribución espacial a microescala de recursos clave lo que determina en mayor medida el éxito o el fracaso en el establecimiento de nuevos individuos. No obstante, el hecho de que exista un notable porcentaje de varianza “no explicada” tiene que ver con la injerencia de otros factores, no abordados explícitamente en este estudio. Por otro lado, y al igual que lo sucedido con los análisis de componentes principales realizados, estos análisis consiguieron explicar el mayor porcentaje de la varianza en primavera, seguido del verano y del invierno, lo que sugiere que, si bien la posición *a priori* de un individuo viene determinada por el azar (el lugar en el que caiga el piñón en octubre-noviembre, según Arista y Talavera (1994)), más importante para el éxito o fracaso de ese individuo son las condiciones que encuentre cuando germine (Arista, 1993b), y en las sucesivas primaveras. Además, esto podría ser de nuevo indicativo de que las diferencias existentes entre microambientes son más acusadas en primavera que en el resto de las estaciones, en las que se produce una relativa homogeneización de las condiciones ambientales, por escasez de luz en invierno, por ejemplo, o de disponibilidad hídrica en verano.

En cuanto a las variables consideradas buenas predictoras de la distribución de juveniles, en base a los resultados de estos análisis, cabe destacar la importancia del matorral presente en las parcelas de estudio – entre las variables ambientales destacó el porcentaje de cobertura de matorral existente, y entre las variables “espaciales”, la distribución de una de las especies de matorral más abundantes, *Ulex baeticus*. En primavera y verano fue significativa, además, la heterogeneidad espacial del ambiente lumínico, lo que sugiere el papel clave que desempeña este recurso en ambas estaciones.

#### *VI.4.8. Influencia del medio ambiente en el desempeño de juveniles de pinsapo en huecos naturales del dosel forestal.*

De forma análoga a los análisis de regresión logística, los análisis de redundancia y de redundancia parcial efectuados permitieron conocer el papel que juegan distintas variables abióticas y bióticas en el desempeño de juveniles de pinsapo, caracterizado mediante el seguimiento de distintas variables de índole ecofisiológica en una selección de individuos localizados en distintos microambientes.

Al igual que en el apartado anterior, se incluyeron en estos análisis, como variables independientes, las variables ambientales “puras”, de carácter biótico (como el

porcentaje de cobertura de matorral, o la presencia de individuos de otras especies) y abiótico (relacionadas con la disponibilidad de agua y de luz), y las denominadas “variables espaciales”, con la intención de considerar en los análisis la distribución espacial de las variables antes mencionadas, además de la posición dentro del hueco (coordenadas X e Y).

De entre los distintos análisis llevados a cabo, los que consiguieron explicar un mayor porcentaje de la varianza hallada fueron aquellos que consideraron conjuntamente variables ambientales y espaciales, lo que supone una muestra más de la importancia de considerar la distribución espacial de las variables estudiadas. De hecho, y al igual que en los análisis de regresión logística, las variables “espaciales” consideradas por separado consiguieron explicar el *fitness* exhibido por los individuos en mayor medida que las ambientales “puras”, aunque también éstas consiguieron explicar un porcentaje significativo de la misma. El hecho de que la fracción de varianza no explicada sea bastante inferior al caso de la presencia/ausencia de individuos pone de manifiesto que, en lo que respecta a las variables bióticas, indicativas del *fitness* de los individuos seleccionados, existe una menor variabilidad intrínseca de los datos y los resultados pueden explicarse en mayor medida por las variables ambientales y espaciales contempladas en este estudio.

En lo que respecta a la fracción de varianza explicada, nuevamente se observa que en el comportamiento de los individuos no sólo influyen las variables “ambientales”, sino que también lo hacen, incluso en mayor medida, las variables que recogen la heterogeneidad espacial a pequeña escala de los factores ambientales y de la presencia y abundancia de otras especies. El hecho de que la fracción de varianza explicada de forma compartida por ambos grupos de variables muestre diferencias entre estaciones sugiere de nuevo la importancia de los cambios que experimenta la distribución espacial de los recursos clave en distintas épocas del año, dependiente de la existencia o no de gradientes ambientales claros en las mismas. En este sentido, -durante el verano, el incremento generalizado de los niveles de luz en buena parte de las parcelas, y la drástica reducción de la humedad del sustrato en prácticamente todos los puntos, hace que se atenúen los gradientes de recursos característicos que tanto influyen en el desempeño de los individuos adscritos a los distintos microambientes en primavera e invierno, de forma que el patrón espacial de los recursos no covaría en esta estación con la variación de la componente puramente ambiental de dichas variables.

Entre las variables que resultaron significativas en los distintos momentos del tiempo (**Tabla IV.21**), destacan por su importancia el porcentaje de cobertura de matorral, la irradiancia PAR y la presencia de distintas especies de matorral, sobre todo de las más abundantes. El porcentaje de humedad sólo fue significativo en verano, lo que pondría de manifiesto hasta qué punto el comportamiento ecofisiológico en esta época del año estaría determinado por el déficit hídrico. La ausencia de significación de esta variable en primavera e invierno sugiere que las condiciones de suministro hídrico no son tan determinantes en esos periodos.

El hecho de que el PAR incidente y el porcentaje de humedad sean las variables ambientales con significación en el verano, y no su distribución espacial, refleja la ausencia de un gradiente espacial por homogeneización en las condiciones lumínicas e hídricas durante este periodo. Así, el exceso de luz y el déficit hídrico *per se* limitarían la actividad fisiológica de los individuos de *A. pinsapo* en la época estival. Por su parte, la abundante presencia de *Ulex* contribuiría a aliviar el estrés fisiológico experimentado en este periodo, atenuando el exceso de luz y aumentando localmente la disponibilidad hídrica, de ahí que esta variable sea también significativa en este análisis.

En primavera, las variables que mejor explicaron el comportamiento ecofisiológico observado fueron el patrón de agregación de la irradiancia y de la cobertura de matorral, reflejando la primera de ellas la importancia que en esta estación cobra la distribución espacial de este recurso clave, que estaría relacionada con la existencia de patrones espaciales observables a la escala y resolución consideradas en este trabajo. La irradiancia y el porcentaje de cobertura tendrían un efecto contrario, de forma que la presencia de matorral en una unidad de muestreo y las adyacentes modularía el patrón espacial de la irradiancia registrada a ras del suelo y, como consecuencia, la disponibilidad de adecuados niveles de luz para los juveniles. De forma análoga, la distribución espacial de la irradiancia PAR y la presencia de *Ulex* fueron las variables más importantes en invierno. El cambio en el ángulo de inclinación solar explicaría que, en este caso, la variable significativa sea la irradiancia registrada a un metro, y no a ras del suelo.



## **VI.5. Conclusiones.**

- Los registros efectuados de los principales recursos clave han puesto de manifiesto los distintos tipos de gradientes ambientales que caracterizan los huecos naturales del dosel del pinsapar y las zonas circundantes a éstos, confirmando la existencia de los microambientes previamente definidos.
- Los registros de la irradiancia PAR incidente a un metro del suelo mostró una notable heterogeneidad espacial, con un gradiente característico desde la zona cubierta por el dosel hasta la zona de claro, que fue especialmente patente en primavera y verano.
- Se halló en casi todo momento una distribución irregular, a una escala muy fina, de la humedad del sustrato, determinada por la posición respecto al dosel, las características del sustrato y la presencia del matorral en cada punto de muestreo.
- La distribución espacial de los individuos juveniles censados reveló un patrón en agregados, con mayor concentración de individuos en el claro, y una preferencia por el borde sur de los huecos para el establecimiento de plántulas.
- Los análisis efectuados sobre las distintas variables ecofisiológicas son coherentes con los registros espaciales y temporales de los recursos clave. Así, para las variables relacionadas con la disponibilidad hídrica, se encontró un fuerte patrón estacional, debido fundamentalmente a la sequía estival. Para las variables relacionadas más directamente con la disponibilidad de luz, el patrón espacial fue más evidente, registrándose los mayores valores en los microambientes más soleados y expuestos.
- La variable que reflejó mejor las diferencias entre los microambientes a lo largo del transecto norte-sur de las parcelas fue la eficiencia intrínseca en el uso del agua, reflejando simultáneamente la disponibilidad de agua y de luz en los distintos microambientes.
- El análisis de componentes principales efectuado consiguió segregar los microambientes en términos del comportamiento ecofisiológico de los individuos presentes en cada uno de ellos, variando la importancia relativa de las distintas variables consideradas en función de la estación.
- Los análisis de regresión logística y de redundancia (total y parcial) efectuados han puesto de manifiesto asimismo la importancia de considerar la distribución espacial de todas las variables estudiadas, toda vez que los análisis que explicaron un mayor porcentaje de la varianza hallada fueron aquellos que consideraron conjuntamente las variables “ambientales” y “espaciales”.

- En lo que respecta a la influencia de las variables ambientales y espaciales en la distribución espacial de los individuos censados, el mayor porcentaje de varianza explicada por la regresión logística en primavera sugiere que lo fundamental en el establecimiento y supervivencia de los individuos, además de que el piñón correspondiente caiga en uno u otro lugar, son las condiciones microclimáticas que encuentran durante esta época del año.
- La existencia de valores altos de varianza compartida por las componentes ambiental y espacial en invierno y primavera por los análisis de redundancia refleja la existencia de gradientes fuertemente acusados en estos periodos, asociados a la covariación de ambas componentes. En verano sigue existiendo una fuerte importancia de la componente espacial de dichas variables, que está en este caso determinada por la homogeneidad que establece la sequía estival y la elevada disponibilidad lumínica.
- Los niveles de luz propios de la primavera y el verano tienen sobre los individuos establecidos en los microambientes más expuestos una influencia muy positiva, a juzgar por las mayores tasas de crecimiento halladas en estos individuos, que contrastan con las registradas en individuos localizados bajo el dosel, fuertemente suprimidos.



## **VI. Discusión general**

---



## VII. Discusión general.

### VII.1. La ecofisiología del pinsapo y el interés de su comparación con *A. alba*.

Los pinsapares del sur de la Península Ibérica constituyen relictos de bosques templados de coníferas que en la actualidad se encuentran sometidos a condiciones climáticas de tipo mediterráneo. Se tiene un notable conocimiento sobre la dinámica reciente de estas masas forestales, en las que se han advertido tendencias de decaimiento por causas diversas en las distintas localizaciones en que se encuentran (e.g. contaminación atmosférica, periodos sucesivos de sequía, ataque por hongos patógenos), pero no se conoce en profundidad cómo funciona la autoecología de la especie en ausencia de perturbación y menos aún frente a condiciones alteradas, o dicho de otro modo, por qué *A. pinsapo* no exhibe respuestas con éxito desde el punto de vista de la supervivencia frente a los factores de estrés antes mencionados.

En esta Memoria se describen los experimentos llevados a cabo para evaluar la respuesta de esta especie ante variaciones controladas en la disponibilidad de recursos clave, así como el seguimiento de individuos juveniles en una población natural de la misma, realizado para completar su perfil ecofisiológico, contrastar la solidez de las evidencias halladas en los experimentos citados, y conocer en qué medida la heterogeneidad ambiental a pequeña escala (tanto espacial como temporal) determina el éxito de los procesos de regeneración natural de la especie. Por otro lado, en estos experimentos de laboratorio se han empleado como objeto de estudio individuos juveniles tanto de *A. pinsapo* como de *A. alba*, la otra especie de abeto circunmediterráneo presente en la península Ibérica (López y Amaral, 1986). El interés de esta comparación radica fundamentalmente en el hecho de que esta otra especie sea el principal exponente del grupo de abetos circunmediterráneos del norte, en el que se incluyen especies de rasgos más modernos que se diferenciaron con posterioridad al grupo de abetos del sur (ver, e.g. Liu, 1971; Farjon y Rushforth, 1989). Existen además notables diferencias entre ambas especies en lo que respecta al tamaño y el acervo genético de sus poblaciones, la extensión de su área de distribución y el rango de condiciones ecológicas que actualmente soportan (Scaltosoyiannes *et al.* 1999; Konnert y Bergmann, 1995; Scarascia-Mugnozza *et al.* 2000; Arista, 1995; Aussenac, 2002; Robakowski *et al.* 2004). A este respecto, y bajo la hipótesis de que en el proceso de especiación que originó ambas especies pudieron

seleccionarse diferentes tipos de rasgos (tolerancia a la sombra, capacidad de regulación del intercambio gaseoso, eficiencia en el uso del agua y de la luz) en función de las distintas condiciones ecológicas que experimentarían en sus rangos de distribución, los experimentos planteados en este trabajo han logrado poner de manifiesto la existencia de tales diferencias en lo que respecta al comportamiento ecofisiológico de las mismas.

## **VII.2. La luz como factor ambiental determinante de la autoecología de ambas especies.**

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados son consistentes con los hallazgos de trabajos de investigación previos, relativos a la notable tolerancia a la sombra de ambas especies (Arista, 1995; Robakowski *et al.* 2004), si bien indican que ésta es incluso más evidente en *A. alba*, como ponen de manifiesto la mayor eficiencia en el uso de la luz a baja irradiancia y las mayores concentraciones de pigmentos y el menor ratio Chl a: Chl b hallados en esta especie, el menor valor del ratio SLA encontrado en *A. pinsapo*, los patrones de reparto de biomasa y las diferencias halladas en lo que respecta a los parámetros fotosintéticos derivados a partir de las curvas P-I. No obstante, la presencia de la señal lumínica constituye un factor imprescindible para el desarrollo de ambas especies, habiéndose comprobado en dichos experimentos cómo el suministro de una dosis de irradiancia insuficiente provoca la ruptura de la dominancia apical, así como cambios de distinta índole a nivel morfológico (en los patrones de alocaión de biomasa, hacia una mayor inversión en biomasa aérea y foliar), bioquímico (incremento en la concentración de pigmentos fotosintéticos) y funcional (variaciones en las curvas P-I y en los parámetros derivados de las mismas, e.g. las tasas máximas de fotosíntesis neta y el punto de saturación para la luz). Se ha hallado incluso una fuerte dependencia de la síntesis de carbohidratos no estructurales respecto a la señal lumínica, mayor que respecto a la disponibilidad hídrica, reflejada no sólo en los bajos niveles de estos compuestos observados en el tratamiento a baja irradiancia, sino también en la “inmovilidad” de este tipo de reservas bajo estas condiciones. Esto, unido al escaso crecimiento observado en los individuos adscritos a este tratamiento, sugiere que el mismo constituía una verdadera limitación del *input* energético necesario para el desarrollo de los mismos.

