



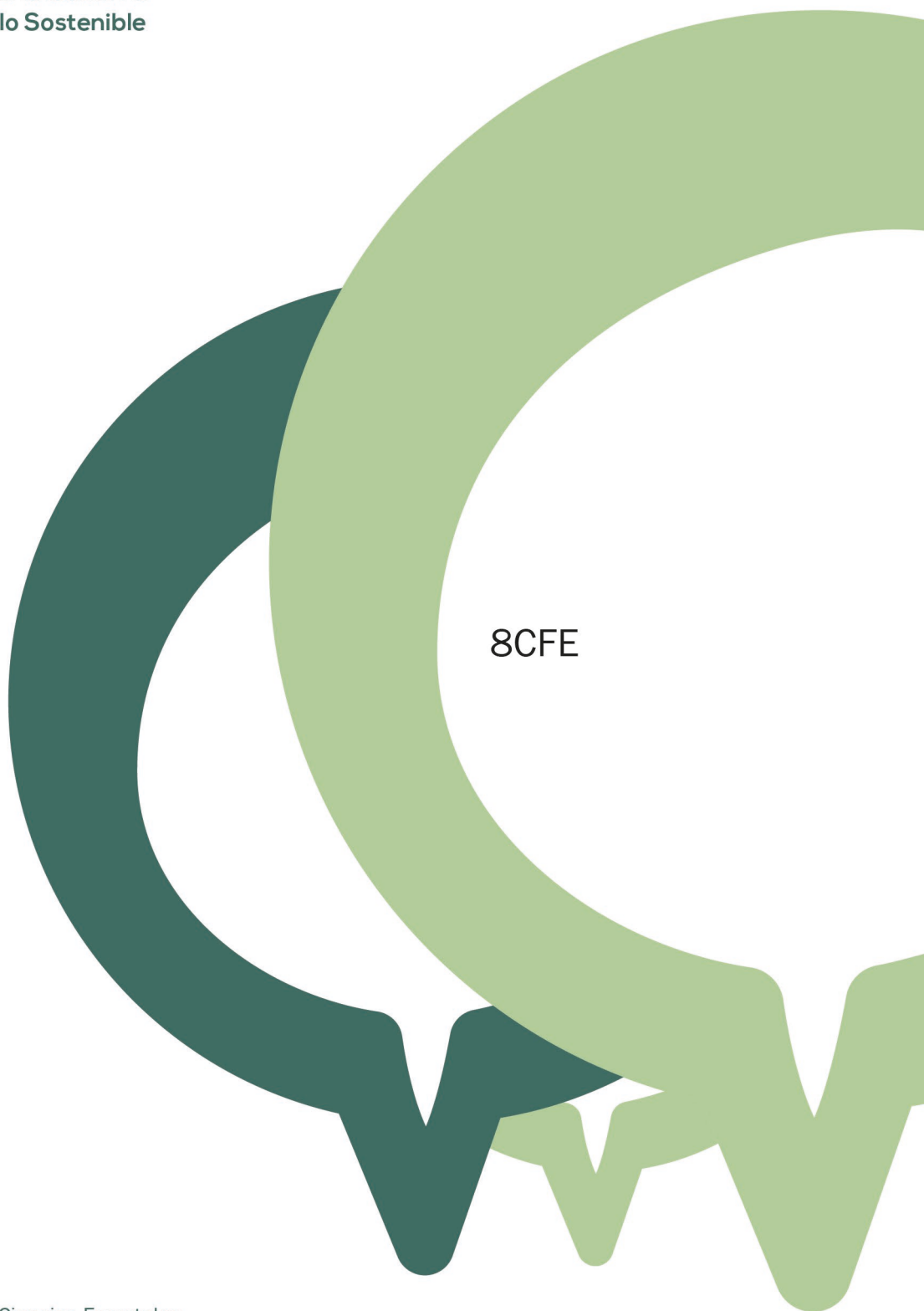
2022  
Lleida

27·1  
junio · juny  
julio · 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



## Uso del Georadar como herramienta de fenotipado del sistema radical de especies forestales

LOMBARDI, E.<sup>1,2</sup>, FERRIO J.P.<sup>3,4</sup>, RODRÍGUEZ-ROBLES, U.<sup>5</sup>, RESCO DE DIOS, V.<sup>1,2,6</sup> y VOLTAS, J.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Joint Research Unit CTFC – AGROTECNIO – CERCA, Av. Alcalde Rovira Roure 191, Lleida E-25198, España.

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Av. Alcalde Rovira Roure 191, Lleida E-25198, España.

<sup>3</sup>Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID), E-50018, Zaragoza, España.

<sup>4</sup>Unidad de Recursos Forestales, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana 930, E-50059, Zaragoza, España.

