



2022  
Lleida

27 · 1  
junio · juny  
juliol · juliol

Cataluña  
Catalunya

## 8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

## Papel fuente-sumidero de las piñas de tercer año en *Pinus pinea*

SANCHEZ BRAGADO, R.<sup>1</sup>, TEIXIDÓ, A.<sup>1</sup>, VOLTAS, J.<sup>2,3</sup>, ARAUS J.L.<sup>4</sup>, ALETA, N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Fruticultura, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA), Torre Marimon, 08140 Caldes de Montbui, España.

<sup>2</sup> Joint Research Unit CTFC – AGROTECNIO – CERCA, Av. Alcalde Rovira Roure 191, Lleida E-25198, España.

<sup>3</sup> Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Av. Alcalde Rovira Roure 191, Lleida E-25198, España.

<sup>4</sup> Grupo de Ecofisiología Integrativa de Cultivos, Sección de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, y Centro AGROTECNIO, Lleida, España.

### Resumen

Se ha observado que no existe una compensación entre asignación a biomasa aérea e inversión en reproducción en pino piñonero (*P. pinea* L.). Este fenómeno se traduce en que el peso de las piñas de tercer año, (el año previo a la diseminación) no está afectado por las condiciones climáticas. Así, se ha especulado que los recursos necesarios para el crecimiento y llenado de las piñas deberían proceder, al menos en parte, de una fuente fotosintética alternativa a las acículas tal y como podrían ser las piñas en su fase de crecimiento cuando son verdes. El objetivo de este estudio fue la evaluación de parámetros fotosintéticos relacionados con la piña verde durante el engrosamiento previo a la recolección. Se llevaron a cabo dos tratamientos de manipulación fuente-sumidero: a) defoliado de acículas por debajo de las piñas y b) inhibición de la fotosíntesis de las piñas con un textil. El ensayo se efectuó en árboles de pino piñonero injertados sobre *P. pinea* L. en fase productiva, en una plantación en Caldes de Montbui (Barcelona). Se observaron diferencias en el tamaño de las piñas según los tratamientos aplicados. Estos resultados indicarían que la piña puede no tener un papel fundamental como fuente de fotoasimilados, ya que los tratamientos de sombreado no solo no disminuyeron el peso promedio por piñón, si no que lo aumentaron. Por otra parte, en las piñas parece que no hay limitación de sumidero ya que, contrariamente, el defoliado de las acículas disminuyó significativamente el peso promedio de los piñones indicando una co-limitación de fuente-sumidero.

### Palabras clave

Fotosíntesis, piñas, pino piñonero, fuente-sumidero.

### 1. Introducción

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una importante conífera de las masas forestales mediterráneas y con su peculiar forma de copa un reconocido símbolo de la vegetación de esta zona del mundo (MUTKE et al 2012). Además, las excelentes características nutritivas del fruto, el piñón real, le han convertido desde la antigüedad en un bien preciado en la alimentación humana (NERGIZ & DÖNMEZ, 2004; EVARISTO et al 2013). Las semillas del pino piñonero son un valioso producto del bosque mediterráneo, pero su largo ciclo reproductivo, más de tres años, dificulta la regularidad en la producción, así como la identificación de los mecanismos responsables de estos resultados. A lo largo de la vida de una especie, todas las respuestas vegetativas, adaptativas y de reproducción son rasgos ligados a las limitaciones impuestas por factores tanto bióticos como abióticos (LOEWE et al 2015, CALAMA et al 2020). En el caso del pino piñonero, estas limitaciones impuestas a lo largo de su vida fuerzan a que se desarrollen variaciones estratégicas en la adquisición, almacenamiento y asignación de recursos, reflejando rasgos adaptativos divergentes (OBESO, 2002; SANTOS-DEL-BLANCO et al 2015; SANTINI et al 2019). Esta adaptación divergente puede ocasionar compensaciones entre diferentes rasgos a lo largo de la vida de un árbol (como por ejemplo las clásicas entre el crecimiento y reproducción o las de localización de biomasa aérea o subterránea), sin embargo, a veces no son evidentes, por ejemplo debido a la vecería en el caso del pino piñonero

(SHESTAKOVA, 2021). En coníferas se han observado correlaciones negativas entre el crecimiento radial y la producción de semilla (KOENIG & KNOPS, 1998; KELLY & SORK, 2002). Asimismo, bajo climas limitantes para el desarrollo del árbol, la magnitud de las compensaciones entre crecimiento radial y producción de semilla puede aumentar, generando un cambio en la asignación de recursos favoreciendo la reproducción (BERDANIER & CLARK, 2016; HACKET-PAIN et al 2017). La relación negativa entre el crecimiento y reproducción no necesariamente se traduce en un cambio en la asignación de recursos, ya que factores climáticos pueden tener un impacto diferente en los dos parámetros (KNOPS et al 2007) y sin embargo, se ha observado que bajo condiciones climáticas similares, la asignación de recursos hacia el crecimiento y reproducción puede ser positiva para los dos parámetros (DESPLAND & HOULE, 1997) o incluso inexistente (SHESTAKOVA et al 2021). Así, la ausencia de relación directa entre crecimiento y reproducción puede generar una ausencia de interacciones negativas entre asignación a biomasa aérea e inversión en reproducción (peso de las piñas de tercer año, año previo a la diseminación) en pino piñonero (SHESTAKOVA et al 2021). Con estos resultados se ha especulado que los recursos necesarios para el crecimiento y llenado de las piñas deberían proceder, al menos en parte, de una fuente fotosintética alternativa a las acículas, tal y como podrían ser las piñas en su fase de crecimiento, cuando son verdes. En este contexto, la cuantificación de foto-asimilados provenientes de diferentes órganos fotosintéticos, usando tratamientos de manipulación fuente-sumidero, podrían ayudar a determinar la fuente de foto-asimilados que se usa para el llenado de los granos de los piñones (ya sean foto-asimilados provenientes de las acículas o de las piñas adultas). Las estructuras fotosintéticas y su relación con la anatomía de las acículas han sido ampliamente estudiadas en diferentes especies de pino (LIN et al 2001; STABENTHEINER et al 2004; GHIMIRE et al 2014) pero sin embargo en piñas no hay estudios al respecto. En ese sentido, el estudio de la anatomía de la piña y de sus estructuras fotosintéticas podría esclarecer el potencial papel fotosintético de la piña como una fuente de foto-asimilados durante el llenado del piñón del pino piñonero.