Por otro lado, los resultados del seguimiento de individuos juveniles de *A. pinsapo* en huecos naturales del dosel forestal vienen a resaltar el papel crucial que juega la luz en los procesos de regeneración natural de la especie, al hallarse una mayor concentración de

plántulas y brinzales en la zona del claro, y unas mayores tasas de crecimiento en los microambientes más expuestos. Esto confirma la idea de que, si bien los niveles de irradiancia incidente en la parte superior del dosel deben ser relativamente altos a lo largo del año en comparación con otros sistemas, considerando la localización geográfica de las poblaciones del estudio, el sotobosque de estas masas de pinsapar es notablemente sombrío, especialmente si tenemos en cuenta el predominio de masas monoespecíficas, con un dosel cerrado y compacto, y caracterizadas por una elevada densidad de pies por hectárea, por lo que la apertura de claros y el consiguiente incremento de los niveles de luz en los estratos inferiores juega un papel fundamental en la dinámica de reclutamiento de nuevos individuos de la especie.

### VII.3. Estrategia de uso de los recursos y tolerancia al estrés.

En la primera parte de esta Memoria se han llevado a cabo una serie de experimentos conducentes a comparar dos especies de abetos filogenéticamente emparentadas desde el punto de vista de su ecofisiología, bajo la hipótesis de que entre ambas han de existir marcadas diferencias resultado del proceso de especiación que las originó, que estarían relacionadas con las distintas condiciones ecológicas existentes durante ese proceso y en su actual rango de distribución. Entre ambas especies existen además notables diferencias en lo que respecta a su extensión geográfica, el tamaño de sus poblaciones y el acervo genético de las mismas, que podrían modular a su vez el comportamiento ecofisiológico de estas especies, teniendo en cuenta que, por un lado, la plasticidad fenotípica tiende a estar positivamente asociada con una distribución ecológica más amplia (Valladares *et al.* 2000), y que a este proceso también puede contribuir la variabilidad genética existente en las poblaciones de una especie (Balaguer *et al.* 2001). En este sentido, al considerar el extenso ámbito de distribución de *A. alba*, el tamaño de sus poblaciones y la diversidad genética de las mismas, podría atribuirse a esta especie una mayor plasticidad fenotípica *a priori*. Además, *A. alba* en su actual rango de distribución parece hallarse por lo general bajo unas condiciones ecológicas más favorables para su desarrollo que *A. pinsapo*, en cuyo estrecho rango de distribución sus poblaciones se encuentran por completo inmersas en condiciones típicamente mediterráneas, en principio menos favorables para el desenvolvimiento de una especie de abeto. Por todo lo anterior, en esta Tesis Doctoral se propuso testar la hipótesis de Lortie y Aarssen (1996), según la cual la especialización en ambientes favorables incrementa la plasticidad y viceversa. En relación con esta hipótesis,

cabría suponer que *A. alba* mostrase un comportamiento más plástico en el uso de distintos recursos, como especie que, al estar presente en un amplio rango de distribución, experimenta asimismo distintas condiciones ecológicas, y por el contrario que *A. pinsapo*, de menor tamaño poblacional y un reducido ámbito de distribución, mostrase un comportamiento más moderado y un uso más conservativo de los distintos recursos.

Sin embargo, la especie que mostró un mayor rango de variación de las variables consideradas en cada caso, sugiriendo así una mayor plasticidad, fue *A. pinsapo*, especialmente en aquéllas relacionadas con la regulación del intercambio gaseoso. *A. alba*, por su parte, fue la especie que exhibió un comportamiento más conservativo en el uso de distintos recursos, al presentar en todo momento una respuesta más modulada, basada en variaciones más progresivas y de menor magnitud de las variables consideradas. En esta especie, a diferencia de *A. pinsapo*, se halló no sólo una mayor proporción entre las tasas registradas de fotosíntesis neta y de conductancia estomática al agua, sino también un mayor acoplamiento temporal entre las mismas, que dotó a los individuos de esta especie de una mayor capacidad de homeostasis. Este comportamiento más conservativo resultó además en una mayor eficiencia en el uso tanto del agua como de la luz en términos generales, y por ello en un mejor desenvolvimiento de los individuos de esta especie ante cambios en el ambiente lumínico e hídrico. Por todo lo anterior, se da la paradoja de que el comportamiento más “plástico” exhibido por *A. pinsapo* sólo resultó en un mayor éxito (*fitness*) de sus individuos en circunstancias en las que ninguno de los recursos clave fue limitante. En caso de que alguno de estos recursos, o ambos simultáneamente, tuvieran su disponibilidad limitada, el comportamiento más moderado y conservativo mostrado por *A. alba* resultaría más ventajoso para el desenvolvimiento de los individuos de esta especie en condiciones de estrés.

La aplicación experimental de estas condiciones de estrés por déficit hídrico y energético afectó tanto a las variables relacionadas con el intercambio gaseoso, como al estatus hídrico y la señal isotópica, actuando en sentidos opuestos sobre la eficiencia en el uso del agua y de la luz. Estos resultados indican la existencia de un claro *tradeoff* entre ambas, siendo éste de mayor intensidad en *A. pinsapo* como consecuencia de su menor eficiencia tanto en el uso del agua como de la luz. Esto unido a los menores valores de las concentraciones de NSC halladas en esta especie sugiere una menor tolerancia al estrés en comparación con *A. alba*. Por su parte, las variaciones experimentadas en las tasas de intercambio gaseoso por ambas especies fueron tendentes a maximizar la cantidad de C fijado mediante la fotosíntesis en relación con la cantidad de agua perdida vía

conductancia estomática ante cambios en las condiciones ambientales. Los mayores valores de este ratio encontrados en *A. alba* ponen de manifiesto una vez más la mayor capacidad de regulación de esta especie ante cambios en las condiciones ambientales.

En cualquier caso, el conjunto de resultados obtenidos sugiere que, a pesar de que puede pensarse *a priori* que *A. pinsapo*, por su estrecho rango de distribución, está sometida a unas condiciones ecológicas más homogéneas que las experimentadas por *A. alba*, lo cierto es que la heterogeneidad ambiental a pequeña escala existente en sus poblaciones, tanto temporal, ligada a la estacionalidad e impredecibilidad del clima mediterráneo, como espacial, ligada a los procesos de regeneración natural, ha debido promover la plasticidad en determinados rasgos dentro de sus poblaciones (Valladares *et al.* 2002), en coherencia con la hipótesis de que la selección en ambientes heterogéneos conduce a la coexistencia de genotipos con mayor plasticidad fenotípica (Balaguer *et al.* 2001). En este sentido, y dado que esta especie se encuentra sometida de forma estacional a bajos niveles de disponibilidad hídrica, cabría esperar que exhibiese una mayor plasticidad en rasgos relacionados con la tolerancia al estrés hídrico, e incluso con una mayor eficiencia en el uso de este recurso. No obstante, y si bien se ha observado una notable capacidad de respuesta ante cambios en las condiciones de suministro hídrico, los individuos de esta especie fueron menos eficientes en el uso del agua que los de *A. alba*. Así, es posible que el reducido tamaño de las poblaciones de *A. pinsapo* consideradas y el bajo nivel de heterocigosidad observado en las mismas, junto con la mayor plasticidad en el comportamiento respecto a este recurso, hayan constituido sendos límites ecológicos al desarrollo de estos procesos de selección y promoción de rasgos (Valladares *et al.* 2002; Ackerly, 2003; Jump y Peñuelas, 2005), lo que habría impedido la selección de genotipos más eficientes en el uso del agua, y explicaría el comportamiento menos exitoso de esta especie frente a *A. alba* en condiciones de limitado suministro hídrico, cuya estrategia basada en un uso más conservativo de este recurso resultaría así adaptativa (Valladares *et al.* 2000). Por otro lado, no hay que olvidar que en las extensas y diversas poblaciones de *A. alba* pueden darse con más facilidad estos procesos de selección de genotipos mejor adaptados a distintas condiciones ambientales, y que en los distintos experimentos descritos se han empleado individuos juveniles de esta especie provenientes de poblaciones del norte de España, localizadas en el límite meridional de la distribución de esta especie, donde se habrían seleccionado individuos con una mayor resistencia a la sequía que en poblaciones más septentrionales (Aussenac, 2002).

Las características ecofisiológicas de *A. pinsapo* observadas a lo largo de esta Memoria apuntan finalmente a que los requerimientos ecológicos de esta especie se corresponden en gran medida con las condiciones ambientales del pinsapar, no siendo éstas tan limitantes para el desarrollo de la especie como pueda pensarse en un principio, si consideramos, por ejemplo, la importancia de las precipitaciones totales recibidas cada año, los niveles de irradiancia incidente o la existencia de procesos espaciales a pequeña escala, que constituyen una fuente de heterogeneidad ambiental que a su vez favorece un adecuado desarrollo de los procesos de regeneración natural de la especie. De hecho, los pinsapares de la Sierra de Las Nieves han experimentado un notable incremento en su extensión en las últimas décadas, como consecuencia de la prohibición de prácticas tradicionales de aprovechamiento del monte y la protección de estos bosques derivada de su declaración como Parque Natural (Linares y Carreira, 2009). No obstante, la conservación de este ecosistema puede verse amenazada en caso de que se intensifiquen las condiciones de estrés hídrico ya existentes, dado que el reducido tamaño de estas poblaciones, su aislamiento geográfico y su limitado acervo genético reducen la posibilidad de que puedan seleccionarse en el futuro genotipos más eficientes en el uso del agua (Jump y Peñuelas, 2005).

#### **VII.4. Consideraciones ecológicas para la gestión de los pinsapares ante potenciales amenazas en el marco del Cambio Global: importancia de la heterogeneidad ambiental a microescala para la dinámica natural de regeneración del pinsapar.**

La política de gestión a que se han visto sometidos los pinsapares de la Sierra de las Nieves en las últimas décadas, caracterizada por la ausencia de actividades de intervención en la masa forestal y la prohibición de prácticas tradicionales de aprovechamiento del monte, ha generado con el paso del tiempo bosques con una elevada densidad de pies por hectárea y una notable competencia intraespecífica por factores ecológicos clave (fundamentalmente agua y luz) (Linares y Carreira, 2009), en los que es muy significativa la proporción de individuos suprimidos que no llegan a alcanzar la parte superior del dosel forestal. Estas poblaciones muestran además claros síntomas de declive, relacionados con la incidencia de periodos sucesivos de sequía y la propia estructura forestal (Linares y Carreira, 2009), que incrementan la susceptibilidad ante el ataque de un hongo patógeno de raíz (*Heterobasidion annosum*) específico de este abeto (Sánchez *et al.* 2007a). La confluencia de estos factores genera un patrón de mortalidad en rodales (Sánchez *et al.*

2005) que constituye a su vez una fuente de heterogeneidad espacial a pequeña escala, al producirse huecos que rompen la continuidad del dosel, en los que se incrementan notablemente tanto los niveles de irradiancia incidente como las tasas de evaporación. En estas circunstancias, podría intensificarse la competencia con otras especies forestales presentes en el pinsapar, como *Pinus* spp. y *Quercus* spp., especialmente en la banda altitudinal inferior, donde son más abundantes.

Al objeto de poder efectuar propuestas de manejo que atajasen los problemas de mortalidad y declive observados en estas poblaciones, y contribuir así a la conservación de un ecosistema de tanto interés, era necesario abordar en profundidad la ecofisiología de la especie y su dinámica natural de regeneración, motivo por el que se decidió completar el perfil ecofisiológico de la misma realizando un seguimiento a individuos juveniles localizados en huecos naturales del dosel forestal de dimensiones próximas a los producidos por el ataque del hongo.

Los resultados obtenidos apuntan a que la generación de huecos en el dosel, al menos los de tamaño similar a los estudiados en este trabajo, no constituye *a priori* un factor de riesgo que pueda comprometer los procesos de regeneración natural del pinsapar, a juzgar por las mayores tasas de crecimiento registradas en los microambientes más expuestos. Al contrario, la moderada tolerancia a la sombra de las plántulas y brinzales de pinsapo podría jugar a su favor, dado que esta característica les permitiría, por un lado, resistir bajo el dosel durante un tiempo considerable (Arista, 1995), y por el otro, aprovechar el incremento de los niveles de PAR que tiene lugar con la apertura de un claro. Esto es coherente con trabajos previos que han puesto de manifiesto que incluso las especies forestales tolerantes a la sombra requieren de la apertura de huecos para alcanzar la parte superior del dosel de bosques maduros (Spies y Franklin, 1989), y con resultados obtenidos en esta Memoria, que resaltan el papel determinante de la señal lumínica en el desenvolvimiento de la especie.

Por otro lado, el hecho de que este patrón espacial de “aptitud ecofisiológica” no coincida con la distribución espacial de los individuos censados en la zona de los huecos, sugiere que, entre otros factores, la presencia de distintas especies de matorral heliófilo podría haber contribuido al éxito de las plántulas y juveniles de pinsapo establecidos en estos microambientes, ejerciendo un efecto “nodriza” (Castro *et al.* 2002). Teniendo en cuenta los bajos niveles de luz registrados a ras de suelo, y la distribución irregular de la humedad disponible en el mismo, la existencia de este tipo de procesos viene a reforzar la

hipótesis de que las relaciones de facilitación predominan en los entornos adversos (Callaway, 1995).

En lo que respecta a la competencia con otras especies forestales, algunos estudios llevados a cabo en huecos pequeños del dosel de bosques maduros sugieren que, en ausencia de perturbaciones externas, la situación se vería dominada por especies moderadamente tolerantes a la sombra, mientras que especies menos tolerantes adquirirían un papel más preponderante en el dosel en caso de grandes perturbaciones, como los incendios (Barden, 1979, 1981). En nuestro caso, el fuego ha provocado históricamente la destrucción de una extensa superficie de pinsapar, y ha dificultado enormemente los procesos de regeneración natural en zonas incendiadas, ya que los piñones del pinsapo no germinan tras el paso de un incendio, ni sus troncos son capaces de rebrotar (Blanca *et al.* 1999). Además, los huecos que genera el fuego, típicamente de mayores dimensiones (Spies y Franklin, 1989), podrían verse colonizados de forma más significativa por especies de los géneros *Quercus* o *Pinus*, mejor adaptadas a condiciones más cálidas y secas. Estas especies no sólo son mucho más resistentes a la sequía: algunas también tienen también la capacidad de rebrotar tras un incendio, como *Q. rotundifolia* o *Q. faginea* (Pérez Latorre, 1993, Pausas *et al.* 2004); otras, como *Pinus* spp., de crecer a gran velocidad en el suelo desnudo que sigue a un incendio (Ceballos, 1938), y son por ello empleadas frecuentemente como especies pioneras en procesos de regeneración forestal, para prevenir la pérdida de suelo por erosión y facilitar el establecimiento de especies leñosas propias de etapas posteriores de la sucesión (Barberó *et al.* 1998). Pero estas especies sólo son significativamente abundantes por debajo de los 1100 metros, y se cree que no podrían competir con el pinsapo a mayor altitud (Arista, 1995).