<sup>5</sup>Departamento de Ecología y Recursos Naturales. Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara, Autlán de Navarro, México.

<sup>6</sup>School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, 59 Qinglong Ave., Mianyang 621010, China.

### Resumen

La sequía es un factor clave que modela los ecosistemas forestales mediterráneos y que influye en las características funcionales de sus especies. A pesar de la importancia del sistema radical para proporcionar un adecuado estado hídrico a árboles y arbustos, la variabilidad inter e intraespecífica en la morfología de raíces se encuentra todavía muy poco estudiada, en particular en individuos adultos debido a dificultades intrínsecas de su caracterización. El objetivo de este estudio fue determinar la aplicabilidad de un dispositivo no invasivo ampliamente utilizado en geofísica como es el Georadar (más conocido como GPR, *Ground Penetrating Radar*) para investigar la variabilidad intraespecífica de atributos morfológicos (profundidad, diámetro y abundancia de raíces) en relación al crecimiento en altura en *P. halepensis*. El estudio se realizó en un ensayo de procedencias localizado en Altura (Castellón). Se encontraron diferencias genéticas en las ratios o proporciones entre los distintos atributos morfológicos y el crecimiento aéreo del árbol, que se relacionaron con diversas condiciones eco-geográficas en origen de las poblaciones representadas. Se concluyó que el Georadar es una herramienta válida para el fenotipado de alto rendimiento del sistema radical en ensayos genéticos forestales, permitiendo inferir diferencias en asignación de recursos a raíces y parte aérea y su relación con las características ecogeográficas en origen de los materiales ensayados.

### Palabras clave

*Ground Penetrating Radar*, *P. halepensis*, morfología de raíces, variabilidad intraespecífica.

### 1. Introducción

Los bosques mediterráneos se encuentran progresivamente afectados por el cambio climático, que origina un aumento paulatino de las temperaturas y un incremento de la incidencia de la sequía (Sardans y Peñuelas 2013, Field et al. 2014). Los árboles presentan diferentes estrategias para responder a estas modificaciones ambientales, entre las cuales se encuentran el desarrollo de un sistema radical que les permite una adecuada absorción de agua durante todo el año (Hernandez et al. 2010). Muchas características estructurales relacionadas con la absorción de agua, tales como la anatomía de la xilema subterráneo, están influenciada por el diámetro y la profundidad de las raíces (Wang et al. 2015). Por tanto, la morfología de las raíces es importante al objeto de mantener un adecuado estado hídrico del individuo (Andivia et al. 2019). Aunque los sistemas radicales juegan un papel relevante en la absorción del agua, todavía están pocos analizados y descritos en la literatura debido a dificultades de monitoreo y muestreo, especialmente en condiciones naturales (Alani y Lantini 2020) dado que la mayoría de los métodos disponibles son destructivos y no repetibles (Krainyukoy y Lyaksa 2016).

El Georadar (o *Ground Penetrating Radar*, GPR) es una herramienta geofísica que en la última década se ha utilizado también para la detección de raíces (Lorenzo et al. 2010; Guo et al. 2013a). Básicamente, el GPR transmite impulsos electromagnéticos y registra el impulso reflejado mediante una antena. El tiempo y la amplitud de la señal registrada permiten estimar la posición y también la medida del objeto identificado (Butnor et al. 2001). Esta herramienta puede estimar la presencia (abundancia), la posición (profundidad) y el tamaño (diámetro) de las raíces gruesas, ya que éstas, al contener agua, presentan una permitividad dieléctrica diferente en comparación a la propia del suelo y, por lo tanto, el GPR recibe una señal de retorno inducida por reflejos hiperbólicos que queda registrada en radargramas (Hirano et al. 2012; Wu et al. 2014).

*P. halepensis* Mill. (pino carrasco) es una conífera que tiene una amplia distribución en el área mediterránea (Vennetier et al. 2018), ocupando nichos ecológicos muy diferentes que comprenden desde ambientes méxicos hasta xéricos. Esto es debido a su elevada variabilidad intraespecífica que involucra rasgos adaptativos relacionados con el crecimiento (Esteban et al. 2010; Patsiou et al. 2020), la reproducción (Climent et al. 2008) o el uso del recurso hídrico (Voltas et al. 2015). El pino carrasco se considera como una especie tolerante a la sequía y su sistema radical relativamente desarrollado y profundo está relacionado con la capacidad de la especie para hacer frente a temporadas de sequía prolongada (Voltas et al. 2015; Andivia et al. 2019), dado que una gran inversión en raíces a menudo se relaciona con una mayor supervivencia bajo estrés hídrico (Matias et al. 2014).