## 2. Objetivos

El objetivo central del estudio fue evaluar el papel fotosintético de las piñas verdes de tercer año de *Pinus pinea* L. en el crecimiento de los piñones durante el último año de su desarrollo.

A tal efecto se compararon a) los parámetros fotosintéticos de la piña verde adulta (3 años de desarrollo), incluyendo la anatomía (las estructuras fotosintéticas de la epidermis de la piña) *versus* las características fotosintéticas y anatomía de las acículas y, además b) se evaluó la respuesta de la piña a tratamientos de manipulación fuente-sumidero, tal como la inhibición de la fotosíntesis de las piñas verdes y de las acículas.

## 3. Metodología

El ensayo se llevó a cabo en Torre Marimon (TM), Caldes de Montbui, Barcelona (41°37'58" N, 2°10'03" E, 203 msnm). La parcela consta de un total de 46 árboles, de los cuales 33 son *P. pinea* injertados sobre *P. pinea*, actualmente todos en fase productiva. Los plantones injertados, producidos por Forestal Catalana (vivero de Breda-Girona) se plantaron en la parcela de TM en 2010. El injerto se efectuó en contenedor sobre un patrón de dos años que se injertó con un clon de la Región de Procedencia Cataluña Litoral (ALÍA et al 2009), seleccionado por su buena aptitud productiva. En 2021, en parada vegetativa, se eligieron 18 árboles representativos para su edad entre los injertados sobre *P. pinea* sobre los que se aplicarían los distintos tratamientos y se haría el seguimiento.

### Tratamientos

Se llevaron a cabo tres tratamientos de manipulación fuente-sumidero: a) defoliado total de acículas del verticilo por debajo de las piñas (DF), b) sombreado de las piñas usando un textil opaco (S) y c)

defoliado de las acículas por debajo de las piñas unido al sombreado de las piñas con un textil opaco en la misma rama (DF+S). Para el tratamiento de sombreado se cubrió la totalidad de la piña evitando que las piñas quedaran expuestas a la luz, inhibiendo así su potencial fotosíntesis. Se usó una tela opaca para el sombreado, pero permeable para evitar la acumulación de etileno (MOLERO et al 2014), que se cubrió a su vez con una tela blanca para reflejar la radiación solar y así evitar el previsible excesivo aumento de temperatura. Se utilizaron 5 árboles en cada uno de los tres tratamientos (S, S+DF y DF) y 3 árboles adicionales se usaron como testigo control. Sobre los 15 árboles elegidos, se seleccionaron 10 verticilos por árbol, aplicando tratamientos a 5 y los 5 restantes se etiquetaron como controles dentro del mismo árbol. Los verticilos de cada tratamiento tenían al menos 2 piñas de tercer año. Los tratamientos se aplicaron en la primavera del 2021. Sobre todos los tratamientos se fue midiendo del crecimiento de las piñas en diámetro y longitud cada dos semanas. El 6 de octubre de 2021 se cosecharon las piñas de todos los tratamientos se pesó el peso verde de la piña, y se secaron en una estufa a 45°C durante 7 días para extraer el piñón. Posteriormente se determinó el rendimiento de piñón en cáscara.

#### Medida de la tasa fotosintética de piña y acícula

Se midió la fotosíntesis en las acículas localizadas debajo de los tratamientos (en S y controles) y la tasa fotosintética y la respiración oscura en las piñas tratadas del tercer año (DF y controles). Las mediciones de fotosíntesis, tanto de acículas como de piñas, se llevaron a cabo en un total de 3 árboles (cada árbol representa una réplica) durante 3 momentos del desarrollo de la piña de tercer año: primavera (11 de mayo del 2021; inicio de los tratamientos), verano (11 de agosto de 2021; crecimiento máximo de la piña) y otoño (28 de septiembre de 2021; inmediatamente antes de la cosecha de las piñas). Se midió la fotosíntesis neta de las acículas con un analizador portátil de gaseoso infrarrojo (IRGA Licor 6400XT) a saturación 1800 ( $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) durante la primera medición en primavera y posteriormente a 300  $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la misma intensidad de la luz a la utilizada para las mediciones de fotosíntesis de las piñas. Para la medida de la tasa fotosintética de las piñas, se diseñó un prototipo de cámara capaz de contener una piña que se acopló (Figura 1) al IRGA Licor 6400, basado en modelos anteriores (ARANJUELO et al 2009).



Figura 1. Cámara diseñada para medir la tasa fotosintética de las piñas acoplada al LICOR 6400.

La cámara de fotosíntesis de la piña consiste en una esfera acrílica con los laterales sellados con los tubos de entrada y salida (muestra) de gases situados a ambos lados (Figura 1). Para hacer la cámara hermética a los gases, se colocaron juntas de neopreno negro alrededor de la cámara. Para medir la temperatura de la piña, se incorporó un termopar tipo K dentro de la cámara. Para medir la tasa fotosintética de la piña, ésta se encerró dentro de la cámara de manera que el flujo de aire en el interior cámara se ajustó a 1 l min<sup>-1</sup>. La presión parcial del CO<sub>2</sub> se mantuvo constante mediante un sistema de inyección controlado por el IRGA. Para garantizar condiciones de estado estacionario dentro de la cámara, se dejó que el sistema se estabilizara durante unos minutos. Se colocó una fuente de luz externa compuesta por luces LED (con un 10% de luz azul y un 90% de luz roja) alrededor de la cámara durante la medición logrando así una intensidad de luz PPFD de aproximadamente 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  medido dentro de la cámara. Las tasas de fotosíntesis se

expresaron por unidad de superficie teniendo en cuenta el órgano entero (piña). Teniendo en cuenta que el proceso de respiración de los tejidos internos de la piña podría estar sesgando los resultados de la fotosíntesis neta, se midió la respiración después de la medida de fotosíntesis, sombreando las piñas con una tela opaca para así obtener el valor neto de respiración. Así, el valor que se obtuvo de la fotosíntesis bruta de la piña fue la suma entre el valor de la tasa fotosíntesis neta y la respiración oscura. Después de medir el intercambio de gases, se recogió la piña y se midió su superficie para poder corregir el valor del área en las medidas tomadas para expresar los valores por unidad de área (para las acículas no se hizo ninguna corrección). Para las medidas de superficie se consideró la proyección de la piña en dos caras (frontal y lateral). Las medidas de área se tomaron a través de fotografías RGB (Figura 2) posteriormente tratadas con el software Fiji donde se estimó el área proyectada (STIMSON et al 2005).