A pesar de que los huecos naturales generados por la afección del hongo son en principio de pequeño tamaño, no hay que olvidar la posibilidad de que tengan lugar procesos de expansión y de coalescencia de estos huecos con el tiempo (Worrall *et al.* 2005), sobre todo considerando la densidad de pies de las masas afectadas, la naturaleza contagiosa de la afección por el patógeno, y el hecho de que se manifieste generando un patrón de mortalidad en rodales. El desarrollo de procesos espaciales de este tipo podría contribuir a que las perturbaciones fuesen mayores en el espacio y más persistentes en el tiempo (Worrall *et al.* 2005), favoreciendo así a las especies antes mencionadas, lo que hace de esta enfermedad un factor de riesgo real a considerar en la gestión de estos pinsapares. Por ello, sería necesario, por un lado, prever la velocidad a la que podrían producirse estos cambios y predecir la evolución que cabe esperar en las masas forestales

existentes actualmente, a la vista de la incidencia, recurrencia y virulencia de los ataques del hongo, y por el otro, realizar experimentos en los que interviniesen simultáneamente esas otras especies forestales presentes en el pinsapar, al objeto de conocer su comportamiento ecofisiológico y capacidad de respuesta bajo distinto tipo de condiciones, y poder dimensionar la amenaza real que suponen para la conservación del pinsapar a largo plazo.

Asimismo, hay que tener en cuenta que en los huecos del dosel forestal pueden darse simultáneamente los mayores niveles de irradiancia con una menor disponibilidad de recursos hídricos, lo que constituye el escenario perfecto para el desarrollo de procesos de *tradeoff* que sin duda pondrían en entredicho la capacidad de pervivencia de la especie. De hecho, los resultados obtenidos en esta Memoria demuestran la elevada dependencia de la misma tanto de un cierto umbral de irradiancia incidente como de un elevado consumo de recursos hídricos, y su menor capacidad para responder con éxito ante situaciones de escasa disponibilidad en ambos recursos simultáneamente.

Finalmente, es necesario recordar que trata de una especie relictica, que no afronta actualmente un amplio rango de condiciones ambientales y que además presenta una distribución muy limitada, con poblaciones situadas muy cerca de su límite climático de distribución, y creciendo por ello en condiciones sub-óptimas, lo que hace pensar que pueda ser especialmente sensible a los cambios en las condiciones climáticas que podrían producirse en el marco del Cambio Global (Gaston, 2003), dado que todas las predicciones auguran una intensificación de las condiciones climáticas típicamente mediterráneas en la región (IPCC 2007). Así, sería de esperar el incremento en la temperatura media, y con ello, el déficit de presión de vapor, lo que haría aumentar de forma sustancial el consumo de recursos hídricos por parte de esta especie, considerando las altas tasas de conductancia estomática y su menor capacidad de regulación del intercambio gaseoso. En caso de que, además, las sequías se hagan más intensas y prolongadas, las precipitaciones anuales varíen tanto en cantidad como en su distribución temporal y puedan incluso empeorarse las condiciones de suministro hídrico durante la primavera, los procesos de regeneración natural se verían seriamente amenazados (Aussenac, 2002), y disminuirían sensiblemente las probabilidades de conservación de estas poblaciones naturales a largo plazo.





## **VIII. Conclusiones generales**

---



## VIII. Conclusiones generales.

1. Los experimentos realizados en condiciones controladas con individuos juveniles de *Abies pinsapo* y de *Abies alba* muestran que ambas especies exhiben comportamientos similares fundamentalmente en lo que respecta a sus respuestas de aclimatación ante niveles de irradiancia más bajos, incluyendo la evolución temporal del contenido en pigmentos, la composición isotópica del tejido foliar nuevo y las tasas de intercambio gaseoso.
2. No obstante, se han puesto de manifiesto las notables diferencias ecofisiológicas existentes entre las mismas, especialmente en relación al distinto grado de tolerancia a la sombra (mayor en *A. alba*), la eficiencia en el uso del agua y la luz en condiciones de estrés hídrico y energético (mayor en *A. alba* en ambos casos), la intensidad del *tradeoff* en el par de recursos agua vs. luz (mayor en *A. pinsapo*), el distinto grado de ajuste entre las tasas de fotosíntesis neta y las de conductancia estomática al agua (mayor desproporción entre ambas en *A. pinsapo*), y la distinta capacidad de regulación de las tasas de intercambio gaseoso y de maximización de la relación entre la cantidad de C fijado y de agua perdida en distintas circunstancias (mayor en ambos casos en *A. alba*).
3. Este conjunto de diferencias ecofisiológicas apunta a que *A. alba* es la especie con mayor capacidad de homeostasis frente al tipo de cambios en las condiciones de suministro hídrico y ambiente lumínico que se simularon en los experimentos.
4. El trabajo realizado en poblaciones naturales de *A. pinsapo* confirma que el establecimiento de nuevas cohortes de individuos en el pinsapar depende de la disponibilidad de nichos de regeneración con niveles de irradiancia suficientemente elevados. Así, en este trabajo se ha documentado el papel crucial de la apertura de claros en el dosel sobre el regenerado de estos bosques, como indican la mayor abundancia de plántulas y brinzales en el interior de los huecos así como las mayores tasas de crecimiento de estos últimos en los microambientes más expuestos.
5. No obstante, la confluencia en estos huecos de mayores niveles de irradiancia con una menor disponibilidad de recursos hídricos podría desencadenar situaciones de *tradeoff* de

cierta intensidad, en las que hemos visto que la especie no se desenvuelve adecuadamente, comprometiendo la capacidad de regeneración natural del bosque, y abocar a estas poblaciones a una situación crítica.

6. El conjunto de estas evidencias sugiere además que, en caso de que como consecuencia del Cambio Climático, tenga lugar un empeoramiento de las condiciones climáticas de tipo mediterráneo que las poblaciones naturales de pinsapo actualmente soportan (mayores variaciones inter-anales en el patrón de precipitación, menores precipitaciones, sequías más intensas y prolongadas, incremento de la temperatura media del aire y por tanto del déficit de presión de vapor...), los procesos de regeneración natural de esta especie pueden verse seriamente amenazados, no sólo por la fuerte dependencia de los juveniles respecto a un elevado consumo de recursos hídricos, sino también por su baja eficiencia en la gestión de los mismos.



## **IX. Referencias bibliográficas**

---



## IX. Referencias bibliográficas

- Abe, S., Masaki, T. y T. Nakashizuka, 1995. Factors influencing sapling composition and canopy gaps of a temperate deciduous forest. *Vegetatio* 120: 21 – 32.
- Aber, J.D. 1992. Nitrogen cycling and nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution* 7: 220 – 224.
- Aber, J.D., Nadelhoffer, K.J., Steudler, P. y J.M. Melillo. 1989. Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *BioScience* 39: 378 – 386.
- Aber, J.D., Magill, A., McNulty, S.G., Boone, R.D., Nadelhoffer, K.J., Downs, M. y R. Hallett. 1995. Forest Biogeochemistry and primary production altered by nitrogen saturation. *Water, Air & Soil Pollution* 85: 1665 – 1670.
- Aber, J.D., Neilson, R.P., McNulty, S.G., Lenihan, J.M., Bachelet, D. y R.J. Drapek. 2001. Forest processes and global environmental change: predicting the effects of individual and multiple stressors. *BioScience* 51: 735 – 751.
- Ackerly, D. 2003. Community assembly, niche conservatism, and adaptive evolution in changing environments. *International Journal of Plant Sciences* 164 (3 Suppl.): S165 – S184.
- Adams III, W.W. y B. Demmig-Adams. 1992. Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta* 186 (3): 390 – 398.
- Ágren, G.I. y E. Bosatta. 1988. Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 54: 185 – 197.
- Albanesi, E., Gugliotta, O.I., Mercurio, I. y R. Mercurio. 2008. Effects of gap size and within-gap position on seedlings establishment in silver fir stands. *iForest* 1: 55 – 59.
- Albritton, D.L., Derwent, R.G., Isaksen, I.S.A., Lal, M. y D.J. Wuebbles. 1994. Trace gas radiative forcing indices. Páginas 209 - 231 en Houghton, J.T., Meira Filho, L.G., Bruce, J., Lee, H., Callender, B.A., Haites, E., Harris, N. y K. Maskell (Eds). *Climate change: radiative forcing of climate change* (347 páginas) Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Anderson, A.B. 1990. Extraction and forest management by rural inhabitants in the Amazon estuary. Páginas 65 – 85 en *Alternatives to deforestation: steps toward sustainable use of the Amazon rain forest* (281 páginas). Columbia University Press, Nueva York, NY, EE.UU.
- Aranda, I., Castro, L., Pardos, M., Gil, L. y J.A. Pardos. 2005. Effects of the interaction between drought and shade on water relations, gas exchange and morphological traits in cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. *Forest Ecology and Management* 210: 117 – 129.
- Arista, M. 1993a. Biología del pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.). Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Arista, M. 1993b. Germinación de las semillas y supervivencia de las plántulas de *Abies pinsapo* Boiss. *Acta Botanica Malacitana* 18: 173 – 177.
- Arista, M. 1994. Supervivencia de las plántulas de *Abies pinsapo* Boiss. en su hábitat natural. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 51: 193 – 198.
- Arista, M. 1995. The structure and dynamics of an *Abies pinsapo* forest in southern Spain. *Forest Ecology and Management* 74: 81 – 89.

- Arista, M. y S. Talavera. 1994. Phenology and anatomy of the reproductive phase of *Abies pinsapo* Boiss. (*Pinaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 116: 223 – 234.
- Arista, M. y S. Talavera. 1997. Gender expression in *Abies pinsapo* Boiss., a Mediterranean fir. *Annals of Botany* 79: 337 – 342.
- Augspurger, C.K. y K. Kitajima, K. 1992 Experimental studies of seedling recruitment from contrasting seed distributions. *Ecology* 73, 1270 – 1284.
- Aussenac, G. 2002. Ecology and ecophysiology of circum-Mediterranean firs in the context of climate change. *Annals of Forest Science* 59: 823 – 832.
- Avola, G., Cavallaro, V., Patané, C. y E. Riggi. 2008. Gas exchange and photosynthetic water use efficiency in response to light, CO<sub>2</sub> concentration and temperature in *Vicia faba*. *Journal of Plant Physiology* 165: 796 – 804.
- Balaguer, L., Martínez-Ferri, E., Valladares, F., Pérez-Corona, M.E., Baquedano, F.J, Castillo, F.J. y E. Manrique. 2001. Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology* 15: 124 – 135.
- Ballaré, C.L., Scopel, C.L. y R.A. Sánchez. 1990. Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* 247: 329 – 332.
- Barberó M., Loisel R., Quézel P., Richardson D.M. y F. Romane. 1998. Pines of the Mediterranean Basin. Páginas 153 – 170 en *Ecology and Biogeography of Pinus* (548 páginas). D.M. Richardson (ed.). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Barden, L.S. 1979. Tree replacement in small canopy gaps of a *Tsuga canadensis* forest in the southern Appalachians (Tennessee). *Oecologia* 44: 141 – 142.
- Barden, L.S. 1981. Forest development in canopy gaps of a diverse hardwood forest of the southern Appalachian Mountains. *Oikos* 37: 205 – 209.
- Bárdossy, A. y W. Lehmann. 1998. Spatial distribution of soil moisture in a small catchment. Part 1: geostatistical analysis. *Journal of Hydrology* 206: 1 – 15.
- Bascompte, J. y R.V. Solé. 1995. Rethinking complexity: modelling spatiotemporal dynamics in ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 361 – 366.
- Bascompte J. y R. Solé. 2005. Margalef y el espacio o porqué los ecosistemas no bailan sobre la punta de una aguja . *Ecosistemas*. 2005/1  
(URL: [http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=72&Id\\_Categoria=2&tipo=portada](http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=72&Id_Categoria=2&tipo=portada))
- Bassow, S.L., McConnaughay, K.D.M. y F.A. Bazzaz. 1994. The response of temperate tree seedlings grown in elevated CO<sub>2</sub> to extreme temperature events. *Ecological Applications* 4: 593 – 603.
- Bazzaz, F.A. 1990. The response of natural ecosystems to the rising global CO<sub>2</sub> levels. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 167 – 196.
- Bazzaz, F.A. y S.T.A. Pickett. 1980. Physiological ecology of tropical succession. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 287 – 310.
- Beadle, C.L., Ludlow, M.M. y J.L. Honeysett. 1993. Water relations. Páginas 113 - 128 en *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual* (464 páginas). Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordencamp, H.R., Leegood, R.C. y S.P. Long (Eds.) Chapman & Hall. Londres, Inglaterra, Reino Unido.

- Beckage, B. y J.S. Clark. 2003. Seedling survival and growth of three forest tree species: the role of spatial heterogeneity. *Ecology* 84 (7): 1849 – 1861.
- Begon, M., Harper, J.L. y C.R. Townsend. 1995. Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades (886 páginas). Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Behera, R.K., Misha, P.C. y N.K. Choudhury, N.K. 2002. High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* 159: 967 – 973.
- Beniston, M., Stephenson, D.B., Christensen, O.B., Ferro, C.A.T., Frei, C., Goyette, S., Halsnaes, K., Holt, T., Jylhä, K., Koffi, B., Palutikof, J., Schöll, R., Semmler, T. y K. Woth. 2007. Future extreme events in European climate: an exploration of regional climate model projections. *Climatic Change* 81: 71 – 95.
- Bennett, K.D., Tzedakis, P.C. y K.J. Willis. 1991. Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103 – 115.
- Berendse, F. y R. Aerts. 1987. Nitrogen-use efficiency: a biologically meaningful definition? *Functional Ecology* 1: 293 – 296.
- Berendse, F. y W.T. Elberse. 1990. Competition and nutrient availability in heathland and grassland ecosystems. Páginas 93 – 116 en *Perspectives on plant competition* (484 páginas). J.B. Grace y D. Tilman (Eds.) Academic Press Inc. San Diego, California, EE.UU.
- Berkowitz, A.R., Canham, C.D. y V.R. Kelly. 1995. Competition vs. facilitation of tree seedling growth and survival in early successional communities. *Ecology* 76: 1156 – 1168.
- Björkman, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. Páginas 57 – 107 en *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Volume 12A. Physiological Plant Ecology I. Responses to the physical environment* (625 páginas). Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. y H. Zeigler (Eds). Springer - Verlag. Berlín, Alemania.
- Björkman, O. y B. Demmig-Adams. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. Páginas 17 – 47 en *Ecophysiology of Photosynthesis* (574 páginas). Schulze, E.D. y M.M. Caldwell (Eds.). Springer-Verlag, Berlín, Alemania.
- Björkman, O. y S.B. Powles. 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light stress. *Planta* 161: 490 – 504.
- Blackman, G.E. 1942. Statistical and ecological studies in the distribution of species in plant communities. I. Dispersion as a facet in the study of changes in plant population. *Annals of Botany* 6 (2): 351 – 370.
- Blanca, G., Cabezudo, E., Hernández-Bermejo, J.E., Herrera, C.M., Molero Mesa, J., Muñoz, J. y B. Valdés. 1999. Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía (2 tomos). Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente. Sevilla, España.
- Blanco, E., Casado, M.A., Costa, M., Escribano, R., García, M., Génova, M., Gómez, A., Gómez, F., Moreno, J.C., Morla, C., Regato, P. y H. Sainz. 1997. Los bosques ibéricos (572 páginas). Ed. Planeta. Barcelona, España.
- Blanes, M.C. 2010. Alternativas de manejo de síntomas de saturación de nitrógeno en bosques de *Abies pinsapo* Boiss.: respuesta a la fertilización compensatoria con fósforo. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén.