En este trabajo aplicamos el GPR como herramienta de fenotipado para detectar raíces en un ensayo de procedencias de pino carrasco ubicado en Altura (Castellón), donde las poblaciones evaluadas son representativas de la distribución natural de la especie. Se analizó la relación entre morfología de raíces (diámetro, profundidad y abundancia) y altura de los árboles, para así evaluar la naturaleza de la diferenciación intraespecífica en inversión en crecimiento subterráneo respecto al crecimiento aéreo. Además, con el fin de detectar mecanismos adaptativos se calcularon correlaciones entre dichas relaciones y el clima en origen de las poblaciones. En particular, se hipotetizó que el pino carrasco presenta variabilidad intraespecífica en inversión de raíces con respecto a su altura, y que las diferencias en asignación de recursos a la parte subterránea o la parte aérea del individuo están relacionadas con el clima en origen de cada población, reflejando así un mecanismo adaptativo asociado con el uso de recursos hídricos.

## 2. Objetivos

Los objetivos del presente estudio fueron: a) Examinar el uso del GPR como herramienta de fenotipado de alto rendimiento con objeto de detectar diferencias genéticas en inversión en raíces en pino carrasco; b) Evaluar las posibles diferencias existentes entre inversión en crecimiento subterráneo y en crecimiento aéreo a nivel intraespecífico en la especie; y c) Describir las relaciones existentes entre la inversión relativa de recursos en el sistema radical del árbol y el clima en origen de las poblaciones.

## 3. Metodología

En este estudio se utilizaron 56 poblaciones de pino carrasco originarias de diferentes partes de la cuenca mediterránea. Estas poblaciones son representativas de la mayor parte del rango de distribución actual de la especie (Fig. 1). En 1995 se recolectaron semillas de 20 a 30 individuos adultos por población espaciados al menos 100 m, y se sembraron en un vivero forestal al año siguiente. En 1997, se trasplantaron 896 plántulas de un año (16 plántulas por población) al sitio de estudio (ensayo de procedencias), que se encuentra en Altura, provincia de Castellón (39° 49' 29" N, 00° 34' 22" W, 640 m sobre el nivel del mar).