Figura 2. Fotografía RGB tomada para calcular el área proyectada de la piña.

#### Análisis microscópico de las piñas y acículas

Se extrajo la zona epidérmica superficial de piñas control y también de acículas adultas, para observar la estructura celular del tejido fotosintético de ambos órganos a través del microscopio. La visualización se realizó utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) de emisión de campo (Joel JSM-7001F) de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB). Las muestras se sometieron a una deshidratación previa en etanol a diferentes graduaciones seguida de una liofilización según el protocolo de ESTÉVEZ-GEFFRIAUD et al (2020). También se realizaron cortes transversales para el estudio del perfil de la epidermis de la piña y acículas para su observación al microscopio óptico (Leica). La preparación y observación de las muestras se realizó en la Unidad de Criomicroscopía Electrónica de los CCiTUB. Las muestras se fijaron en paraformaldeído al 2 % y glutaraldehído al 2,5 % en tampón de fosfato 0,1 M durante la noche. Se lavaron cuatro veces con tampón fosfato 0,1 M, se postfijaron con tetróxido de osmio al 1 % (EMS, Hatfield, EE. UU.) durante dos horas y se enjuagaron con agua milliQ. Luego, las muestras se deshidrataron en una serie de acetona (50 %, 70 %, 90 %, 96 % y 100 %, durante 10 min cada una), y se infiltraron e incluyeron en resina Epon (EMS, Hatfield, EE. UU.). Se obtuvieron secciones semifinas de 500 nm de grosor utilizando un ultramicrotomo UC6 (Leica Microsystems, Viena, Austria) y se tiñeron con azul de metileno al 0,5 %. Las secciones se observaron en un microscopio óptico Leica DM20000LED a 100x y las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD de 1kx1k. Por otro lado, para la visualización de la disposición de los estomas se aplicó una capa fina de esmalte de uñas transparente en la zona abaxial de las acículas (4 réplicas biológicas por tratamiento), que se dejó secar durante unos 90 segundos, y se procedió a arrancarla con cinta adhesiva y se adhirió la muestra a un portaobjetos. Con un microscopio óptico se contó el número de estomas por campo 100 aumentos ( $\varnothing$  campo = 0,9 mm, S = 0,636 mm<sup>2</sup>). Este recuento se realizó en cada uno de los tratamientos donde se midió la tasa fotosintética. Se calculó la densidad estomática como el número de estomas por superficie de acícula (mm<sup>2</sup>). La densidad estomática de las piñas se observó en tres zonas laterales de cada piña (3 réplicas biológicas por tratamiento) y se visualizaron



en microscopio tres campos por cada lateral, siguiendo la misma metodología descrita para las acículas.

#### 4. Resultados

El crecimiento del diámetro de la piña disminuyó en los tratamientos de eliminación de fuente: en el defoliado (DF) disminuyó un 11,1% respecto del control (CT) y en el defoliado y sombreado (DF+S) en un 12,6% respecto al control (Tabla 1). El diámetro de la piña no varió con el tratamiento de sombreado. El sombreado de la piña tampoco afectó a su peso fresco respecto al control (CT). Sin embargo, los tratamientos de DF y S+DF si provocaron una disminución en el peso fresco de la piña, en un 22,3% y 21.1%, respectivamente versus el control (Tabla 1).

Tabla 1. Media  $\pm$  desviación estándar del crecimiento en diámetro de la piña de tercer año de *P. pinea* desde el inicio del ensayo hasta alcanzar el tamaño final y del peso seco de la piña en los tratamientos.

Tratamiento	Crecimiento diámetro piña				Peso seco por piña verde		
	N	Media (mm)	SD		N	Media (g)	SD
C	9	38,0	$\pm$ 3,8	a	9	363,3	$\pm$ 45,6 a
CT	95	34,9	$\pm$ 5,3	a	95	347,3	$\pm$ 134,0 a
DF	18	31,0	$\pm$ 3,9	b	15	269,7	$\pm$ 69,2 b
S+DF	21	30,5	$\pm$ 4,1	b	24	273,8	$\pm$ 59,7 b
S	25	35,5	$\pm$ 4,8	a	25	361,7	$\pm$ 99,3 a

#### Nivel de significancia

Tratamiento	0,000	0,006
-------------	-------	-------

Defoliado (DF), sombreado de la piña con una tela opaca (S), defoliado y sombreado de la piña (DF+S), controles pertenecientes a cada árbol tratado (CT) y controles de árboles sin tratamientos (C). N número de piñas analizadas. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ).

El peso seco por piñón total (sin considerar si los piñones estaban llenos o vacíos) aumentó en el tratamiento de sombreado de la piña en un 16% respecto al CT (Tabla 2). Sin embargo, los tratamientos defoliado DF y S+DF disminuyeron el peso seco por piñón lleno un 15,5% y un 8,4% vs CT, respectivamente. El peso por piñón lleno del tratamiento de S fue similar al control y mayor que los tratamientos DF y S+DF (Tabla 2).

Tabla 2. Media  $\pm$  desviación estándar del peso por piñón (g) de los piñones con cáscara (Peso seco piñones/n° piñones), y de los piñones llenos (Peso seco piñones llenos/n° piñones llenos) de *P. pinea* injertado en *P. pinea* en la cosecha de los tratamientos.

Tratamiento	N	Peso seco piñones/n° piñones (g)			Peso seco piñones llenos/n° piñones llenos (g)		
		Mean (g)	SD		Mean (g)	SD	
C	9	0,62	$\pm$ 0,04	b	0,65	$\pm$ 0,03	b
CT	93	0,68	$\pm$ 0,15	ab	0,71	$\pm$ 0,15	ab
DF	15	0,65	$\pm$ 0,11	b	0,65	$\pm$ 0,11	b
DF + S	24	0,59	$\pm$ 0,11	b	0,60	$\pm$ 0,12	b
S	25	0,79	$\pm$ 0,19	a	0,79	$\pm$ 0,20	a

#### Nivel de significancia

Tratamiento	0.000	0.000
-------------	-------	-------

Defoliado (DF), sombreado de la piña con una tela opaca (S), defoliado y sombreado de la piña (DF+S), controles pertenecientes a cada árbol tratado (CT) y controles de árboles sin tratamientos (C). N número de piñas analizadas.