- Blanes, M.C., Viñepla, B., Merino, J.A. y J. A. Carreira. 2013. Nutritional status of *Abies pinsapo* forests along a N deposition gradient. Do C/N/P stoichiometric shifts modify the photosynthetic nutrient-use efficiency? *Oecologia* 171(4): 797 – 808.
- Blondel, J. y J. Aronson. 1999. Biology and wildlife of the Mediterranean region (328 páginas). Oxford University Press. Nueva York, NY, EE.UU.
- Bogdan, J. y B. Zagdánska. 2006. Changes in the pool of soluble sugars induced by dehydration at the heterotrophic phase of growth of wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 787 – 794.
- Borcard, D., Legendre, P. y P. Drapeau. 1992. Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology* 73: 1045 – 1055.
- Boxman, A.W., van Dam, D., van Dijk, H.F., Hogervorst, R.F. y C.J. Koopmans. 1995. Ecosystem responses to reduced nitrogen and sulphur inputs into two coniferous forest stands in the Netherlands. *Forest Ecology and Management* 71: 7 – 29.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443 – 448.
- Brandani, A., Hartshorn, G. S. y G. H. Orians. 1988. Internal heterogeneity of gaps and species richness in Costa Rican tropical wet forest. *Journal of Tropical Ecology* 4: 99 – 119.
- Braumann, T. y L.H. Grimme. 1981. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 637 (1): 8 – 17.
- Brewer, S., Cheddadi, R., de Beaulieu, J.L. y M. Reille. 2002. The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* 156: 27 – 48.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y H. Pfander (Eds). 1994. Carotenoids Volume 1A: Isolation and analysis (328 páginas). Birkhäuser Verlag, AG Basel — Berlin — Boston. ISBN: 3-7643-2908-4.
- Broadmeadow, M. y H. Griffiths. 1993. Carbon isotope discrimination and the coupling of CO<sub>2</sub> fluxes within forest canopies. Páginas 109 – 130 en *Stable isotopes and plant carbon-water relations* (555 páginas). Ehleringer, J.R.; Hall. A.E. y G.D. Farquhar (Eds.). Academic Press Inc. San Diego, California, EE.UU.
- Brokaw, N.V.L. 1985. Treefalls, regrowth and community structure in tropical forest. Páginas 53 – 69 en *The ecology of natural disturbance and patch dynamics* (472 páginas). Pickett, S.T.A. y P.S. White (Eds.). Academic Press, Nueva York, NY, EE.UU.
- Brokaw, N.V.L. y S.M. Scheiner. 1989. Species composition in gaps and structure of a tropical forest. *Ecology* 70 (3): 538 – 541.
- Brooks, J.R., Flanagan, L.B. y J.R. Ehleringer. 1998. Responses of boreal conifers to climate fluctuations: indications from tree-ring widths and carbon isotope analyses. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 524 – 533.
- Büch, K., Stransky, H., Bigus, H.J. y A. Hager. 1994. Enhancement by artificial electron acceptors of thylakoid lumen acidification and zeaxanthin formation. *Journal of Plant Physiology* 144: 641 – 648.
- Busing, R.T. y P.S. White. 1997. Species diversity and small-scale disturbance in an old-growth temperate forest: a consideration of gap partitioning concepts. *Oikos* 78: 562 – 568.
- Cabezudo, B., Pérez-Latorre, A.V., Navas, P., Gil, Y. y D. Navas. 1998. Memoria del Parque Natural de la Sierra de las Nieves. Cartografía y Evaluación de la Flora y la Vegetación (367 páginas).

Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Málaga y Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

- von Caemmerer, S. y G.D. Farquhar. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153 (4): 376 – 387.
- Caldwell, M.M., Teramura, A.H., y M. Tevini. 1989. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends in Ecology & Evolution* 4: 363 – 367.
- Callaway, C.M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61: 306 – 349.
- Camarero, J.J., Gutiérrez, E., Fortin, M.J. y E. Ribbens. 2005. Spatial patterns of tree recruitment in a relict population of *Pinus uncinata*: forest expansion through stratified diffusion. *Journal of Biogeography* 32: 1979 – 1992.
- Canham, C.D. 1984. Canopy recruitment in shade tolerant trees: the response of *Acer saccharum* and *Fagus grandifolia* to canopy openings. Dissertation, Cornell University, Ithaca, Nueva York, EE.UU.
- Canham, C.D. 1988a. An index for understory light levels in and around canopy gaps. *Ecology* 69: 1634 – 1638.
- Canham, C.D. 1988b. Growth and canopy architecture of shade-tolerant trees: the response of *Acer saccharum* and *Fagus grandifolia* to canopy gaps. *Ecology* 69: 786 – 795.
- Canham, C.D., Denslow, J.S., Platt, W.J., Runkle, J.R., Spies, T.A. y P.S. White. 1990. Light regimes beneath closed canopies and tree-fall gaps in temperate and tropical forests. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 620 – 631.
- Canham, C.D., Finzi, A.C., Pacala, S.W. y D.H. Burbank. 1994. Causes and consequences of resource heterogeneity in forests: interspecific variation in light transmission by canopy trees. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 337 – 349.
- Canham, C.D., Berkowitz, A.R., Kelly, V.R., Lovett, G.M., Ollinger, S.V. y J. Schnurr. 1996. Biomass allocation and multiple resource limitation in tree seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 26: 1521 – 1530.
- Canham, C.D., Kobe, R.K., Latty, E.F. y R.L. Chazdon. 1999. Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival: effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. *Oecologia* 121: 1 – 11.
- Carpenter, S.R., Fisher, S.G., Grimm, N.B. y J.F. Kitchell. 1992. Global change and freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 119 – 139.
- Carreira, J.A., García-Ruiz, R., Liétor, J., Martín-García, J.M., y J.C. Linares. 2003. Relaciones suelo – planta en bosques de *Abies pinsapo* Boiss. Disponibilidad de nutrientes y estatus nutricional. *Acta Botanica Malacitana* 28: 89 – 104.
- Carreira J.A., López-Quintanilla J.B. y J.C. Linares. 2008. Conservation and management adaptation options for *in situ* preservation of endemic mountain conifer forests: the *Abies pinsapo* case in Andalusia (Spain). Páginas 61 - 80 en *Mediterranean Mountains in a Changing World: Guidelines for developing action plans*. P. Regato y R. Salman (Eds.). IUCN Center for Mediterranean Cooperation, ISBN : 978-2-8317-1058-7. Málaga, España.
- Carrión, J.S. 2003. Sobresaltos en el bosque mediterráneo: incidencia de las perturbaciones observables en una escala paleoecológica. *Ecosistemas* 2003-3. <http://www.aet.org/ecosistemas/033/revision1.htm>.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J.A. y J.M. Gómez. 2002. Use of shrubs as nurse plants: a new technique for reforestation in Mediterranean mountains. *Restoration Ecology* 10 (2): 297 – 305.

- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J.A. y J.M. Gómez. 2004. Seedling establishment of a boreal tree species (*Pinus sylvestris*) at its southernmost distribution limit: consequences of being in a marginal Mediterranean habitat. *Journal of Ecology* 92: 266 – 277.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J.A. y J.M. Gómez. 2005. Alleviation of summer drought boosts establishment success of *Pinus sylvestris* in a Mediterranean mountain: an experimental approach. *Plant Ecology* 181: 191 – 202.
- Catalina, M.A. 1994. Existencias de *Abies pinsapo* en Andalucía y aproximación a su estructura de masa. Páginas 59 – 78 en *Gestión y Conservación de los Pinsapares Andaluces*. Asociación Forestal Andaluza. Cádiz, España.
- Ceballos, L. 1938. Plan general para la restauración forestal de España. ICONA - Instituto para la Conservación de la Naturaleza. Madrid, España.
- Ceulemans, R., Janssens, I.A. y M.E. Jach. 1999. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on trees and forests: lessons to be learned in view of future ecosystem studies. *Annals of Botany* 84: 577 – 590.
- Chambel, M.R., Climent, J., Alía, R. y F. Valladares. 2005. Phenotypic plasticity: a useful framework for understanding adaptation in forest species. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 14 (3): 334 – 344.
- Chameides, W.L., Kasibhatla, P.S., Yienger, J. y H. Levy. 1994. Growth of continental-scale metro-agroplexes, regional ozone pollution, and world food production. *Science* 264: 74 – 77.
- Chapin, F.S., Schulze, E. y H.A. Mooney. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 423 – 447.
- Chaves, M.M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1 – 16.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. y J.S. Pereira. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239 – 264.
- Chazdon, R.L. y N. Fetcher. 1984. Photosynthetic light environments in a lowland tropical rainforest in Costa Rica. *Journal of Ecology* 72: 553 – 564.
- Chazdon, R. L. y R.W. Pearcy. 1991. The importance of sunflecks for forest understory plants. *BioScience* 41(11): 760 – 766.
- Cheddadi, R., Guiot, J. y D. Jolly. 2001. The Mediterranean vegetation: what if the atmospheric CO<sub>2</sub> increased? *Landscape Ecology* 16: 667 – 675.
- Choudhury, N.K., Choe, H.T. y R.C. Huffaker. 1993. Ascorbate induced zeaxanthin formation in wheat leaves and photoprotection of pigment and photochemical activities during aging of chloroplasts in light. *Journal of Plant Physiology* 141 (5): 551 – 556.
- Claveau, Y., Messier, C., Comeau, P.G. y K.D. Coates. 2002. Growth and crown morphological responses of boreal conifer seedlings and saplings with contrasting shade tolerance to a gradient of light and height. *Canadian Journal of Forest Research* 32: 458 – 468.
- Climent, J.M., Aranda, I., Alonso, J., Pardos, J.A. y L. Gil. 2006. Developmental constraints limit the response of Canary Islands pine seedlings to combined shade and drought. *Forest Ecology and Management* 231: 164 – 168.
- Coates, K.D. 2000. Conifer seedling response to northern temperate forest gaps. *Forest Ecology and Management* 127: 249 – 269.

- Coates, K.D. y P.J. Burton. 1997. A gap-based approach for development of silvicultural systems to address ecosystem management objectives. *Forest Ecology and Management* 99: 337 – 354.
- Cobos, J.M. 1994. Estado fitosanitario de los pinsapares andaluces. Páginas 35 – 41 en *Gestión y Conservación de los Pinsapares Andaluces*. Asociación Forestal Andaluza. Cádiz, España.
- Comstock, J. y J.R. Ehleringer. 1992. Correlating genetic variation in carbon isotopic composition with complex climatic gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 7747 – 7751.
- Conesa i Mor, J.A. 1997. Els boscos aciculifolis i les comunitats arbístives que s'hi relacionen. Páginas 202 – 206 en *Tipologia de la vegetació: anàlisi i caracterització* (407 pàgines). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Lérida. Lérida, España.
- Conrad, K., Perry, J.N., Woiwod, I.P. y C.J. Alexander. 2006. Large-scale temporal changes in spatial pattern during declines of abundance and occupancy in a common moth. *Journal of Insect Conservation* 10: 53 – 64.
- Cook, R.E. 1979. Patterns of juvenile mortality and recruitment in plants. Páginas 207 – 231 en *Topics in plant population biology* (589 pàgines). Solbrig, O.T., Jain, S., Johnson, G.B., y P.H. Raven (Eds.). Columbia University Press. Nueva York, NY, EE.UU.
- Cornic, G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187 – 188.
- Correia, M.J., Osório, M.L., Osório, J., Barrote, I., Martins, M. y M.M. David. 2006. Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environmental and Experimental Botany* 58: 75 – 84.
- Cotrufo, M.F., Briones, M.J. y P. Ineson. 1998. Elevated CO<sub>2</sub> affects field decomposition rate and palatability of tree leaf litter: importance of changes in substrate quality. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1565 – 1571.
- Cowan, I. R. 1977. Stomatal behaviour and the environment. *Advances in Botanical Research* 4, 117 – 227.
- Cowan, I. R. 1986. Economics of carbon fixation in higher plants. Páginas 133 – 170 en *On the Economy of Plant Form and Function* (717 pàgines). T. J. Givnish (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Craig, H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 12: 133 – 149.
- Cronan, C.S. y D.F. Grigal. 1995. Use of calcium/aluminum ratios as indicators of stress in forest ecosystems. *Journal of Environmental Quality* 24: 209 – 226.
- Crowley, T.J. y G.R. North. 1988. Abrupt climate change and extinction events in Earth history. *Science* 240: 996 – 1002.
- Crutzen, P.J. y M.O. Andreae. 1990. Biomass burning in the tropics: Impact on atmospheric chemistry and biogeochemical cycles. *Science* 250: 1669 – 1678.
- Crutzen, P.J. y D.H. Ehhalt. 1977. Effects of nitrogen fertilizers and combustion on the stratospheric ozone layer. *Ambio* 6: 112 – 117.
- Curtis, P.S. y X. Wang. 1998. A meta-analysis of elevated CO<sub>2</sub> effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113: 299 – 313.

- Dale, V.H. 1997. The relationship between land-use change and climate change. *Ecological Applications* 7: 753 – 769.
- Delagrangé, S., Messier, C., Lechowicz, M.J. y P. Dizengremel. 2004. Physiological, morphological and allocational plasticity in understory deciduous trees: importance of plant size and light availability. *Tree Physiology* 24: 775 – 784.
- DeLucia, E.H., Hamilton, J.G., Naidu, S.L., Thomas, R.B., Andrews, J.A., Finzi, A., Lavine, M., Matamala, R., Mohan, J.E., Hendrey, G.R. y W.H. Schlesinger. 1999. Net primary production of a forest ecosystem with experimental CO<sub>2</sub> enrichment. *Science* 284: 1177 – 1179.
- De Martonne, E. 1926. L'indice d'aridité. *Bulletin de l'Association des Géographes Français* 9: 3 – 5.
- Demmig-Adams, B. 1998. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant Cell Physiology* 39: 474 – 482.
- Demmig-Adams, B. y W.W. Adams, III. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599 – 626.
- Demmig-Adams, B. y W.W. Adams, III. 1994. Capacity for energy dissipation in the pigment bed in leaves with different xanthophylls cycle pools. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 575 – 588.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Logan, B.A. y A.S. Verhoeven. 1995. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible PSII efficiency in plants acclimated to light stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 249 – 260.
- Denslow, J.S. 1980a. Gap partitioning among tropical rainforest trees. *Biotropica* 12: 47 – 55.
- Denslow, J.S. 1980b. Patterns of plant species diversity during succession under different disturbance regimes. *Oecologia* 46: 18 – 21.
- Denslow, J. S. 1987. Tropical rainforest gaps and tree species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 431 – 451.
- Denslow, J.S., Schultz, J.C., Vitousek, P.M. y B.R. Strain. 1990. Growth responses of tropical shrubs to treefall gap environments. *Ecology* 71: 165 – 179.
- Duarte, C.M. (coord), Alonso, S., Benito, G., Dachs J., Montes, C., Pardo, M., Ríos, F., de la Aurora, A., Simó, R. y F. Valladares. 2006. Cambio global: Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra (251 páginas). CSIC - Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid, España.
- Dunn, J.L., Turnbull, J.D. y S.A. Robinson. 2004. Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of higher plants. *Functional Plant Biology* 31: 195 – 202.
- Dunne J.A. y V.T. Parker. 1999. Species-mediated soil moisture availability and patchy establishment of *Pseudotsuga menziesii* in chaparral. *Oecologia* 119: 36 – 45.
- Eamus, D. y P.G. Jarvis. 1989. The direct effects of increase in the global atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on natural and commercial temperate trees and forests. *Advances in Ecological Research* 19: 1 – 55.
- Ehleringer, J.R. 1993. Gas exchange implications of isotopic variation in arid-land plants. Páginas 265 - 284 en *Water deficits: plant responses from cell to community* (346 páginas). Smith, J.A.C. y H. Griffiths (Eds.). Bios Scientific Publishers. Oxford, Inglaterra, Reino Unido.
- Ehleringer, J.R. y K.T. Hubick. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology* 40: 503 – 537.