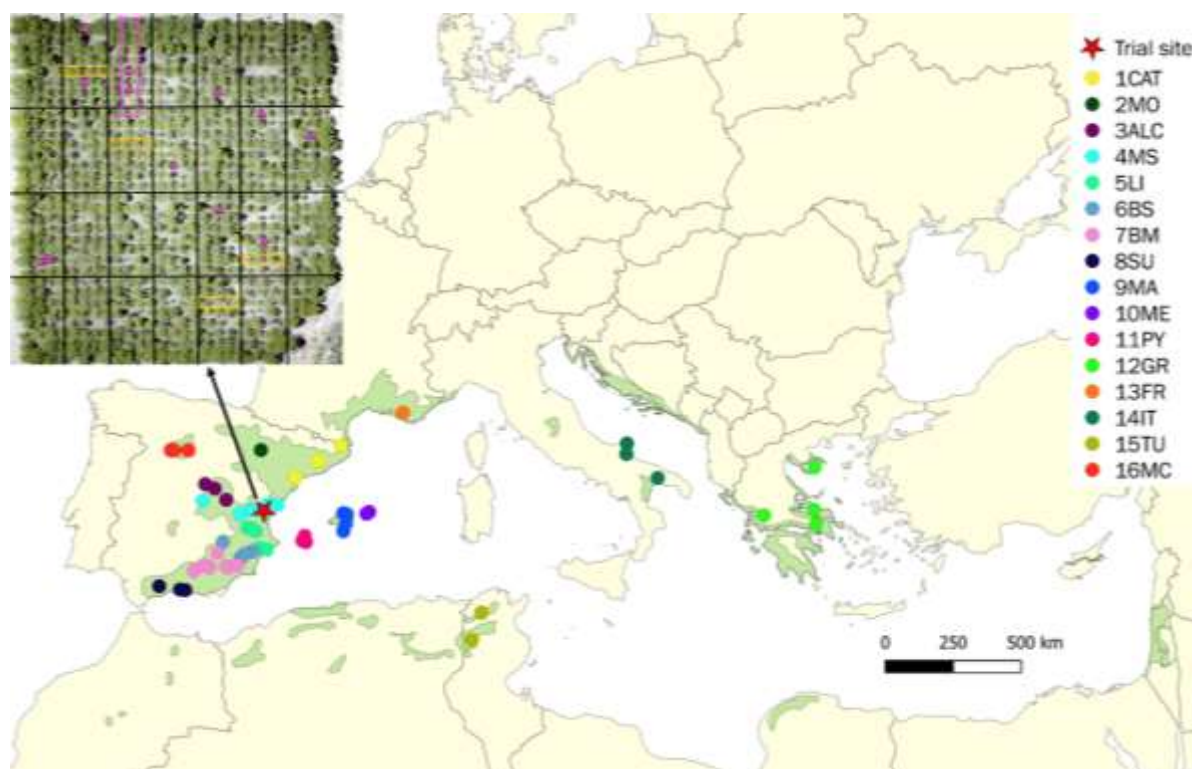


Figura 1. Origen geográfico de 56 poblaciones de *Pinus halepensis* (puntos de colores) evaluadas en un ensayo genético (estrella roja) ubicado en Altura (provincia de Castellón, España). La leyenda muestra los códigos de ecotipos tal y como se definen en la Tabla 1. El área verde representa la distribución natural de *P. halepensis* según EUFORGEN (<http://www.euforgen.org/species/pinus-halepensis/>). Se incluye una foto aérea del ensayo genético. Los rectángulos naranjas ejemplifican cuatro unidades experimentales compuestas por cuatro individuos, cada uno de los cuales pertenece a la misma población y se repite en cuatro bloques. Los triángulos morados indican la posición de las 12 raíces excavadas, mientras que el rectángulo morado indica la sección del perfil representada en la Fig.2c

El diseño experimental consistió en un diseño de filas y columnas latinizado con cuatro bloques (John y Williams, 1998). El espaciamiento entre árboles consecutivos a distancias entre filas o columnas fue de 2,5 m. Cada fila estaba compuesta por siete unidades experimentales o parcelas formadas cada una por cuatro árboles de la misma procedencia. El diseño de fila-columna latinizado permitió controlar de manera eficiente la variabilidad inherente dentro del sitio de ensayo, tal como cambios sistemáticos en la dirección de la columna o de la fila que se incorporaron en los modelos matemáticos ajustados. Las poblaciones fueron agrupadas en 16 regiones ecológicas de acuerdo al trabajo de Climent et al. (2008). El sitio es representativo del clima medio del rango de distribución de la especie, con una temperatura media anual de 13,8 °C y una precipitación media anual de 468 mm (Patsiou et al. 2020) (Tabla 1).

Se tomaron medidas de altura y diámetro a 1,3 m en el año 2013 para todos los árboles. Para cada población, los datos climáticos en origen para el período 1970-2000 se obtuvieron de la base de datos WorldClim (Fick e Hijmans, 2017) con una resolución espacial de 1 km<sup>2</sup>. Se eligieron las siguientes variables climáticas, basadas en estudios previos sobre los condicionantes climáticos de variación ecotípica en los pinos mediterráneos (Climent et al.2008; Tapias et al.2004): temperatura media anual (MAT), rango diurno medio (MDR), rango anual de temperatura (TAR;  $T_{max}-T_{min}$ ), proporción entre MDR y TAR (ISO), precipitación media anual (MAP), precipitación del trimestre más húmedo (PQH), precipitación del trimestre más seco (PQS), y relación precipitación de verano respecto a precipitación anual (PsP).

Tabla 1. Características de las 56 poblaciones de pino carrasco agrupadas en 16 ecotipos (o regiones ecológicas) utilizadas en este estudio.

Población	Ecotipo	País	Altitud	MAT (°C)	MAP (mm)	PsP (%)
Cabanelles	1CAT	España	258	14.6	720	22
Tivissa	1CAT	España	336	14.8	587	21
Sant Salvador Guardiola	1CAT	España	318	14.4	628	26
Zuera	2MO	España	576	12	474	21
Valdeconcha	3ALC	España	837	12.8	433	14
Alcantud	3ALC	España	1057	10.8	505	19
Colmenar de Oreja	3ALC	España	692	13.7	433	11
Cirat	4MS	España	445	14.6	440	21
Tuéar	4MS	España	729	13.2	424	20
Enguidanos	4MS	España	990	11.9	485	19
Altura	4MS	España	662	13.1	546	16
Benicàssim	4MS	España	468	13.8	472	21
Gilet	4MS	España	152	13.1	462	17
Tibi	5LI	España	976	14.8	428	17
Villa de Ves	5LI	España	864	14.7	454	18
Jarafuel	5LI	España	563	15.2	386	17
Bicorp	5LI	España	587	14.7	523	21
Commercial Seed	5LI	España		16.6	451	20
Villajoyosa	6BS	España	126	17.7	422	15
Ricote	6BS	España	688	14.8	398	14
Monovar	6BS	España	820	14	467	15
Monovar	6BS	España	601	15.1	416	15
Paterna	6BS	España	1028	12.8	470	13
Abarán	6BS	España	657	14.9	403	15
Quéntar	7BM	España	1226	12.8	578	7
Benamaurel	7BM	España	908	14.2	452	10
Vélez Blanco	7BM	España	785	14.1	416	12
Santiago de la Espada	7BM	España	842	14.1	432	11
Lorca	7BM	España	831	14.1	427	13
Alhama de Murcia	7BM	España	765	15	449	9