Diferentes letras representan diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Tukey HSD ( $P < 0,005$ ). Test de ANOVA para el efecto del tratamiento.

La tasa fotosintética de las acículas (Tabla 3), en la primavera (cuando se midió a  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR), disminuyó en el tratamiento de sombreado de la piña ( $7,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) respecto al control ( $9,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). En la medición de verano (final crecimiento de la piña, acículas 2020) y en otoño (pre-cosecha, acículas 2021) no se obtuvieron diferencias significativas de los tratamientos frente al control por lo que respecta a la fotosíntesis de las acículas (Tabla 3). La fotosíntesis de las acículas del año 2020 disminuyó a lo largo del crecimiento de las piñas, mientras que las acículas jóvenes (del año 2021) mostraron una tasa fotosintética mayor que las del 2020 una vez presentes. Las acículas del año 2020 también se midieron en otoño, pero se obtuvieron valores de fotosíntesis neta muy cercanos cero (datos no mostrados).

Tabla 3. Media  $\pm$  desviación estándar de la tasa fotosintética de las acículas de *P. pinea* y durante la primavera, verano y otoño de los tratamientos.

Fecha	Tratamiento	Edad acícula	PAR	N	Fotosíntesis	SD
Primavera	C	2020	1800	6	5,9	$\pm 0,5$ b
	CT	2020	1800	6	9,1	$\pm 2,0$ a
	S	2020	1800	6	7,8	$\pm 1,7$ ab
Verano	C	2020	300	6	1,9	$\pm 2,6$
	CT	2020	300	6	2,5	$\pm 2,1$
	S	2020	300	6	2,2	$\pm 1,0$
	C	2020	1800	6	5,0	$\pm 2,0$
	CT	2020	1800	6	3,8	$\pm 2,7$
	S	2020	1800	6	3,1	$\pm 1,2$
Otoño	C	2021	300	6	5,1	$\pm 2,0$
	CT	2021	300	18	4,0	$\pm 1,5$
	DF	2021	300	6	4,9	$\pm 1,0$
	DF+S	2021	300	7	4,3	$\pm 1,0$
	S	2021	300	6	4,5	$\pm 0,5$
	C	2021	1800	6	10,2	$\pm 4,2$
	CT	2021	1800	18	7,9	$\pm 3,5$
	DF	2021	1800	6	8,6	$\pm 2,2$
	DF+S	2021	1800	7	9,0	$\pm 2,8$
	S	2021	1800	6	8,2	$\pm 1,9$

Sombreado (S), controles pertenecientes a cada árbol tratado (CT), controles de árboles sin tratamientos (C). Las acículas que se midieron tanto en primavera como en verano se desarrollaron en 2020, las acículas de 2021 se midieron en otoño a 300 y a  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con el test de Tukey HSD ( $P < 0,005$ ).

La fotosíntesis neta de las acículas (Tabla 3, promedio del C,  $4,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fue significativamente menor que la de las piñas (Tabla 4, promedio del C,  $22,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque el DF tendió a disminuir la fotosíntesis bruta de la piña respecto al CT (Tabla 4) en primavera y otoño. Durante el desarrollo de la piña, la fotosíntesis neta disminuyó progresivamente con el tiempo, siendo la más baja para el C en otoño ( $14,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), seguida por la de verano ( $23,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y la más alta en primavera ( $31,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Tabla 4. Media  $\pm$  desviación estándar de la tasa fotosintética de la piña de tercer año de *P. pinea* medida durante la primavera, el verano y otoño en los distintos tratamientos.

Fecha medición	Tratamiento	N	PAR ( $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Fotosíntesis ( $\mu\text{moles CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	SD
Primavera	C	3	300	31,0 $\pm$ 10,2	a
	CT	3	300	29,0 $\pm$ 6,8	
	DF	3	300	27,9 $\pm$ 4,3	
Verano	C	3	300	23,6 $\pm$ 4,2	b
	CT	3	300	25,1 $\pm$ 1,7	
	DF	3	300	26,8 $\pm$ 4,0	
Otoño	C	2	300	14,1 $\pm$ 5,0	c
	CT	2	300	23,5 $\pm$ 6,4	
	DF	3	300	17,0 $\pm$ 1,7	

**Nivel de significación**

Tratamiento (T)	0,338
Ontología piña (O)	<b>0,008</b>
T x O	0,731

Tratamiento defoliado (DF), control sobre cada árbol tratado (CT), control sobre árboles testigo sin tratar (C). Diferentes letras representan diferencias significativas dentro del control entre la ontología de la piña de acuerdo con el test de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ). ANOVA ajustado para el efecto del tratamiento, el momento de medida (ontología de la piña) y la interacción entre ambos factores.

Por lo que respecta a la caracterización fisiológica de estructuras fotosintéticas en el tejido de la piña, se observó a través del microscopio óptico que la piña contiene estomas, en una densidad menor comparado con las acículas (Tabla 5). De hecho, las piñas mostraron la mitad de estomas (23 estomas/ $\text{mm}^2$ ) comparado con las acículas (52 estomas/ $\text{mm}^2$ ). Por otra parte, la densidad estomática en las piñas disminuyó con el tiempo como consecuencia del crecimiento de la piña (Tabla 5). Además, tal y como se observa en la Figura 3, la disposición de los estomas de las piñas no sigue una pauta regular, a diferencia de las acículas cuya disposición es en hilera a lo largo de la sección longitudinal de la acícula.

Tabla 5. Media de la densidad estomática de piñas adultas y acículas de *P. pinea* a la cosecha en los tratamientos de defoliado (DF), sombreado de la piña con una tela opaca (S), así como sobre los controles.