- Elmqvist, T., Folke, C., Nyström, M., Peterson, G., Bengtsson, J., Walker, B. y J. Norberg. 2003. Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Frontiers in Ecology and Environment* 1(9): 488 – 494.
- Emborg, J. 1998. Understorey light conditions and regeneration with respect to the structural dynamics of a near-natural temperate deciduous forest in Denmark. *Forest Ecology and Management* 106: 83 – 95.
- Emmett, B.A., Brittain, S.A., Hughes, S., Gorres, J., Kennedy, V., Norris, D., Rafarel, R., Reynolds, B. y P.A. Stevens. 1995. Nitrogen additions (NaNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) at Aber forest, Wales: I. Response of throughfall and soil water chemistry. *Forest Ecology and Management* 71: 45 – 59.
- Endler, J.A. 1993. The color of light in forests and its implications. *Ecological Monographs* 61: 1 – 27.
- Eskins, K., Duysen, M.E. y L. Olson. 1983. Pigment analysis of chloroplast pigment-protein complexes in wheat. *Plant Physiology* 71 (4): 777 – 779.
- Ettema, C.H., Coleman, D.C., Vellidis, G., Lowrance, R. y S.L. Rathbun. 1998. Spatiotemporal distributions of bacterivorous nematodes and soil resources in a restored riparian wetland. *Ecology* 79: 2721 – 2734.
- Evans, J.R. 1988. Acclimation by the thylakoid membranes to growth irradiance and the partitioning of nitrogen between soluble and thylakoid proteins. *Australian Journal of Plant Physiology* 15: 93 – 106.
- Facelli, J.M. 1994. Multiple indirect effects of plant litter affect the establishment of woody seedlings in old fields. *Ecology* 75: 1727 – 1735.
- Fahrig, L. y J. Paloheimo. 1988. Effect of spatial arrangement of habitat patches on local population size. *Ecology* 69: 468 – 475.
- Farina, A. 2006. Principles and methods in landscape ecology. Towards a science of landscape (412 páginas). Ed. Springer - Países Bajos.
- Farjon, A. y K.D. Rushforth. 1989. A classification of *Abies* Miller (*Pinaceae*). *Notes of the Royal Botanic Garden of Edinburgh* 46: 59 – 79.
- Farquhar, G.D., O'Leary, M.H. y A. Berry. 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., Ehleringer, J.R. y K.T. Hubick. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology* 40: 503 – 537.
- Fenner, M. 1985. Seed ecology (150 páginas). Ed. Chapman and Hall. Londres, Inglaterra, Reino Unido.
- Ferrio, J.P., Voltas, J. y J.L. Araus. 2003. Use of carbon isotope composition in monitoring environmental changes. *Management of Environmental Quality* 14: 82 – 98.
- Field, C.B. Leaf-age effects on stomatal conductance. 1987. Páginas 367 – 384 en *Stomatal Function* (520 páginas). Zeiger, E., Farquhar, G.D. e I.R. Cowan (Eds.). Stanford University Press. California, EE.UU.
- Fischer C. y W. Höll. 1991. Food reserves of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) I. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. *Trees* 5: 187 – 195.
- Fischer C. y W. Höll. 1992. Food reserves of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fat reserves in pine wood. *Trees* 6: 147 – 155.

- Flenley, J.R. 1998. Tropical forests under the climates of the last 30,000 years. *Climatic Change* 39: 177 – 197.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. y T.D. Sharkey. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* 6: 269 – 279.
- Flexas, J., Bota, J., Galmés, J., Medrano, H. y M. Ribas-Carbó. 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127: 343 – 352.
- Forman, R.T.T. 1995. Land mosaics. The ecology of landscapes and regions (632 páginas). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Fort, C., Fauveau, M.L., Muller, F., Label, P., Granier, A. y E. Dreyer. 1997. Stomatal conductance, growth and root signaling in young oak seedlings subjected to partial soil drying. *Tree Physiology* 17: 281 – 289.
- Fownes, J.H. 1995. Effects of diversity on productivity: quantitative distributions of traits. Páginas 177-186 en *Islands: Biological Diversity and Ecosystem Function* (238 páginas). Vitousek, P.M., Loope, L.L. y H. Adersen (Eds.). Springer, Nueva York, EE.UU.
- Fownes, J.H. y R.A. Harrington. 2004. Seedling response to gaps: separating effects of light and nitrogen. *Forest Ecology and Management* 203: 297 – 310.
- Frank, D.A. y S.J. McNaughton. 1991. Stability increases with diversity in plant communities: empirical evidence from the 1988 Yellowstone drought. *Oikos* 62: 360 – 362.
- Freeden, A.L., Gamon, J.A. y C.B. Field. 1991. Responses of photosynthesis and carbohydrate-partitioning to limitations in nitrogen and water availability in field-grown sunflower. *Plant, Cell & Environment* 14: 963 – 970.
- Gallardo, A., Paramá, R. y F. Covelo. 2005. Soil ammonium vs. nitrate spatial pattern in six plant communities: simulated effect on plant populations. *Plant and Soil* 277: 207 – 219.
- Gamon, J.A., Field, C.B., Freedden, A.L. y S. Thayer. 2001. Assessing photosynthetic downregulation in sunflower stands with an optically-based model. *Photosynthesis Research* 67: 113 – 125.
- García, D., Zamora, R., Hódar, J.A., Gómez, J.M. y J. Castro. 2000. Yew (*Taxus baccata* L.) regeneration is facilitated by fleshy-fruited shrubs in Mediterranean environments. *Biological Conservation* 95:31 – 38.
- Gaston, K.J. 2003. The structure and dynamics of geographic ranges (266 páginas). Oxford University Press. Oxford, Inglaterra, Reino Unido.
- Gause, G.F. 1934. The struggle for existence (163 páginas). Ed. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland, EE.UU.
- Génova-Fuster, M. 2007. El crecimiento de *Abies pinsapo* y el clima de Grazalema: aportaciones dendroecológicas. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 16(2): 145 – 157.
- George, L.O. y F.A. Bazzaz. 1999a. The fern understory as an ecological filter: emergence and establishment of canopy-tree seedlings. *Ecology* 80: 833 – 845.
- George, L.O. y F.A. Bazzaz. 1999b. The fern understory as an ecological filter: growth and survival of canopy-tree seedlings. *Ecology* 80: 846 – 856.

- Gilmore, A.M. y H.Y. Yamamoto. 1991. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column. *Journal of Chromatography* 543: 137 – 145.
- Gilpin, M.E. 1987. Spatial structure and population vulnerability. Páginas 125 – 139 en *Viable populations for conservation* (189 páginas). M. Soulé (Ed.). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Gindaba, J., Rozanov, A. y L. Negash. 2004. Response of seedlings of two *Eucalyptus* and three deciduous tree species from Ethiopia to severe water stress. *Forest Ecology and Management* 201: 119 – 129.
- Giordano, M., Beardall, J. y J.A. Raven. 2005. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology* 56: 99 – 131.
- Giorgi, F. 2006. Climate change hot-spots. *Geophysical Research Letters* 33 (8): L08707, doi:10.1029/2006GL025734.
- Giorgi, F., Bi, X., y J., Pal, J. 2004. Mean, interannual variability and trends in a regional climate change experiment over Europe. II: climate change scenarios (2071-2100). *Climate Dynamics* 23: 839 – 858.
- Givnish, T.J. 1988. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Functional Plant Biology* 15: 63 – 92.
- Glerum, C. y J.J. Balatinecz. 1980. Formation and distribution of food reserves during autumn and their subsequent utilization in jack pine. *Canadian Journal of Botany* 58: 40 – 54.
- Goldschmidt, E.E. y S.C. Huber. 1992. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* 99, 1443 – 1448.
- Gómez-Aparicio, L., Valladares, F., Zamora, R. y J.L. Quero. 2005. Response of tree seedlings to the abiotic heterogeneity generated by nurse shrubs: an experimental approach at different scales. *Ecography* 28: 757 – 768.
- Goudriaan, J. 1982. Potential production processes. Páginas 98 – 113 en *Simulation of Plant Growth and Crop Production* (320 páginas). Penning de Vries, F.W.T. y H.H. Van Laar (Eds). PUDOC, Wageningen, Países Bajos.
- Gracia, C., Sabaté, S. y A. Sánchez. 2002. El cambio climático y la reducción de la reserva de agua en el bosque mediterráneo. *Ecosistemas* 2002/2 (URL:<http://www.aeet.org/ecosistemas/022/investigacion4.htm>)
- Gray, A.N. y T.A. Spies. 1997. Microsite controls on tree seedling establishment in conifer forest canopy gaps. *Journal of Ecology* 84: 635 – 645.
- Gray, A.N., Spies, T.A. y M.J. Easter. 2002. Microclimatic and soil responses to gap formation in coastal Douglas-fir forests. *Canadian Journal on Forest Research* 32: 332 – 343.
- Grubb, P.J. 1977. The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biological Review* 52: 107 – 145.
- Gruszecki, W.I., Kernen, P., Krupa, Z. y R.J. Strasser. 1994. Involvement of xanthophyll pigments in regulation of light-driven excitation quenching in light-harvesting complex of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1188 (3): 235 – 242

- Guak, S., Olszyk, D.M., Fuchigami, L.H. y D.T. Tingey. 1998. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on cold hardiness and spring bud burst and growth in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Tree Physiology* 18: 671 – 679.
- Hampe, A. y J.R. Petit. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461 – 467.
- Hansen, A.J. y J.J. Rotella. 1999. Environmental gradients and biodiversity. Páginas 161-209 en *Wildlife, Forests, And Forestry: Principles Of Managing Forests For Biological Diversity* (370 páginas). M. Hunter (Ed.). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Hansen, A.J., Neilson, R.P., Dale, V.H., Flather, C.H., Iverson, L.R., Currie, D.J., Shafer, S., Cook, R. y P.J. Bartlein. 2001. Global change in forests: responses of species, communities and biomes. *BioScience* 51: 765 – 779.
- Harmon, M.E. y J.F. Franklin. 1989. Tree seedlings on logs in *Picea-Tsuga* forests of Oregon and Washington. *Ecology* 70: 48 – 59.
- Harper, J.L. 1977. Population biology of plants (900 páginas). Academic Press. Londres, Inglaterra, Reino Unido.
- Harper, J.L., Williams, J.T., y G.R. Sagar. 1965. The behavior of seeds in soil. I. The heterogeneity of soil surfaces and its role in determining the establishment of plants from seed. *Journal of Ecology* 53: 273 – 286.
- Hegazi, M.M., Pérez-Ruzafa, A., Almela, L. y M.E. Candela. 1998. Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 829 (1-2): 153 – 159.
- Hita, J.A. 1997. Comportamiento de *Abies pinsapo* Boiss., a partir de repoblación, en el Parque Natural de la Sierra de Huétor (Granada, España). *Ars Pharmaceutica* 38: 375 – 383.
- Hoch, G. 2007. Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology* 21: 823 – 834.
- Höch, G., Popp, M. y C. Körner. 2002. Altitudinal increase of mobile carbon pools in *Pinus cembra* suggests sink limitation of growth at the Swiss treeline. *Oikos* 98: 361 – 374.
- Hoch, G., Richter, A. y Ch. Körner. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell & Environment* 26: 1067 – 1081.
- Hoekstra, F.A., Crowe, J.H. y L.M. Crowe. 1991. Effect of sucrose on phase behavior of membranes in intact pollen of *Typha latifolia* L., as measured with Fourier transform infrared spectroscopy. *Plant Physiology* 97: 1073 – 1079.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. y J. Buitink. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431 – 438.
- Holmes, M.G. y H. Smith. 1977. The function of phytochrome in the natural environment II. The influence of vegetation canopies on the spectral energy distribution of natural daylight. *Photochemistry and Photobiology* 25: 539 – 545.
- Holmgren, M. 2000. Combined effects of shade and drought on tulip poplar seedlings: trade-off in tolerance or facilitation? *Oikos* 90: 67 – 78.

- Hosmer, D.W. y S. Lemeshow. 1989. Applied logistic regression (373 páginas) Ed. John Wiley and Sons. Nueva York, NY, EE.UU.
- Huenneke, L.F., Hamburg, S.P., Koide, R., Mooney, H.A. y P.M. Vitousek. 1990. Effects of soil resources on plant invasion and community structure in Californian serpentine grassland. *Ecology* 71: 478 – 491.
- Huntley, B. y H.J.B. Birkes. 1989. An atlas of past and present pollen maps for Europe, 0-13 000 years ago (150 páginas). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Iverson, L.R., Prasad, A.M., Hale, B.J. y E.K. Sutherland. 1999. An atlas of current and potential future distributions of common trees of the eastern United States (245 páginas). USDA Forest Service, Northeastern Research Station. General Technical Report NE-265. Delaware, Ohio, EE.UU.
- IPCC. 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 páginas.
- IUCN. 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. (Consulta: 23 de noviembre de 2011).
- Jacoby, G.C. y R.D. D'Arrigo. 1997. Tree rings, carbon dioxide, and climatic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 8350 – 8353.
- Jalas, J., Suominen, J. y R. Lampinen. 1999. Atlas Florae Europaeae. Available at <http://www.fmnh.helsinki.fi/english/botany/afe/index.htm/>
- Jones, H.G. 1992. Plants and microclimates: a quantitative approach to environmental plant physiology. (425 páginas) Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Jump, A.S. y J. Peñuelas. 2005. Running to stand still: adaptation and the response to of plants to rapid climate change. *Ecology Letters* 8: 1010 – 1020.
- Kasperbauer, M.J. 1971. Spectral distribution of light in a tobacco canopy and effects of end-of-day light on growth and development. *Plant Physiology* 47:775 – 778.
- Knapp, A.K. y W.K. Smith. 1990. Stomatal and photosynthetic responses to variable sunlight. *Physiologia Plantarum* 78: 160 – 165.
- Knoll, A.H. 2004. Life on a young planet: the first three billion years of evolution on Earth (296 páginas). Princeton University Press. Princeton, Nueva Jersey, EE.UU.
- Kobe, R.K. 1997. Carbohydrate allocation to storage as a basis of interspecific variation in sapling survivorship and growth. *Oikos* 80: 226 – 233.
- Kobe, R.K. 1999. Light gradient partitioning among tropical tree species through differential seedling mortality and growth. *Ecology* 80: 187 – 201.
- Koch, K. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509 – 540.
- Kohen, E., Santus, R. y J. Hirschberg. 1995. Photobiology (506 páginas). Academic Press Inc. Londres, Inglaterra, Reino Unido.
- Konnert, M. y F. Bergmann. 1995. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution* 196: 19 – 30.