Quesada	7BM	España	757	15.1	373	12
Lentergi	8SU	España	363	16.7	378	4
Carratraca	8SU	España	635	15.4	695	4
Frigiliana	8SU	España	595	15.7	456	4
Palma de Mallorca	9MA	España	32	16.7	563	14
Santanyí	9MA	España	19	16.8	568	14
Alcudia	9MA	España	185	15.7	704	15
Calvia	9MA	España	243	15.8	526	17
Marcadal	10ME	España	85	16.6	613	15
Atàlix	10ME	España	67	16.9	608	15
Cala d'Hort	11PY	España	329	15.9	542	16
Ses Salines	11PY	España	10	17.5	443	16
Ses Salandres	11PY	España	65	17.1	467	17
Istaia-eyboia	12GR	Grecia	53	17.5	506	7
Amfilohia (likely seed orchard)	12GR	Grecia	429	14.2	975	7
Tatoi-attica	12GR	Grecia	253	16.3	552	7
Kassandra	12GR	Grecia	402	14.4	510	13
Gemenos	13FR	Francia	391	12.4	707	14
Litorale Tarantino	14IT	Italia	204	15.2	551	14
Gargano Monte Pucci	14IT	Italia	382	14.2	524	17
Gargano Marzini	14IT	Italia	0	16.1	472	16
Thala	15TU	Túnez	948	14.9	467	13
Tabarka	15TU	Túnez	287	17.7	558	9
Valbuena de Duero	16MC	España	825			
Vega de Valdetronco	16MC	España	820			
Villavieja Tordesillas	16MC	España	820			

El Georadar (GPR) es un dispositivo de detección geofísica que utiliza ondas electromagnéticas para identificar anomalías subterráneas. Las señales parciales se reflejan mediante un cambio en el dieléctrico. Los datos recolectados en tiempo real pueden manipularse para proporcionar una estimación del número (frecuencia), profundidad y diámetro de raíces gruesas en el subsuelo (Barton et al. 2004). Los registros de GPR se obtuvieron en un único día a mediados de junio de 2015, cuando los árboles tenían 19 años de edad, y se estimó el número, la profundidad y el diámetro de las raíces gruesas utilizando un GPR modelo MALÅ RAMAC X3M GPR (MALÅ Geoscience AB, Suecia) equipado con una antena blindada de 800 MHz acoplada a un dispositivo móvil. Se utilizó esta



antena en particular porque se ha demostrado que proporciona la mejor resolución posible en suelos calcáreos (Rodríguez-Robles et al. 2017), que son característicos del sitio de estudio. En particular, se pudieron identificar raíces que alcanzaron una profundidad de ca. 0,9 m dentro de las fracturas petrocálcicas debajo de la capa inferior del suelo de 40 cm, y raíces con un diámetro igual o superior a 2 cm. Las mediciones de GPR se tomaron continuamente a lo largo de tres perfiles lineales (P1, P2, P3) siguiendo la dirección de la columna del ensayo (Fig. 2a, b). Los perfiles se trazaron entre los dos árboles centrales de cada unidad experimental, a una distancia de aproximadamente 0,30 m del tronco principal de uno (P1) u otro árbol (P3), y también a medio camino (1,25 m) entre ambos árboles (P2). Para asignar cada raíz detectada a una unidad experimental particular, la posición de los árboles a lo largo de cada perfil lineal se registró manualmente en el Monitor RAMAC XV implementado en el GPR junto con las mediciones del GPR. Con esta información, los datos relevantes pudieron recuperarse a nivel de parcela en el perfil (subsección "Procesamiento de datos GPR") (Figura 2c).