Densidad estomática ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )					
Tratamiento	N	piña		acícula	
		Inicio crec. piña	Final crec. piña	N	Inicio crec. piña
C	7	23.22	17.07	7	52.45
DF	14	22.27	17.16		
EB				2	50.43
<b>Nivel de significancia</b>					
		0.537	0.95		0.691



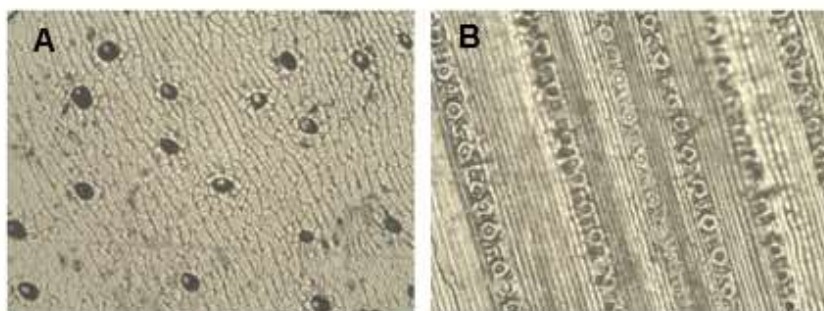


Figura 3. Imagen a través de un microscopio óptico de la superficie de una piña (A) y de una acícula (B), ambas de la especie *P. pinea*. En las dos imágenes se observan células epidérmicas y estomas.

Además, no solo la disposición de los estomas es distinta entre las acículas y la piña, sino que también difieren en su anatomía (Figura 4). En las acículas las células oclusivas se encuentran bien diferenciadas, con las células de guarda, emplazadas en una depresión, bien evidentes, en cambio en las piñas no se observan de forma tan clara (Figura 4) pareciendo más lenticelas (es decir poros que no regulan el intercambio gaseoso). La presencia de ceras epicuticulares alrededor de los estomas de las acículas es evidente, así como en la superficie de las piñas.

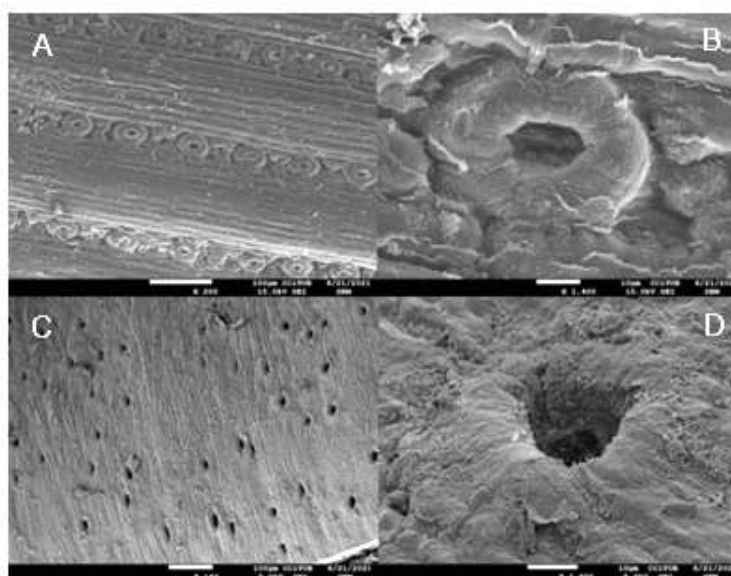


Figura 4. Imagen a través de un microscopio electrónico de barrido de la superficie de una acícula (A) y de una piña (C), ambas de la especie *P. pinea*. Detalle de un estoma de acícula (B) y de una piña (D). Las barras de escala corresponden a 100 μm (A), 10 μm (B), 100 μm (C) y 10 μm (D), respectivamente.

En las acículas, las secciones transversales al microscopio óptico muestran una epidermis formada por células con paredes gruesas fuertemente cutinizadas (Figura 5 derecha) con ceras (también observadas en la Figura 4b) y debajo de las mismas aparece la hipodermis con células de paredes gruesas y lignificadas (Figura 5, derecha). Los estomas son de tipo hundido ya que las células oclusivas se hunden en las células epidérmicas (Fig. 5 derecha), lo que es coherente con las imágenes de la microscopía de barrido (Figura 4b). El mesófilo aparece diferenciado formado por parénquima clorofílico homogéneo en empalizada con pocos espacios intercelulares. Se observa la presencia de cloroplastos, de color azul oscuro, teñidos con azul de metileno. Por debajo del mesófilo se presenta el tejido vascular (el xilema y el floema) rodeado de células de la vaina. En cuanto al corte transversal de la piña, se observan también estomas de tipo hundido y alrededor de las cavidades subestomáticas un tejido parenquimático tipo lagunar (Figura 5 izquierda). El parénquima clorofílico (tejido parenquimático) aparece alrededor de los estomas en las piñas y con

cierta presencia de cloroplastos. Sin embargo, hacia el interior de estos tejidos aparece tejido esclerenquimático.

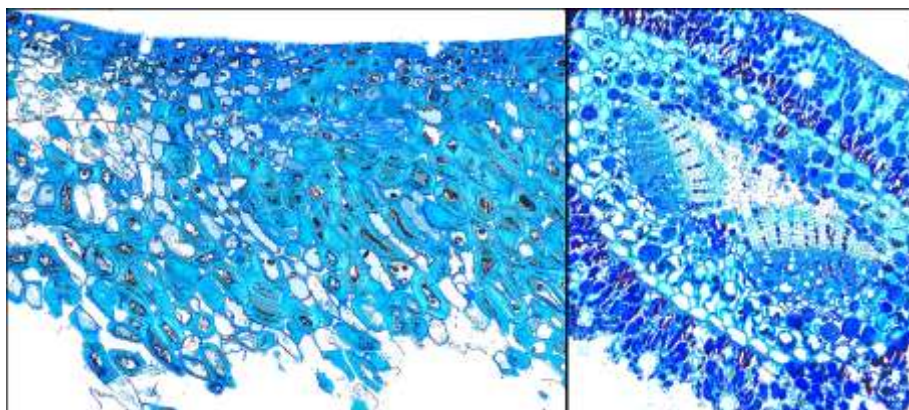


Figura 5. Imágenes al microscopio óptico de secciones transversales de piña (izquierda) y acícula (derecha).