- Korhonen, K., Capretti, P., Karjalainen, R. y J. Stenlid. 1998. Distribution of *Heterobasidion annosum* intersterility groups in Europe. Páginas 93 – 104 en *Heterobasidion annosum: biology, ecology, impact and control* (589 páginas). Woodward, S., Stenlid, S., Karjalainen, R. y A. Hüttermann (Eds). Wallingford, Oxon, UK. CAB International.
- Korstian, C.F. y T.S. Coile. 1938. Plant competition in forest stands. *Duke University School of Forestry Bulletin*, 3. Durham, Carolina del Norte, EE.UU.
- Körner, Ch. 2003. Carbon limitation in trees. *Journal of Applied Ecology* 91: 4 – 17.
- Körner, Ch., Sarris, D. y D. Christodoulakis. 2005. Long-term increase in climatic dryness in the East-Mediterranean as evidenced for the island of Samos. *Regional Environmental Change* 5: 27 – 36.
- Kozlowski T.T. 1968. Water Deficits and Plant Growth, volúmenes. I (Development, Control, and Measurement, 394 páginas) y II Plant Water Consumption and Response, 336 páginas). Academic Press Inc. Nueva York, NY, EE.UU.
- Kozlowski, T.T. 1992. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. *Botanical Review* 58: 107 – 222.
- Kozlowski, T.T. y S.G. Pallardy. 1997. Growth control in woody plants (641 páginas). Academic Press Inc. San Diego, California, EE.UU.
- Kramer, P.J. y J.S. Boyer. 1995. Water relations of plants and soils (495 páginas). Academic Press Inc. San Diego, California, EE.UU.
- Kramer, P.J. y T. T. Kozlowski. 1979. Physiology of woody plants (811 páginas). Academic Press Inc. San Diego, California, EE.UU.
- Lambers, H., Chapin III, F.S. y T.L. Pons. 1998. Plant physiological ecology (540 páginas). Springer-Verlag New York Inc. Nueva York, NY, EE.UU.
- Landolt, W. e I. Pfenninger. 1997. The effect of elevated CO<sub>2</sub> and soil type on non-structural carbohydrates in beech leaves and Norway spruce needles growing in model ecosystems. *Acta Oecologica* 18: 351 – 359.
- Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups (513 páginas). Springer - Verlag. Berlín, Alemania.
- Lawlor, D.M. 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89: 871 – 885.
- Lawlor, D.W. y G. Cornic, 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* 25: 275 – 294.
- Leaky, R.R.B. y K.A. Longman. 1986. Physiological, environmental and genetic variation in apical dominance as determined by decapitation in *Triplochiton scleroxylon*. *Tree Physiology* 1: 193 – 207.
- Lee, R. 1978. Forest microclimatology (276 páginas). Columbia University Press. Nueva York, NY, EE.UU.
- Legendre, P. y L. Legendre. 1998. Numerical Ecology, 2ª edición (853 páginas). Ed. Elsevier Science. Ámsterdam, Holanda.
- Le Houérou, H.N. 1996. Climate change, drought and desertification. *Journal of Arid Environments* 34: 133 – 186.

- Lei, T.T. y M.J. Lechowicz. 1998. Diverse response of maple saplings to forest light regimes. *Annals of Botany* 82: 9 – 19.
- LeRoux, X., Lacoite, A., Escobar-Gutiérrez, A. y S. Le Dizès. 2001. Carbon-based models of individual tree growth: a critical appraisal. *Annals of Forest Science* 58: 469 – 506.
- Lichtenthaler, H.K. y F. Babani. 2004. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. Páginas 713 – 736 en *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis* (820 páginas) Papageorgiou G.C. y Govindjee (Eds.). Springer, Dordrecht, Países Bajos.
- Lichtenthaler, H.K. y A. Wellburn. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591 – 592.
- Liétor, J. 2002. Patrones de disponibilidad y limitación por nutrientes como indicadores de estado en masas de pinsapar (*Abies pinsapo* Boiss.). Tesis Doctoral, Universidad de Jaén.
- Liétor, J. y J.A. Carreira. 2001. Estructura y relaciones alométricas en pinsapares de la provincia de Málaga (España). Páginas 391 - 399 en *Valoración y Gestión de Espacios Naturales: Libro de Actas de las XVII Jornadas de Fitosociología*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Jaén. ISBN: 84-8439-076-4. Jaén, España.
- Linares, J.C. 2004. Efectos del clima y el manejo sobre la dinámica del pinsapar de Yunquera (Málaga) en la última década. Trabajo Tutelado de Iniciación a la Investigación, Universidad de Jaén.
- Linares, J.C. 2008. Efectos del cambio global sobre la dinámica poblacional y la ecofisiología de bosques relictos de *Abies pinsapo* Boiss. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén.
- Linares, J.C. y J.A. Carreira. 2006. El pinsapo, abeto endémico andaluz. O, ¿qué hace un tipo como tú en un sitio como éste? *Ecosistemas* 15 (3): 171 – 191.
- Linares J.C. y J.A. Carreira. 2009. Temperate-like stand dynamics in relict Mediterranean-fir (*Abies pinsapo* Boiss.) forests from Southern Spain. *Annals of Forest Science* 66: 610 – 620.
- Linares, J.C., Camarero, J.J. y J.A. Carreira. 2009. Interacting effects of climate and forest-cover changes on mortality and growth of the southernmost European fir forests. *Global Ecology and Biogeography* 18: 485 – 497.
- Linares, J.C., Camarero, J.J., Bowker, M.A., Ochoa, V. y J.A. Carreira. 2010a. Stand-structural effects on *Heterobasidion abietinum*-related mortality following drought events in *Abies pinsapo*. *Oecologia* 164: 1107 – 1119.
- Linares, J.C., Camarero, J.J. y J.A. Carreira. 2010b. Competition modulates the adaptation capacity of forests to climatic stress: insights from recent growth decline and death in relict stands of the Mediterranean fir *Abies pinsapo*. *Journal of Ecology* 98: 592 – 603.
- Linares, J.C., Carreira, J.A. y V. Ochoa. 2011. Human impacts drive forest structure and diversity. Insights from Mediterranean mountain forests dominated by *Abies pinsapo*. *European Journal of Forest* 130: 533 – 542.
- Linares, J.C., Covelo, F., Carreira, J.A. y J.A. Merino. 2012. Phenological and water-use patterns underlying maximum growing season length at the highest elevations: implications under climate change. *Tree Physiology* 32(2): 161 – 170.
- Liu, T.S. 1971. A monograph of the genus *Abies*. Publication of the Department of Forestry, College of Agriculture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

- Loehle, C. 1998. Height growth rate tradeoffs determine northern and southern range limits for trees. *Journal of Biogeography* 25: 735 – 742.
- Loehle, C. y D. LeBlanc. 1996. Model-based assessments of climate change effects on forests: a critical review. *Ecological Modelling* 90: 1 – 31.
- Logan, J.A. 1985. Tropospheric ozone: seasonal behavior, trends and anthropogenic influence. *Journal of Geophysical Research* 90 (6): 10463 – 10482.
- Long, S.P., Osborne, C.P. y S.W. Humphries. 1996. Photosynthesis, rising atmospheric carbon dioxide concentration and climate change. Páginas 121 – 159 en *Global Change: Effects on Coniferous Forests and Grasslands* (SCOPE Report) (484 páginas). Breymeyer, A.I., Hall, D.O., Melillo, J.M. y G.I. Ågren. John Wiley and Sons. Nueva York, NY, EE.UU.
- López, G. y J. Amaral. 1986. XXVIII. *Pinaceae*, XXIX. *Cupressaceae*, XXX. *Taxaceae*. Páginas 163 – 190 en *Flora Ibérica vol. I*. (577 páginas). Castroviejo, S. (Ed.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.
- Lorimer, C.G., Chapman, J.W. y W.D. Lambert. 1994. Tall understory vegetation as a factor in the poor development of oak seedlings beneath mature stands. *Journal of Ecology* 82: 227 – 237.
- Lortie, C.J. y L.W. Aarssen. 1996. The specialization hypothesis for phenotypic plasticity in plants. *International Journal of Plant Sciences* 157: 484 – 487.
- Maestre, F.T., y J. Cortina. 2002. Spatial patterns of surface soil properties and vegetation in a Mediterranean semi-arid steppe. *Plant and Soil* 241: 279 – 291.
- Maestre, F.T., Cortina, J., Bautista, S., Bellot, J. y R. Vallejo. 2003. Small-scale environmental heterogeneity and spatiotemporal dynamics of seedling establishment in a semiarid degraded ecosystem. *Ecosystems* 6: 630 – 643.
- Markesteijn, L. y L. Poorter. 2009. Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *Journal of Ecology* 97: 311 – 325.
- Masojídek, J., Trivedi, S., Halshaw, L., Alexiou, A. y D.O. Hall. 1991. The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. *Plant Physiology* 96: 198 – 207.
- Matson, P.A., Vitousek, P.M., Ewel, J.J., Mazzarino, M.J. y G.P. Robertson. 1987. Nitrogen transformations following tropical forest felling and burning on a volcanic soil. *Ecology* 68(3): 491 – 502.
- McNulty, S.G. y J.D. Aber. 1993. Effects of chronic nitrogen additions on nitrogen cycling in a high-elevation spruce-fir stand. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 1252 – 1263.
- Meyen S.V. 1987. *Fundamentals of Palaeobotany* (600 páginas). Chapman and Hall, Londres, Inglaterra, Reino Unido.
- Michener, W.K., Blood, E.R., Bildstein, K.L., Brinson, M.M. y L.R. Gardner. 1997. Climate change, hurricanes and tropical storms, and rising sea level in coastal wetlands. *Ecological Applications* 7: 770 – 801.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y D. Hornero-Méndez. 1993. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika and oleoresin by reversed-phase HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (10): 1616 – 1620.
- Mohren, G.M.J., Kramer, K., y S. Sabaté, S. 1997. Impacts of global change on tree physiology and forest ecosystems. (Actas de la *International Conference on Impacts of Global Change on Tree*

- Physiology and Forest Ecosystems*, celebrada en Wageningen (Países Bajos), entre el 26 y el 29 de noviembre de 1996, 372 páginas). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Países Bajos.
- Mooney, H.A. 1972. The carbon balance of plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 3: 315 – 346.
- Mooney H.A. 1983. Carbon-gaining capacity and allocation patterns of Mediterranean climate plants. Páginas 103 – 119 en *Mediterranean Type Ecosystems: The Role of Nutrients* (552 páginas). Kruger F.J., Mitchel D.T. y J.U.M. Jarvis (Eds.). Springer. Nueva York, NY, EE.UU.
- Mooney, H.A., Field, C., Vazquez-Yanes, C. y C. Chu. 1983. Environmental controls on stomatal conductance in a shrub of the humid tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 1295 – 1297.
- Morgan, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 35: 299 - 319.
- Mueller-Starck, G. 1989. Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L. Páginas 127 – 142 en *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations* (201 páginas). Scholz, F., Gregorius, H.R. y D. Rudin (Eds.). Springer, Berlín (Alemania).
- Myers, J.A. y K. Kitajima. 2007. Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest. *Journal of Ecology* 95 (2): 383 – 395.
- Nagelkerke, N.J.D. 1991. A note on general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 78: 691 – 692.
- Naidu, S.L. y E.H. DeLucia. 1997. Acclimation of shade-developed leaves on saplings exposed to late-season canopy gaps. *Tree Physiology* 17: 367 – 376.
- National Research Council. 1993. The role of terrestrial ecosystems in global change (50 páginas). National Academic Press. Washington D.C, EE.UU.
- Neftel, A., Oeschger, H., Staffelbach, T. y B. Stauffer. 1988. CO<sub>2</sub> record in the Byrd ice core 50,000 – 5,000 years BP. *Nature* 331: 609 – 611.
- Niinemets, Ü. 1995. Distribution of foliar carbon and nitrogen across the canopy of *Fagus sylvatica*: adaptation to a vertical light gradient. *Acta Oecologica* 16: 525 – 541.
- Niinemets, Ü. 1997. Role of foliar nitrogen in light harvesting and shade-tolerance of four temperate deciduous woody species. *Functional Ecology* 11: 518 – 531.
- Niinemets, Ü. 1998. Growth of young trees of *Acer platanoides* and *Quercus robur* along a gap-understory continuum: interrelationships between allometry, biomass partitioning, nitrogen and shade tolerance. *International Journal of Plant Sciences* 159: 318 – 330.
- Niinemets, Ü. y J.D. Tenhunen. 1997. A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant, Cell & Environment* 20: 845 – 866.
- Niinemets, Ü. y F. Valladares. 2004. Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: optimality and constraints. *Plant Biology* 6: 254 – 268.
- Nilsen, E.T. y D.M. Orcutt. 1996. The physiology of plants under stress. Abiotic factors (704 páginas). John Wiley and Sons. Estados Unidos.
- Nobel, P.S. 1983. Biophysical Plant Physiology and Ecology (608 páginas). W.H. Freeman & Co. San