Las raíces gruesas se identificaron mediante hipérbolas en los radargramas. Los radargramas se examinaron a través del software RadExplorer v1.42 (MALÅ Geoscience AB, Suecia), tras la inspección visual de las hipérbolas ("datos manuales"), lo que permitió determinar tendencias en la distribución lineal de raíces a lo largo de los perfiles lineales. En base a esta información preliminar, se creó un segundo conjunto de datos en RadExplorer utilizando un procedimiento de detección integrado a lo largo de las parcelas predefinidas ("datos automáticos"), que se sometió a un proceso de eliminación de ruido para corregir la posición de los objetos (stolt Función de migración FK) y las bandas paralelas o de baja frecuencia (función de filtro de eliminación de fondo) (ver Rodríguez-Robles et al. 2017, para más detalles). Este procedimiento no permitió una evaluación caso por caso de las hipérbolas; sin embargo, fue capaz de detectar un mayor número de raíces, quedando libre de la subjetividad de que adolece la inspección visual de los radargramas. Por tanto, fue el procedimiento utilizado para los análisis, permitiendo una aproximación más robusta. El conjunto de datos automático se generó para tres sub-parcelas de diferentes tamaños, con diferentes longitudes de 50, 100 y 250 cm (en adelante  $S_{50}$ ,  $S_{100}$  y  $S_{250}$  sub-parcelas, respectivamente; Figura 2d). Además de los filtros de pre-procesamiento se realizó una calibración *in situ* midiendo la profundidad y el diámetro de 12 raíces gruesas. Las raíces gruesas se excavaron debajo de los perfiles lineales (P1, P2, P3) en diferentes unidades experimentales a lo largo del ensayo. A continuación, la profundidad y el diámetro de la raíz se estimaron mediante GPR a través del denominado "intervalo de tiempo entre el cruce por cero" (Rodríguez-Robles et al. 2017; Guo et al. 2013a; Tanikawa et al. 2013). El intervalo de tiempo entre el cruce por cero es el tiempo transcurrido entre la emisión de la señal y el registro de la antena blindada, que se ajusta manualmente al tiempo cero antes de procesar los datos para establecer así el instante en que la señal del radar es emitida por la antena. Se aplicó una regresión lineal entre el diámetro de la raíz medido *in situ* y el intervalo de tiempo entre el cruce por cero, y la ecuación resultante se utilizó para la calibración del diámetro de la raíz (Rodríguez-Robles et al. 2017). Además, como validación indirecta, comparamos la información obtenida a través de las mediciones de GPR con estimaciones de la contribución relativa de dos capas de suelo consecutivas (0-15 cm, parte superior del suelo; 15-40 cm, parte inferior del suelo) a la cantidad total de agua absorbida por las diferentes poblaciones, según se infiere a través del análisis de la composición isotópica ( $\delta^{18}O$ ) del agua del suelo y de la xilema en 2010 (datos obtenidos de Voltas et al. [2015]).