## 5. Discusión

Numerosos estudios han demostrado que la defoliación causada de forma natural por insectos y enfermedades o por el fuego provoca si no la muerte una reducción temporal del crecimiento en diámetro en pinos debido a la pérdida de superficie fotosintética (KULMAN, 1971; CHAMBERS & HENNESSEY, 1986) y en consecuencia del aporte de carbohidratos (EYLES, 2009; JACQUET, 2012). La fotosíntesis activa de las acículas, afecta al crecimiento en diámetro en verano en coníferas así como a la propia elongación de las acículas nuevas (KULMAN, 1971; CHEN, 2002). La mayoría de los estudios se han centrado en las pérdidas causadas por acículas en el crecimiento del árbol y muy pocos en el efecto que estas causan en la producción de piña. En este estudio, en los distintos tratamientos de fuente-sumidero, al limitar la fuente de foto-asimilados que provenía de las acículas (defoliado) disminuyó el crecimiento de la piña, revelando una posible co-limitación de fuente. Al alterar la fuente, es posible que se alterara la asignación de recursos hacia los sumideros. En un estudio llevado a cabo por ERICSSON et al (1980) con *P. sylvestris* donde se defoliaron ramas de la copa, demostraron que existen mecanismos que dan prioridad a la producción de acículas frente al crecimiento del tallo cuando los recursos son escasos. Esto indicaría que, en cada uno de los verticilos, la formación de las acículas y brotes nuevos estarían compitiendo con el desarrollo de los granos en las piñas, lo que explicaría la reducción del peso del piñón observada en este estudio. De hecho, la senescencia de las acículas más antiguas (2020) ocurre a finales de primavera, cuando se retranslocan los nutrientes de forma masiva hacia el crecimiento de tejidos nuevos (nuevas acículas, estróbilos y a la maduración de conos) (MUTKE et al 2012).

Ahora bien, el efecto de la defoliación sobre el llenado de los granos podría estar subestimado ya que en otros estudios, donde se defoliaron ramas, las acículas nuevas, una vez desarrolladas, eran las realmente activas para el crecimiento de los árboles (y por ende para la producción) (CRAIGHEAD, 1940; LINZON, 1958) debido a su mayor eficiencia fotosintética (LINZON, 1958; O'NEIL, 1962). Los resultados preliminares obtenidos en este estudio van en esta dirección y las acículas del 2021 (las nuevas), mostraron una mayor tasa fotosintética que las del 2020 del mismo árbol. Así, aunque se defolió la rama, emergieron nuevas acículas que pudieron haber actuado como una nueva fuente de foto-asimilados, a partir de mediados de verano, para los piñones, y por lo tanto hacer de efecto tampón frente a la eliminación de la fuente inicial, las acículas antiguas. Además, durante el crecimiento de los brotes y follaje nuevos, se segregan hormonas que afectan la producción y aprovechamiento de los fotoasimilados (KOZŁOWSKI & KELLER, 1966). Muchas son las evidencias de que el crecimiento está más estrechamente relacionado con la utilización que con la producción de fotoasimilados, ya que los fotoasimilados almacenados a menudo están presentes,

pero no son utilizables en ausencia de hormonas (KOZLOWSKI & KELLER, 1966). La defoliación de acículas en las coníferas perennes podría causar una pérdida de acumulación de carbohidratos al actuar como órganos de almacenaje junto a las raíces y tronco, y afectar a la producción de reguladores de crecimiento y fotoasimilados (KOZLOWSKI & WINGET, 1964). También, al defoliar una rama, los carbohidratos no estructurales (NSC) almacenados en diferentes partes del árbol, por lo general considerados como una reserva de carbono para energía y biosíntesis, podrían haber mediado en la respuesta al crecimiento de los árboles frente a la defoliación (EYLES et al 2009, PINKARD et al 2011).

Por otro lado, el crecimiento de la piña y su propio peso verde no se vieron afectados por el tratamiento de inhibición de la fotosíntesis de la piña (sombreado). Además, los tratamientos de sombreado no solo no disminuyeron el peso promedio por piñón, sino que lo aumentaron, indicando que no hay una limitación de sumidero, cuantas más piñas existan, más piñas se pueden llenar. No obstante, no ver disminuido el peso del piñón en el tratamiento sombreado, o incluso aumentarlo, podría explicarse porque al sombrear la piña, se está alterando el funcionamiento del propio órgano que es a la vez fuente y sumidero. Al sombrear la piña, es probable que se evitara en parte el aborto de granos provocado por las altas temperaturas del verano (como se ha visto que ocurre en cereales, ej. HAYS ET AL 2007), sesgando los valores reales de la contribución de la fotosíntesis de la piña al llenado de grano. Sin embargo, los valores de fotosíntesis bruta de la piña fueron mucho mayores que los de la fotosíntesis neta de las acículas, lo que sugiere que la piña tiene una tasa de fotosíntesis mucho mayor que la de las acículas indicando que podría existir fijación de CO<sub>2</sub> anapleurótica (no mediada directamente por el sol) o una fijación del CO<sub>2</sub> tipo CAM (LÜTTGE, 2008). En ciertos estadios de su desarrollo se ha observado que los conos de coníferas, fijan cierto CO<sub>2</sub> (PALLARDY, 2008). Sin embargo, en muchos casos, la fotosíntesis de los conos no es suficiente para establecer un equilibrio con la alta producción respiratoria de CO<sub>2</sub> (la presencia de lenticelas demuestra que hay respiración en las piñas), y una gran parte de los carbohidratos requeridos para su crecimiento son obtenidos de otras fuentes (DICKMANN & KOZLOWSKI, 1969; KOZLOWSKI, 1992). En un experimento llevado a cabo por OGAWA (1988) en conos del ciprés Hinoki, la fotosíntesis de los conos compensó poco más de la mitad del CO<sub>2</sub> perdido diariamente por la respiración oscura (OGAWA, 1988), indicando que los conos podrían tener un papel en la fijación del CO<sub>2</sub> pero no la suficiente para refijar todo el CO<sub>2</sub> emitido a través de la respiración.

En el estudio anatómico de la piña, se distinguen estructuras y tejidos fotosintéticos como los estomas, un tejido parenquimático tipo lagunar con presencia de cloroplastos, y un mesófilo. Los cloroplastos, son orgánulos donde ocurre la captura de energía y la fijación del CO<sub>2</sub> y principalmente se observan en las hojas, pero también se han observado en conos de *P. sylvestris* (LINDER & TROENG, 1982). La constatación de la presencia de estas estructuras junto a las altas tasas fotosintéticas obtenidas evidencia que la piña está realizando un eficiente proceso de fotosíntesis. Lo que todavía no se ha vislumbrado es el rol de la piña durante el llenado de los granos de los piñones. Así no se lograron evidencias consistentes de que la fotosíntesis de las piñas actuara como fuente de foto-asimilados, ni que fuera decisiva para el crecimiento de las propias piñas ni tampoco de los piñones. Sin embargo, los valores de la fotosíntesis de la piña se mantuvieron más altos que los de las acículas por unidad de superficie a lo largo del crecimiento de la piña en su tercer año, indicando que debe existir un papel fotosintético aunque no suficiente para refijar todo el CO<sub>2</sub> perdido a través de su propia respiración.