- Francisco, California, EE.UU
- Noguchi, K., Nakajima, N. e I. Terashima. 2001. Acclimation of leaf respiratory properties in *Alocasia odora* following reciprocal transfers of plants between high- and low-light environments. *Plant, Cell & Environment* 24: 831 – 839.
- Norby, R. J., Gunderson, C.A., Wullschleger, S.D., O'Neill, E.G. y M.K. McCracken. 1992. Productivity and compensatory responses of yellow-poplar trees in elevated CO<sub>2</sub>. *Nature* 357: 322 – 324.
- Ögren, E. y G. Öquist. 1985. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta* 166: 380 – 388.
- O'Leary, M. 1995. Environmental effects on carbon fractionation in terrestrial plants. Páginas 78 – 91 en *Stable isotopes in the biosphere* (200 páginas). Wada, E., Yoneyama, T., Minigawa, M., Ando, T. y B.D. Fry (Eds.). Kyoto University Press. Kyoto, Japón.
- Pacala, S.W., Canham, C.D., Silander Jr., J.A. y R.K. Kobe. 1994. Sapling growth as a function of resources in a north temperate forest. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 2172 – 2183.
- Palahí, M., Mavsar, R., Gracia, C. e Y. Birot. 2008. Mediterranean forests under focus. *International Forestry Review* 10 (4): 676 – 688.
- Palamarev, E. 1989. Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Systematics and Evolution* 162: 93 – 107.
- Paneque, G. y L. Corral. 1982. Propiedades químicas de suelos y niveles de nutrientes en acículas de *Abies pinsapo* de Grazalema (Cádiz, España). *Anales de Edafología y Agrobiología* 41: 197 – 209.
- Pausas, J.G., Bladé, C., Valdecantos, A., Seva, J.P., Fuentes, D. Alloza, J.A., Vilagrosa, A., Bautista, S., Cortina, J. y R. Vallejo. 2004. Pines and oaks in the restoration of Mediterranean landscapes of Spain: New perspectives for an old practice – a review. *Plant Ecology* 171: 209 – 220.
- Pearcy, R.W. 1983. The light environment and growth of C3 and C4 tree species in the understory of a Hawaiian forest. *Oecologia* 58: 19 – 25.
- Pearcy, R.W. 1988. Photosynthetic utilisation of lightflecks by understory plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 15: 223 – 238.
- Pearcy, R.W. 1999. Responses of plants to heterogeneous light environments. Páginas 269 – 314 en *Handbook of Functional Ecology* (920 páginas). Pugnaire F.I. y F. Valladares, (Eds.). Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, EE.UU.
- Pearcy, R. y D. Sims. 1994. Photosynthetic acclimation to changing light environments: scaling from the leaf to the whole plant. Páginas 145 – 174 en *Exploitation of environmental heterogeneity by plants: ecophysiological processes above- and below-ground* (429 páginas). Caldwell, M.M. y R.W. Pearcy (Eds.). Academic Press Inc. San Diego, California, EE.UU.
- Pearcy, R.W., Ehleringer, J.R., Mooney, H.A. y P.W. Rundel. 1989. Plant physiological ecology: field methods and instrumentation (457 páginas). Chapman and Hall Ltd. Londres, Inglaterra, Reino Unido.
- Peguero-Pina, J.J., Camarero, J.J., Abadía, A., Martín, E., González-Cascón, R., Morales, F. y E. Gil-Pelegrín. 2007. Physiological performance of silver-fir (*Abies alba* Mill.) populations under contrasting climates near the south-western distribution limit of the species. *Flora* 202: 226 – 236.
- Pelleschi, S., Rocher, J.P. y J.L. Prioul. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell & Environment* 20: 493 – 503.

- Peñuelas, J. 2001. Cambios atmosféricos y climáticos y sus consecuencias sobre el funcionamiento y la estructura de los ecosistemas terrestres mediterráneos. Páginas 423 – 455 en *Ecosistemas mediterráneos. Análisis funcional* (463 páginas). Zamora, R. y F.I. Pugnaire (Eds.). CSIC-AEET. Madrid, España.
- Pepin, S. y N.J. Livingston. 1997. Rates of stomatal opening in conifer seedlings in relation to air temperature and daily carbon gain. *Plant, Cell & Environment* 20: 1462 – 1472.
- Pereira, J.S. y M.M. Chaves. 1993. Plant water deficit in Mediterranean ecosystems. Páginas 237 – 251 en *Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community* (345 páginas). Smith, J.A.C. y H. Griffiths (Eds.). Garland Science.
- Pereira, J.S., Tenhunen, J.D., Lange, O.L., Beyschlag, W., Meyer, A. y M.M. David. 1986. Seasonal and diurnal patterns in leaf gas exchange of *Eucalyptus globulus* trees grown in Portugal. *Canadian Journal of Forest Research* 16: 177 – 184.
- Pérez-Latorre, A.V. 1993. Estudio fitocenológico de los alcornocales andaluces. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- Pérez Latorre, A.V., Navas, P., Navas, D., Gil, Y. y B. Cabezudo. 1998. Datos sobre flora y vegetación de la Serranía de Ronda (Málaga, España). *Acta Botanica Malacitana* 23: 149 – 191.
- Perry, J.N. 1995. Spatial Analysis by Distance Indices. *Journal of Animal Ecology* 64: 303 – 314.
- Perry, J.N. 1998. Measures of spatial pattern for counts. *Ecology* 79: 1008 – 1017.
- Perry, J.N. y M. Hewitt. 1991. A new index of aggregation for animal counts. *Biometrics* 47: 1505 – 1518.
- Perry, J.N., Bell, E.D., Smith, R.H. e I.P. Woiwod. 1996. SADIE: software to measure and model spatial pattern. *Aspects of Applied Biology* 46: 95 – 102.
- Perry, J.N., Winder, L., Holland, J.M., y R.D. Alston. 1999. Red-blue plots for detecting clusters in count data. *Ecology Letters* 2 (2): 106 – 113
- Perttunen, J., Sievänen, R. y E. Nikinmaa. 1998. LIGNUM: a model combining the structure and the functioning of trees. *Ecological Modelling* 108: 189 – 198.
- Peters, R.L. 1992. Conservation of biological diversity in the face of climate change. Páginas 15 - 30 en *Global warming and biological diversity* (386 páginas). Peters, R.L. y T.E. Lovejoy (Eds.). Yale University Press, New Haven, Connecticut, EE.UU.
- Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J.M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V.M., Legrand, M., Lipenkov, V.Y., Lorius, C., Pépin, L., Ritz, C., Saltzman, E. y M. Stievenard. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429 – 436.
- Piispanen, R. y Saranpää, P. 2001. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. *Trees* 15: 444 – 451.
- Platt, W.J. y D.R. Strong, editors. 1989. Gaps in forest ecology. Special feature: Treefall gaps and forest dynamics. *Ecology* 70 (3): 535 – 576.
- Popp, M., Lied, W., Meyer, A.J., Richter, A., Schiller, P. y H. Schwitte. 1996. Sample preservation for determination of organic compounds: microwave versus freeze-drying. *Journal of Experimental Botany* 47: 1469 – 1473.
- Poulson, T.L. y W.J. Platt. 1989. Gap light regimes influence canopy tree diversity. *Ecology* 70: 553 – 555.

- Prider, J.N. y J.M. Facelli. 2004. Interactive effects of drought and shade on three arid zone chenopod shrubs with contrasting distributions in relation to tree canopies. *Functional Ecology* 18: 67 – 76.
- Primack, R.B. y S.L. Miao. 1992. Dispersal can limit local plant distribution. *Conservation Biology* 6: 513 – 519.
- Pritchard, S.G., Mosjidis, C., Peterson, C.M., Runion, G.B. y H.H. Rogers. 1998. Anatomical and morphological alterations in longleaf pine needles resulting from growth in elevated CO<sub>2</sub>: interactions with soil resource availability. *International Journal of Plant Sciences* 159: 1002 – 1009.
- Puddu, A., Luisi, N., Capretti, P. y A. Santini. 2003. Environmental factors related to damage by *Heterobasidion abietinum* in *Abies alba* forests in southern Italy. *Forest Ecology and Management* 180: 37 – 44.
- Quick, W.P., Chaves, M.M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M.L., Passarinho, J.A., Pereira, J.S., Adcock, M.D., Leegood, R.C. y M. Stitt, M. 1992. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell & Environment* 15: 25 – 35.
- Rasmussen, R.L., Brydges, T. y P. Mathy. 1993. Experimental manipulations of biota and biogeochemical cycling in ecosystems. Approach - Methodologies - Findings: Proceedings of a Symposium, Copenhagen (Denmark), 1992. Ecosystems Research Report, vol. 4. Comission of the European Community. Bruselas, Bélgica.
- Reich, P.B. y R.G. Amundson. 1985. Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Nature* 230: 566 – 570.
- Reich, P.B., Tjoelker, M.G., Walters, M.B., Vanderklein, D.W. y C. Buschena. 1998. Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* 12: 327 - 338.
- Rey, A. y P.G. Jarvis. 1998. Long-term photosynthetic acclimation to increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration in young birch (*Betula pendula*) trees. *Tree Physiology* 18: 441 – 450.
- Ricklefs, J.R. 1977. Environmental heterogeneity and plant species diversity: a hypothesis. *American Naturalist* 111: 376 – 381.
- de las Rivas, J., Abadía, A. y J. Abadía. 1989. A new reversed phase - HPLC method resolving all major higher plant photosynthetic pigments. *Plant Physiology* 91: 190 – 192.
- Robakowski, P., Montpied, P. y E. Dreyer. 2003. Plasticity of morphological and physiological traits in response to different levels of irradiance in seedlings of silver fir (*Abies alba* Mill). *Trees* 17: 431 – 441.
- Robakowski, P., Wyka, T., Samardakiewicz, S. y D. Kierzkowski. 2004. Growth, photosynthesis, and needle structure of silver fir (*Abies alba* Mill.) seedlings under different canopies. *Forest Ecology and Management* 201: 211 – 227.
- Roth, S., MacDonald, E.P. y R.L. Lindroth. 1997. Atmospheric CO<sub>2</sub> and soil water availability: consequences for tree-insect interactions. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 1281 – 1290.
- Rook, F. y M.W. Bevan. 2003. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *Journal of Experimental Botany* 54: 495 – 501.
- Ruiz de la Torre, J. 1994. Los pinsapares andaluces. Páginas 11 – 26 en *Gestión y Conservación de los Pinsapares Andaluces*. Asociación Forestal Andaluza. Cádiz, España.

- Runkle, J.R. 1982. Patterns of disturbance in some old-growth mesic forests of eastern North America. *Ecology* 63: 1533 – 1546.
- Ryel, R., Caldwell, M. y J. Manwaring. 1996. Temporal dynamics of soil spatial heterogeneity in sagebrush-wheatgrass steppe during a growing season. *Plant and Soil* 184: 299 – 309.
- Sabaté, S., Gracia, C.A. y A. Sánchez. 2002. Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. *Forest Ecology and Management* 162 (1): 23 – 37.
- Sack, L. 2004. Responses of temperate woody seedlings to shade and drought: do trade-offs limit potential niche differentiation? *Oikos* 107: 107 – 127.
- Sack, L. y P.J. Grubb. 2002. The combined impacts of deep shade and drought on the growth and biomass allocation of shade-tolerant woody seedlings. *Oecologia* 131: 175 – 185.
- Sack, L., Grubb, P.J. y T. Marañón. 2003. The functional morphology of juvenile plants tolerant of strong summer drought in shaded forest understories in Southern Spain. *Plant Ecology* 168: 139 – 163.
- Salido, M.T. 2003. Evaluación del estado de saturación de nitrógeno en pinsapares de la provincia de Málaga. Trabajo Tutelado de Iniciación a la Investigación, Universidad de Jaén.
- Salido, M.T. 2007. Evaluación del estado de saturación de nitrógeno en masas de pinsapar (*Abies pinsapo* Boiss.) del sur de la Península Ibérica: patrones generales de entrada, circulación interna y salida del nitrógeno en el ecosistema. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén.
- Sanchez, E., Gallardo, C., Gaertner, M.A., Arribas, A. y M. Castro. 2004. Future climate extreme events in the Mediterranean simulated by a regional climate model: a first approach. *Global Planetary Change* 44: 163 – 180.
- Sánchez, M. E., Capretti, P., Calzado, C., Navarro, R. y A. Trapero. 2005. Root rot disease on *Abies pinsapo* in southern Spain. Páginas 220 – 223 en Actas de la 11<sup>th</sup> International Conference on Root and Butt Rots, celebrada en Poznan (Polonia), del 16 al 22 de agosto de 2004. IUFRO Ed. Manka M., Lakomy. P. The August Ciezuowsky. Agricultural University, Poznan, Polonia.
- Sánchez, M.E., Luchi, N., Jiménez, J.J., Vita, P.D., Sánchez, J.E., Trapero, A. y P. Capretti. 2007a. An isolated population of *Heterobasidion abietinum* on *Abies pinsapo* in Spain. *Forest Pathology* 37: 348 – 356.
- Sánchez, M.E., Luchi, N., Sánchez, J., Trapero, A. y P. Capretti. 2007b. La podredumbre radical del pinsapo I: Identificación específica del agente causal. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 33(4): 527 – 535.
- Sánchez-Gómez, D., Valladares, F. y M.A. Zavala. 2006. Performance of seedlings of Mediterranean woody species under experimental gradients of irradiance and water availability: trade-offs and evidence for niche differentiation. *New Phytologist* 170: 795 – 806.
- Sanford, N.L., Harrington, R.A. y J.H. Fownes. 2003. Survival and growth of native and alien woody seedlings in open and understory environments. *Forest Ecology and Management* 183: 377 – 385.
- Saxe, H., Ellsworth, D.S. y J. Heath. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO<sub>2</sub> atmosphere. *New Phytologist* 139: 395 – 493.
- Saxe, H., Cannell, M.G.R., Johnsen, Ø., Ryan, M.G. y G. Vourlitis. 2001. Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist* 149: 369 – 399.

- Scaltosyiannes, A., Tsaktsira, M. y A.D. Drouzas. 1999. Allozyme differentiation in the Mediterranean firs (*Abies*, *Pinaceae*). A first comparative study with phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution* 216: 289 – 307.
- Scarascia-Mugnozza, G., Oswald, H., Piussi, P. y K. Radoglou. 2000. Forests of the Mediterranean region: gaps in knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* 132: 97 – 109.
- Scherzer, A. J., Rebbeck, J. y R.E.J. Boerner. 1998. Foliar nitrogen dynamics and decomposition of yellow-poplar and eastern white pine during four seasons of exposure to elevated ozone and carbon dioxide. *Forest Ecology and Management* 109: 355 – 366.
- Schindler, D.W., Turner, M.A. y R.H. Hesslein. 1985. Acidification and alkalization of lakes by experimental addition of nitrogen compounds. *Biogeochemistry* 1: 117 – 133.
- Schlesinger, W.H. 1991. Biogeochemistry: an analysis of global change. 443 páginas. Academic Press Inc. Nueva York, NY, EE.UU.
- Schlesinger, W.H. y A.E. Hartley. 1992. A global budget for atmospheric NH<sub>3</sub>. *Biogeochemistry* 15: 191 – 211.
- Schoefs, B., Bertrand, M. e Y. Lemoine. 1995. Separation of photosynthetic pigments and their precursors by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a photodiode-array detector. *Journal of Chromatography A* 692 (1-2): 239 – 245.
- Schulze, E.D. 1989. Air pollution and forest decline in a spruce (*Picea abies*) forest. *Science* 244: 776 – 783.
- Serichol-Escobar, C. 2005. Aclimatación a la luz y respuesta al estrés hídrico en *Abies pinsapo* (Boiss.). Trabajo tutelado de iniciación a la investigación. Universidad de Jaén.
- Shortle, W.C. y K.T. Smith. 1988. Aluminum-induced calcium deficiency syndrome in declining red spruce. *Science* 240: 1017 – 1018.
- Silvertown, J.W. y J. Lovett-Doust. 1993. Introduction to Plant Population Biology (210 páginas). Blackwell Science, Oxford, Inglaterra, Reino Unido.
- Sinnott, E.W. 1918. Factors determining character and distribution of food reserves in woody plants. *Botanical Gazette* 66: 162 – 175.
- Smith, S.V. y R.W. Buddemeier. 1992. Global change and coral reef ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 89 – 118.
- Smith, T. y M. Huston. 1989. A theory of the spatial and temporal dynamics of plant communities. *Vegetatio* 83: 49 – 69.
- Soto, D. 1998. Razas y variedades de *Abies pinsapo* Boiss. *Ecología* 12: 225 – 236.
- Souza, R.P., Machado, E.C., Silva, J.A.B., Lagôa, A.M.M.A. y J.A.G. Silveira. 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* 51: 45 – 56.
- Spies, T.A. y J.F. Franklin. 1989. Gap characteristics and vegetation response in coniferous forests of the Pacific Northwest. *Ecology* 70: 543 – 545.
- Stapleton, A.E. 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning question. *The Plant Cell* 4: 1353 – 1358.