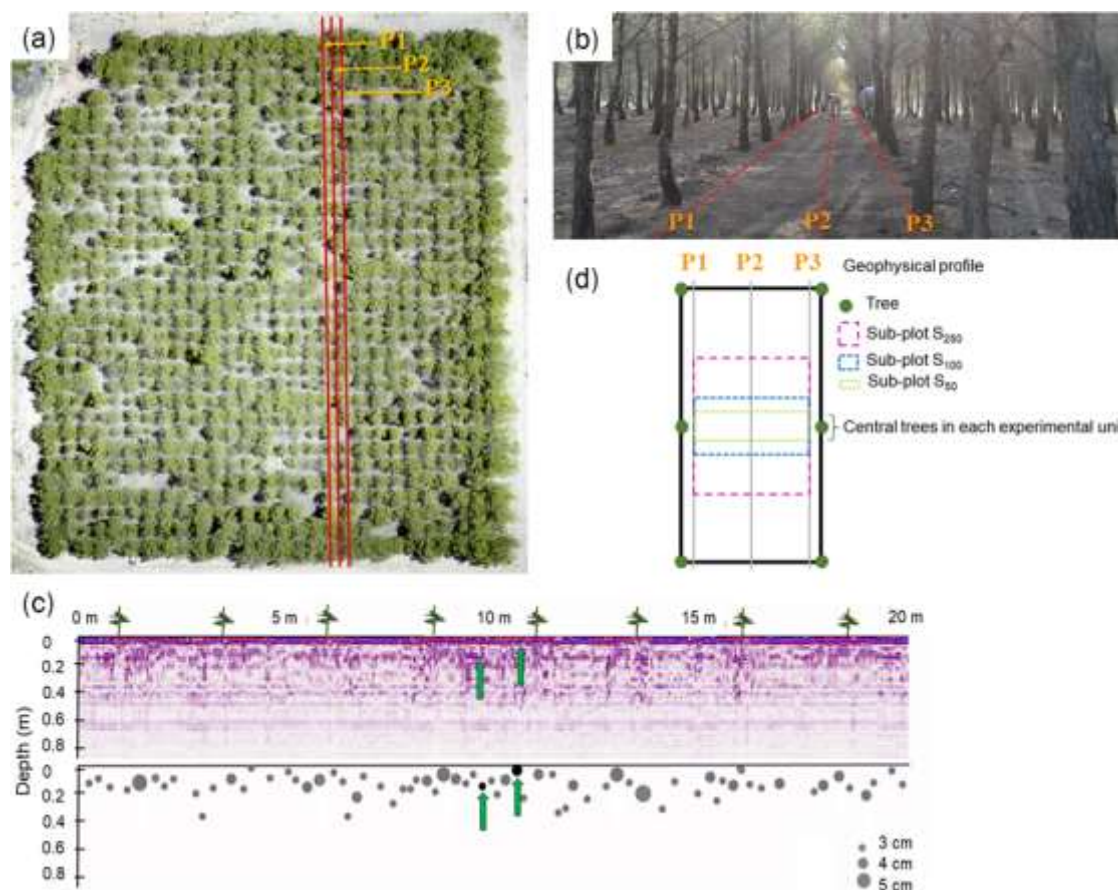


Figura 2. a) Imagen aérea del sitio de estudio que ejemplifica los tres perfiles GPR geofísicos (P1, P2, P3) utilizados a nivel de parcela siguiendo la dirección de la columna del ensayo genético de *P. halepensis*. Las mediciones se realizaron entre los dos árboles centrales de cada parcela (unidad experimental). b) Vista detallada de los perfiles geofísicos de GPR: P1 y P3 están a una distancia de fila de 0,30 m de uno u otro árbol central, mientras que la posición de P2 está a media distancia (1,25 m) entre árboles centrales. c) Ejemplo de detección de raíces a lo largo de una sección de perfil lineal de la prueba (marcada en la Figura S1) usando un radar de penetración terrestre (GPR). El radargrama GPR se generó con una antena blindada de 800 MHz y filtros de paso de banda para eliminar el ruido de baja y alta frecuencia (Rodríguez-Robles et al. 2017). El panel superior muestra reflejos de forma hiperbólica que representan reflejos de raíz (hipérbola de color púrpura oscuro). El panel inferior ilustra las raíces detectadas a partir de las firmas de hipérbola (puntos grises), y las raíces adicionales medidas in situ con fines de calibración se representan mediante puntos negros. d) Esquema (vista superior) que muestra los perfiles geofísicos y las tres diferentes áreas de sub-parcelas ("Sub-plot" S<sub>50</sub>, S<sub>100</sub>, S<sub>250</sub>) evaluadas, donde las sub-parcelas corresponden a distancias de columna de  $\pm 0.25$  m,  $\pm 0.50$  y  $\pm 1.25$  m, respectivamente, de los dos árboles centrales de una unidad experimental.

La definición de un tamaño de sub-parcela adecuado es importante para la detección óptima de raíces basada en GPR en ensayos experimentales. Si bien el uso de un tamaño de sub-parcela demasiado grande podría capturar las raíces gruesas de los árboles de unidades experimentales adyacentes, una sub-parcela demasiado pequeña podría subestimar el número real de raíces gruesas de cada unidad. Para manejar este problema, se evaluó la variabilidad en el número de raíces (frecuencia) en función de la distancia lineal desde el tronco a lo largo de los perfiles antes mencionados. En general, se encontró un alto número de raíces a distancias pequeñas y medianas, seguido de una disminución progresiva en el número de raíces y un aumento repentino después de cierta distancia, lo que denota superposición con raíces de árboles vecinos (ver Resultados).

Para cada árbol se calcularon ratios entre los caracteres diámetro, profundidad o frecuencia de raíces y la altura del árbol (denominados D:H, P:H, y F:H, respectivamente). A estos datos se les aplicó un análisis de la varianza (ANOVA), en la cual la sub-parcela definida como óptima fue la que maximizó el valor F para las diferencias de población en los ANOVA para las diferentes ratios. El



ANOVA incluyó bloque, columna y población como efectos fijos, mientras que la interacción fila dentro de bloque y columna por bloque se definieron como efectos aleatorios para capturar la variabilidad sistemática del sitio del ensayo. Los ANOVA de efectos mixtos se ampliaron para testar la estructura ecotípica en los caracteres de las raíces. Las medias de mínimos cuadrados de la población (o ecotipo) de D:H, P:H, y F:H se utilizaron para ajustar correlaciones en función de las condiciones climáticas de cada población (o ecotipo) en su origen. También se ajustaron correlaciones de los caracteres de las raíces en relación a las distancias geográficas euclídeas y las distancias climáticas (o distancias de Gower) de cada población (o ecotipo) desde el sitio del ensayo. Las distancias de Gower indican diferencias entre entidades, en este caso diferencias climáticas entre poblaciones (ecotipos) en el origen y en el sitio del ensayo, y se calcularon de acuerdo a Rutter y Fenster (2007):

$$GD = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p \frac{|A_i - B_i|}{r_i}$$

Donde  $p$  es el número de variables climáticas,  $A_i$  y  $B_i$  son los valores de cada variable climática (MAT, TAR, MAP, PsP) en el sitio A (ensayo) y B (origen de población o ecotipo), y  $r_i$  es el rango de cada variable climática en el conjunto de datos.