## 6. Conclusiones

Los tratamientos de fuente-sumidero mostraron la posible existencia de una co-limitación de fuente debido a que el peso de los piñones disminuyó en el tratamiento de defoliado. Aunque el tratamiento de sombreado de la piña no disminuyó el peso del piñón, la fotosíntesis bruta de la piña fue marcadamente más elevada que la de las acículas por unidad de superficie. Además, en el

estudio anatómico del tejido de la piña, aparecieron estructuras fotosintéticas propias del metabolismo fotosintético como sería el mesófilo o los cloroplastos, aunque en menor densidad que en las acículas. Estos resultados indican que la piña está realizando la fotosíntesis aunque los resultados no demuestran que esto sea aparentemente a nivel cuantitativo una ventaja para llenar más los granos, ya que el sombreado de la piña no disminuyó el peso de los piñones.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo ha podido realizarse en el marco del proyecto de investigación “MASPINENUT” del Plan Nacional PID2019-107483GB-100 financiado por el MINECO (2020-2024) y se ha cofinanciado por el Gobierno de España (proyecto RTI2018-094691-B-C31, MCIU/AEI/FEDER, UE).

## 8. Bibliografía

ALÍA, R.; GARCÍA DEL BARRIO, J.M.; IGLESIAS, S.; MANCHA, J.A.; DE MIGUEL, J.; NOCOLÁS, J.L.; PÉREZ, F.; SÁNCHEZ, D. (2009). Regiones de Procedencia de Especies Forestales en España. Ed. Ministerio de medio Ambiente y medio Rural, pp. 57.

ARANJUELO, I.; CABRERA-BOSQUET L.; MOTTALEB, S.A.; ARAUS J.L.; NOGUES, S.; (2009) ‘C-13/C-12 isotope labeling to study carbon partitioning and dark respiration in cereals subjected to water stress’, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23(17), pp. 2819–2828. doi:10.1002/rcm.4193.

BERDANIER, A.B.; AND CLARK, J.S. (2016) ‘Divergent reproductive allocation trade-offs with canopy exposure across tree species in temperate forests’, *Ecosphere* [Preprint]. doi:10.1002/ecs2.1313.

CALAMA, R.; GORDO, J.; MUTKE, S.; CONDE, M.; MADRIGAL, G.; GARRIGA, E.; ARIAS, M.J.; PIQUÉ, M.; GANDÍA, R.; MONTERO, G. et al. (2020) ‘Decline in commercial pine nut and kernel yield in mediterranean stone pine (*Pinus pinea* L.) in Spain’, *IForest* [Preprint]. doi:10.3832/ifor3180-013.

CHAMBERS, J.L.; DOUGHERTY, P.M.; HENNESSEY, T.C. (1986) ‘Fire: Its Effects on Growth and Physiological Processes in Conifer Forests’, in. doi:10.1007/978-94-009-4424-4\_9

CHEN, Z.; KOLB, T.E.; CLANCY, K.M. (2002) ‘Effects of artificial and western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) defoliation on growth and biomass allocation of Douglas-fir seedlings.’, *J. Econ. Entomol.* [Preprint]. doi:10.1603/0022-0493-95.3.587.

CRAIGHEAD, F. (1940) ‘Some Effects of Artificial Defoliation on Pine and Larch’, *J. For.* doi:10.1093/jof/38.11.885.

DESPLAND, E.; HOULE, G. (1997) ‘Climate influences on growth and reproduction of *Pinus banksiana* (Pinaceae) at the limit of the species distribution in eastern North America’, *Am. J. Bot.* [Preprint]. doi:10.2307/2446283.

DICKMANN, D.I.; KOZLOWSKI, T.T. (1969) ‘Seasonal Variations in Reserve and Structural Components of *Pinus resinosa* Cones’, *Am. J. Bot.* [Preprint]. doi:10.2307/2440645.



ERICSSON, A.; LARSSON, S.; TENOW, O. (1980) 'Effects of Early and Late Season Defoliation on Growth and Carbohydrate Dynamics in Scots Pine', *J. Appl. Ecol.* [Preprint]. doi:10.2307/2402653.

ESTÉVEZ-GEFFRIAUD, V.; VICENTE R.; VERGARA-DÍAZ, O., NARVÁEZ REINALDO, J.J., TRILLAS, M.I. (2020) 'Application of *Trichoderma asperellum* T34 on maize (*Zea mays*) seeds protects against drought stress', *Planta* [Preprint]. doi:10.1007/s00425-020-03404-3.

EVARISTO, I.; BATISTA, D.; CORREIA, I.; CORREIA, P.; COSTA, R. (2013) 'Chemical profiling of Portuguese *Pinus pinea* L. nuts and comparative analysis with *Pinus koraiensis* Sieb. and *Zucc. commercial kernels*', *Options Méditerranéennes. Séries A Mediterr. Semin.* [Preprint].

EYLES, A., PINKARD, E.A.; MOHAMMED, C. (2009) 'Shifts in biomass and resource allocation patterns following defoliation in *Eucalyptus globulus* growing with varying water and nutrient supplies', *Tree Physiol.* [Preprint]. doi:10.1093/treephys/tpp014.

GHIMIRE, B.; KIM, M.; LEE, J.-H.; HEO, K. (2014) 'Leaf anatomy of *Pinus thunbergii* Parl. (Pinaceae) collected from different regions of Korea', *Korean J. Plant Taxon.* [Preprint]. doi:10.11110/kjpt.2014.44.2.91.

HACKET-PAIN, A.J.; LAGEARD, J.G.A.; THOMAS, P.A. (2017) 'Drought and reproductive effort interact to control growth of a temperate broadleaved tree species (*Fagus sylvatica*)', *Tree Physiol.* [Preprint]. doi:10.1093/treephys/tpx025.

HAYS, D.B.; DO, J.H.; MASON, R.E.; MORGAN, G.; FINLAYSON, S.A. (2007) 'Heat stress induced ethylene production in developing wheat grains induces kernel abortion and increased maturation in a susceptible cultivar', *Plant Sci.* [Preprint]. doi:10.1016/j.plantsci.2007.03.004.