- Stenger, R., Priesack, E. y F. Beese. 2002. Spatial variation of nitrate-N and related soil properties at the plot-scale. *Geoderma* 105: 259 – 275.
- Suc, J.P. 1984. Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature* 307: 429 – 432.
- Sumner, G.N., Romero, R., Homar, V., Ramis, C., Alonso, S. y E. Zorita. 2003. An estimate of the effects of climate change on the rainfall of Mediterranean Spain by the late twenty-first century. *Climate Dynamics* 20: 789 – 805.
- Svenning, J.C. y F. Skov. 2005. The relative roles of environment and history as controls of tree species composition and richness in Europe. *Journal of Biogeography* 32: 1019 – 1033.
- Svensmark, H. 2007. Cosmoclimatology: a new theory emerges. *Astronomy & Geophysics* 48 (1): 18 – 24.
- Svensmark, H. y E. Friis-Christensen. 1997. Variation of cosmic-ray flux and global cloud coverage – a missing link in solar-climate relationships. *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics* 59: 1225 – 1232.
- Tabachnick, B.G. y L.S. Fidell. 2007. Using multivariate statistics. 3ª edición (980 páginas). Ed. Pearson Education, Inc. Boston, Massachusetts, EE.UU.
- Taberlet, P. y R. Cheddadi. 2002. Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science* 297: 2009 – 2010.
- Tamm, C.O. 1991. Nitrogen in terrestrial ecosystems. Questions of productivity, vegetational changes and ecosystem stability (115 páginas). Springer-Verlag. Berlín, Alemania.
- Teramura A.H. y J.H. Sullivan. 1994. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research* 39 (3): 463 – 473.
- Terashima, I. y J.R. Evans. 1988. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant and Cell Physiology* 29: 143 – 155.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D. y D.W. Lawlor. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914 – 917.
- Thayer, S.S. y O. Björkman. 1990. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* 23 (3): 331 – 343.
- Thompson J. 2005. Plant evolution in the Mediterranean (293 páginas). Oxford University Press. Oxford, Inglaterra, Reino Unido.
- Tilman, D. 1987. Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecological Monographs* 57: 189 – 214.
- Tilman, D. y P. M. Kareiva. 1997. Spatial ecology: the role of space in population dynamics and interspecific interactions (368 páginas). Princeton University Press. Princeton, Nueva Jersey, EE.UU.
- Tjoelker, M.G., Oleksyn, J. y P.B. Reich. 1998. Seedlings of five boreal tree species differ in acclimation of net photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub> and temperature. *Tree Physiology* 18: 715 – 726.
- Tolbert, N.E. 1994. Role of photosynthesis and photorespiration in regulating atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. Páginas 8 – 33 en *Regulation of atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> by photosynthetic carbon metabolism* (288 páginas). Tolbert, N.E. y J. Preiss (Eds.). Oxford University Press. Nueva York, NY, EE.UU.

- Tosserams, M., Visser, A., Groen, M., Kalis, G., Magendans, E. y J. Rozema. 2001. Combined effects of CO<sub>2</sub> concentration and enhanced UV-B radiation on faba bean. *Plant Ecology* 154: 197 – 210.
- Turner, R.E. y N.N. Rabelais. 1991. Changes in Mississippi River water quality this century: implications for coastal food webs. *BioScience* 41: 140 – 147.
- Tzedakis, P.C., Lawson, I.T., Frogley, M.R., Hewitt, G.M. y R.C. Preece. 2002. Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science* 297: 2044 – 2047.
- Uemura, A., Ishida, A., Nakano, T., Terashima, I., Tanabe, H. e Y. Matsumoto. 2000. Acclimation of leaf characteristics of *Fagus* species to previous-year and current-year solar irradiances. *Tree Physiology* 20: 945 – 951.
- Valladares, F. 2003. Light heterogeneity and plants: from ecophysiology to species coexistence and biodiversity. *Progress in Botany* 64: 439 – 471.
- Valladares, F. 2004. El ambiente lumínico de los sotobosques ibéricos. *Quercus* 215: 28 – 35.
- Valladares, F. y R.W. Pearcy. 2002. Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photo-inhibition in a Californian shrub during a dry El Niño year. *Plant, Cell & Environment* 25: 749 – 759.
- Valladares, F., Allen, M.T. y R.W. Pearcy. 1997. Photosynthetic responses to dynamic light under field conditions in six tropical rainforest shrubs occurring along a light gradient. *Oecologia* 111: 505 – 514.
- Valladares, F., Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Pérez-Corona, E. y E. Manrique. 2000. Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytologist* 148: 79 – 91.
- Valladares, F., Balaguer, L., Martínez-Ferri, E., Pérez-Corona, E. y E. Manrique. 2002. Plasticity, instability and canalization: is the phenotypic variation in seedlings of sclerophyll oaks consistent with the environmental unpredictability of Mediterranean ecosystems? *New Phytologist* 156: 457 – 467.
- Valladares, F., Aranda, I. y D. Sánchez-Gómez. 2004a. La luz como factor ecológico y evolutivo para las plantas y su interacción con el agua. Páginas 335 – 369 en *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (590 páginas). Valladares, F. (Ed.). Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales. EGRAF, S. A. Madrid, España. ISBN: 84-8014-552-8.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J.J., Corcuera, L., Sisó, S. y E. Gil-Pelegrín. 2004b. Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. Páginas 163 – 190 en *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (590 páginas). Valladares, F. (Ed.). Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales. EGRAF, S. A., Madrid, España. ISBN: 84-8014-552-8.
- Valladares, F., Peñuelas, J. y E.L. Calabuig. 2005. Impactos sobre los ecosistemas terrestres. Páginas 65 – 112 en *Evaluación preliminar de los impactos del cambio climático en España* (822 páginas). J. M. Moreno (Ed.). Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, España.
- Veblen, T.T. 1985. Forest development in tree-fall gaps in the temperate rain forests of Chile. *National Geographic Reports Spring* 1985: 162 – 183.
- Veblen, T.T. 1989. Tree regeneration responses to gaps along a transandean gradient. *Ecology* 70: 541 – 543.
- Veneklaas, E.J. y F. den Ouden. 2005. Dynamics of non-structural carbohydrates in two *Ficus* species after transfer to deep shade. *Environmental and Experimental Botany* 54: 148 – 154.

- Vicente-Serrano, S.M., Gonzalez-Hidalgo, J.C., de Luis, M. y J. Raventos. 2004. Drought patterns in the Mediterranean area: the Valencia region (eastern Spain). *Climate Research* 26: 5- – 15.
- Vigo, J. y J.M. Ninot. 1987. Los Pirineos. Páginas 351 – 384 en *La vegetación en España* (544 páginas). Peinado Lorca, M. y S. Rivas Martínez (Eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá de Henares. Alcalá de Henares, Madrid, España.
- de Vita, P., Jiménez, J., Trapero, A., Capretti, P. y M. Sánchez. 2007. La podredumbre radical del pinsapo II: Diseminación de *H. abietinum* en bosques de *Abies pinsapo*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 33(4): 537 – 545.
- Vitousek, P.M. 1992. Global environmental change: an introduction. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 1 – 14.
- Vitousek, P.M. 1994. Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75: 1861 – 1876.
- Vitousek, P.M. y J.S. Denslow. 1986. Nitrogen and phosphorus availability in treefall gaps of a lowland tropical rainforest. *Journal of Ecology* 74: 1167 – 1178.
- Vitousek, P.M. y R.W. Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87 – 115.
- Vitousek, P.M. y P.A. Matson. 1993. Agriculture, the global nitrogen cycle and trace gas flux. Páginas 193 - 208 en *The biogeochemistry of global change: radiatively active trace gases* (512 páginas). R.S. Oremland (Ed.) Chapman & Hall. Nueva York, NY, EE.UU.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. y D.G. Tilman. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7: 737 – 750.
- Vogel, J.C. 1978. Recycling of carbon in a forest environment. *Oecologia Plantarum* 13: 89 – 94.
- Walters M. y P.B. Reich. 1996. Are shade tolerance, survival, and growth linked? Low light and nitrogen effects on hardwood seedlings. *Ecology* 77: 841-853
- Walters, M.C. y P.B. Reich. 1999. Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? (Research review). *New Phytologist* 143: 143 – 154.
- Wardle, D. A., Huston, M.A., Grime, J.P., Berendse, F., Garnier, E., Lauenroth, W.K., Setälä, H. y S.D. Wilson. 2000. Biodiversity and ecosystem function: an issue in ecology. *Bulletin of the Ecological Society of America* 81: 235 – 239.
- Waring, R.H. y W.B. Silvester. 1994. Variation in foliar  $d^{13}C$  values within the crowns of *Pinus radiata* trees. *Tree Physiology* 14: 1203 – 1213.
- Watt, A.S. 1947. Pattern and processes in the plant community. *Journal of Ecology* 35: 1 – 22.
- Webb, W.L. 1981. Relation of starch content to conifer mortality and growth loss after defoliation by the Douglas-fir tussock moth. *Forest Science* 27: 224 – 232.
- Whitehead, D. y R.O. Teskey. 1995. Dynamic response of stomata to changing irradiance in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) *Tree Physiology* 15: 245 – 251.
- Whitehead, D., Livingston, N.J., Kelliher, F.M., Hogan, K.P., Pepin, S., McSeveny, S.M. y J.N. Byers. 1996. Response of transpiration and photosynthesis to a transient change in illuminated foliage area for a *Pinus radiata* D. Don tree. *Plant, Cell & Environment* 19: 949 – 957.

- Whitmore, T.C. 1975. Tropical rainforest of the Far East (282 páginas). Clarendon Press. Oxford, Inglaterra, Reino Unido.
- Whitmore, T.C. 1978. Gaps in the forests canopy. Páginas 639 – 655 en *Tropical trees as living systems* (675 páginas). Tomlison, P.B. y M.H. Zimmermann (Eds.). Cambridge University Press, Nueva York, N.Y., EE.UU.
- Whitmore, T.C. 1989. Canopy gaps and the two major groups of forest trees. *Ecology* 70: 536 – 538.
- Will, R.E. y R.O. Teskey. 1997. Effect of irradiance and vapour pressure deficit on stomatal response to CO<sub>2</sub> enrichment of four tree species. *Journal of Experimental Botany* 48: 2095 – 2102.
- Williams, R.Y., Lincoln, D.E. y R.J. Norby. 1998. Leaf age effects of elevated CO<sub>2</sub>-grown white oak leaves on spring-feeding lepidopterans. *Global Change Biology* 4: 235 – 246.
- Willis, K.J. 1996. Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. *Endeavour* 20: 110 – 114.
- Willis, K. y K. Niklas. 2004. The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359: 159 – 172.
- Willis, K. J. y R. Whittaker. 2000. Paleoecology: the refugial debate. *Science* 287: 1406 – 1407.
- Wilson E.O. (Ed.) 1988. Biodiversity (538 páginas). National Academy of Sciences Press. Washington D.C., EE.UU.
- Wong, S.C. 1990. Elevated atmospheric partial pressure of CO<sub>2</sub> and plant growth. II. Non-structural carbohydrate content and its effect on growth parameters. *Photosynthesis Research* 23: 171 – 180.
- Woodward, F.I. 1987. Climate and plant distribution (188 páginas). Cambridge University Press, *Cambridge studies in Ecology* series. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido.
- Worrall, J.J., Lee, T.D. y T.C. Harrington. 2005. Forest dynamics and agents that initiate and expand canopy gaps in *Picea–Abies* forests of Crawford Notch, New Hampshire, USA. *Journal of Ecology* 93: 178 – 190.
- Wullschleger, S.D., Norby, R.J. y C.A. Gunderson. 1997. Forest trees and their response to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment: a compilation of results. Páginas 79 – 100 en *Advances in carbon dioxide effects research* (228 páginas). Allen, L.H.J., Kirkham, M.B., Olszyck, D.M. y C.E. Williams (Eds.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, EE.UU.
- Xu, Y., This, D., Pausch, R.C., Vonhof, W.M., Coburn, J.R., Compstock, J.P. y S.R. McCouch. 2009. Leaf-level water use efficiency determined by carbon isotope discrimination in rice seedlings: genetic variation associated with population structure and QTL mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1065 – 1081.
- Yakir, D. e Y. Israeli. 1995. Reduced solar irradiance effects on net primary productivity (NPP) and the  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values in plantations of *Musa* sp., *Musaceae*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59: 2149 – 2151.
- Yamamoto, S. 2000. Forest gap dynamics and tree regeneration. *Journal of Forest Research* 5: 223 – 229.
- Yu, M., Xie, Y. y X. Zhang. 2005. Quantification of intrinsic water use efficiency along a moisture gradient in northeastern China. *Journal of Environmental Quality* 34: 1311 – 1318.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis, 4ª edición (663 páginas). Prentice Hall. Nueva Jersey, EE.UU.

- Zhang, X., N., Wu, y C. Li. 2005. Physiological and growth responses of *Populus davidiana* ecotypes to different soil water contents. *Journal of Arid Environments* 60: 567 – 579.
- Zimmerman, J.K. y J.R. Ehleringer. 1990. Carbon isotope ratios are correlated with irradiance levels in the Panamanian orchid *Catasetum viridiflavum*. *Oecologia* 83: 247 – 24.
- Zrenner, R. y M. Stitt. 1991. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant, Cell & Environment* 14: 939 – 946.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N. y G.M. Smith. 2007. *Analysing ecological data* (680 págs). Springer-Verlag. Nueva York, NY, EE.UU.



“No one means all he says, and yet very few say all they mean, for words are slippery and thought is viscous.”

Henry Adams