JACQUET, J.S.; ORAZIO, C.; JACTEL, H. (2012) 'Defoliation by processionary moth significantly reduces tree growth: A quantitative review', *Ann. For. Sci.* [Preprint]. doi:10.1007/s13595-012-0209-0.

KELLY, D.; SORK, V.L. (2002) 'Mast seeding in perennial plants: Why, how, where?', *Annu. Rev. Ecol. Syst.* [Preprint]. doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.020602.095433.

KNOPS, J.M.H.; KOENIG, W.D.; CARMEN, W.J. (2007) 'Negative correlation does not imply a tradeoff between growth and reproduction in California oaks', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Preprint]. doi:10.1073/pnas.0704251104.

KOENIG, W.D.; KNOPS, J.M.H. (1998) 'Scale of mast-seeding and tree-ring growth [5]', *Nature* [Preprint]. doi:10.1038/24293.

KOZŁOWSKI, T.T. (1992) 'Carbohydrate sources and sinks in woody plants', *Bot. Rev.* [Preprint]. doi:10.1007/BF02858600.

KOZŁOWSKI, T.T.; KELLER, T. (1966) 'Food relations of woody plants', *Bot. Rev.* [Preprint]. doi:10.1007/BF02858663.

KOZLOWSKI, T.T.; WINGET, C.H. (1964) 'The Role of Reserves in Leaves, Branches, Stems, and Roots on Shoot Growth of Red Pine', *Am. J. Bot.* [Preprint]. doi:10.2307/2440281.

KULMAN, H.M. (1971) 'Effects of Insect Defoliation on Growth and Mortality of Trees', *Annu. Rev. Entomol.* [Preprint]. doi:10.1146/annurev.en.16.010171.001445.

LIN, J.; JACH, M.E.; CEULEMANS, R. (2001) 'Stomatal density and needle anatomy of Scots pine (*Pinus sylvestris*) are affected by elevated CO<sub>2</sub>', *New Phytol.* [Preprint]. doi:10.1046/j.1469-8137.2001.00124.x.

LINDER, S.; TROENG, E. (1982) 'The seasonal course of respiration and photosynthesis in strobili of scots pine', *For. Sci.*, 27(2), pp. 267–276.

LINZON, S.N. (1958) 'The effect of artificial defoliation of various ages of leaves upon white pine growth', *For. Chron.* [Preprint]. doi:10.5558/tfc34051-1.

Loewe, V.M.; Rodríguez, C.D.; Balzarini, M.; Contreras, A.Á.; Navarro-Cerrillo, R.M. (2015) 'Impact of climate and management variables on stone pine (*Pinus pinea* L.) growing in Chile', *Agric. For. Meteorol.* [Preprint]. doi:10.1016/j.agrformet.2015.08.248.

LÜTTGE, U. (2008) 'Crassulacean Acid Metabolism', in eLS. doi:10.1002/9780470015902.a0001296.pub2.

MOLERO, G.; SUKUMARAN, S.; REYNOLDS, M.P. (2014) 'Spike photosynthesis contribution to grain yield and identification of molecular markers: A potential trait for breeding programs?', in Reynolds, M. et al. (eds) *Proc. 4th Int. Work. Wheat Yield Consort.* CENEB, CIMMYT, Cd. Obregón, Sonora, Mexico: CIMMYT, pp. 175–186.

MUTKE, S.; CALAMA, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; MONTERO, G.; GORDO, F.J.; BONO, D., GIL, L. (2012) 'Mediterranean stone pine: Botany and horticulture', *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)*. [Preprint]. doi:10.1002/9781118100592.ch4.

NERGIZ, C.; DÖNMEZ, I. (2004) 'Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds', *Food Chem.* [Preprint]. doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.009.

O'NEIL, L.C. (1962) 'Some effects of artificial defoliation on the growth of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.)', *Can. J. Bot.* [Preprint]. doi:10.1139/b62-026.

OBESO, J.R. (2002) 'The costs of reproduction in plants', *New Phytol.* [Preprint]. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00477.x.

OGAWA, K.; HAGIHARA, A.; HOZUMI, K. (1988) 'Photosynthesis and Respiration in Cones of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*)', *Nihon Ringakkai Shi/Journal Japanese For. Soc.* [Preprint].

PALLARDY, S. (2008) *Physiology of Woody Plants*, *Physiol. Woody Plants*. doi:10.1071/pc980272.



PINKARD, E.A.; EYLES, A.; O'GRADY, A.P. (2011) 'Are gas exchange responses to resource limitation and defoliation linked to source:Sink relationships?', *Plant, Cell Environ.* [Preprint]. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02361.x.

SANTINI, F.; CLIMENT, J.M.; VOLTAS, J. (2019) 'Phenotypic integration and life history strategies among populations of *Pinus halepensis*: An insight through structural equation modelling', *Ann. Bot.* [Preprint]. doi:10.1093/aob/mcz088.

SANTOS-DEL-BLANCO, L.; ALÍA, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C; SAMPEDRO, L.; LARIO, F.; CLIMENT, J.; (2015) 'Correlated genetic effects on reproduction define a domestication syndrome in a forest tree', *Evol. Appl.* [Preprint]. doi:10.1111/eva.12252.

SHESTAKOVA, T.A; MUTKE, S.; GORDO, J.; CAMARERO, J.J.; SIN, E.; PEMÁN, J.; VOLTAS, J. (2021) 'Weather as main driver for masting and stem growth variation in stone pine supports compatible timber and nut co-production', *Agric. For. Meteorol.* [Preprint]. doi:10.1016/j.agrformet.2020.108287.

STABENTHEINER, E.; PFEIFHOFER, H.W.; PETERS, J.; JIMÉNEZ, M.S.; MORALES, D.; GRILL, D. (2004) 'Different surface characteristics of primary and secondary needles of *Pinus canariensis*', *Flora* [Preprint]. doi:10.1078/0367-2530-00138.

STIMSON, H.C.; BRESHEARS, D.D.; USTIN, S.L.; KEFAUVER, S.C. (2005) 'Spectral sensing of foliar water conditions in two co-occurring conifer species: *Pinus edulis* and *Juniperus monosperma*', *Remote Sens. Environ.* [Preprint]. doi:10.1016/j.rse.2004.12.007.