#### 4. Resultados

Las mediciones manuales del diámetro de la raíz mostraron una correlación positiva ( $r = 0,95$ ;  $p < 0,001$ ) con los registros de GPR. La profundidad de la raíz medida manualmente y estimada por GPR también mostró una asociación positiva ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) (resultados no mostrados). Tras la inspección visual de los radargramas, detectamos el mayor número de raíces a distancias entre 10 cm y 50 cm de cada tronco a lo largo de la dirección de la columna, con una disminución progresiva a mayores distancias. Sin embargo, el número de raíces detectadas aumentó nuevamente a partir de 1 m de distancia de cada árbol. Esta observación sugirió que el GPR estaba detectando raíces correspondientes a árboles de unidades experimentales adyacentes para distancias superiores a 90 cm de cada árbol. Esto se confirmó mediante análisis de varianza llevados a cabo en el conjunto de datos automático para tres tamaños de sub-parcelas diferentes ( $S_{50}$ ,  $S_{100}$ ,  $S_{250}$ ). En particular, los resultados mostraron que el tamaño de la sub-parcela que maximizó la diferenciación poblacional en los caracteres de las raíces fue  $S_{100}$  (Tabla 2). Por tanto, los análisis posteriores se realizaron para  $S_{100}$ . A nivel de sub-parcela ( $S_{100}$ ), las estimaciones de GPR de caracteres de raíces gruesas variaron entre 3,0 cm y 5,0 cm (diámetro), entre 14,7 cm y 44,3 cm (profundidad) y entre 3 y 19 raíces (frecuencia).

La calibración indirecta con los registros de isótopos de agua de la xilema obtenidos en 2010 para el mismo ensayo mostró correlaciones negativas significativas entre el diámetro o la profundidad de la raíz gruesa y el  $\delta^{18}O$  del agua de la xilema a principios de otoño ( $r = 0,62$ ,  $p < 0,001$  y  $r = 0,50$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente), pero no en verano (mediados de julio) ( $p > 0,10$ ). Sin embargo, esta asociación no fue significativa para la frecuencia de las raíces.

Tabla 2. Análisis del modelo de efectos mixtos de la varianza para las ratios entre diámetro de la raíz, profundidad de la raíz o frecuencia de la raíz (número de raíces) y altura (D:H; P:H; F:H; respectivamente) de 56 poblaciones de pino carrasco clasificadas en 16 ecotipos evaluados en un ensayo genético en Altura (España). Los datos se refieren a la sub-parcela  $S_{100}$ . Solo se muestran los efectos fijos.

	Df	D:H			P:H			F:H		
		DfDen	F Ratio	P > F	DfDen	F Ratio	P > F	DfDen	F Ratio	P > F
<b>Bloque</b>	2	7.55	2.696	0.131	9.8	0.508	0.61 7	8.595	2.959	0.105
<b>Columna</b>	6	11.94	3.625	<b>0.028</b>	12.73	1.989	0.14	12.06	1.600	0.229

							2			
<b>Poblacion [Pop]</b>	55	87.23	2.162	<b>&lt;0.001</b>	91.54	1.584	<b>0.026</b>	89.84	1.709	<b>0.012</b>
<b>Bloque</b>	2	7.55	2.696	0.131	9.8	0.508	0.617	8.595	2.959	0.105
<b>Columna</b>	6	11.94	3.625	<b>0.028</b>	12.73	1.989	0.142	12.06	1.600	0.229
<b>Pop (Ecotipo)</b>	40	91.63	1.392	0.099	93.44	1.212	0.223	92.75	1.272	0.172
<b>Ecotipo</b>	15	96.05	3.953	<b>&lt;0.001</b>	94.48	2.647	<b>0.002</b>	94.94	2.879	<b>&lt;0.001</b>

Se observó diferenciación significativa para las tres ratios examinados (D:H; P:H; F:H) tanto entre poblaciones ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,023$  y  $p = 0,012$ , respectivamente) como ecotipos ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). Estos resultados sugirieron una marcada estructura ecotípica (Tabla 2). Las ratios entre caracteres radicales y la altura del árbol se relacionaron con algunas variables geográficas y climáticas en el origen de las poblaciones (Tabla 3). A nivel poblacional las tres ratios analizadas presentaron una estructura geográfica clara, presentando una correlación negativa significativa con la longitud y marginalmente significativa con la latitud (excepto P:H) (Tabla 3a; Figura 3a, c, d, e, f). Por otro lado, P:H resultó tener una correlación significativa con la distancia geográfica (DGeo). Estos resultados sugirieron diferencias en la inversión a recursos subterráneos o aéreos entre las poblaciones ubicadas cerca del sitio del ensayo (es decir, la distribución más occidental de pino carrasco) y las de la cuenca del Mediterráneo oriental. Sin embargo, esta estructura geográfica desapareció casi por completo al agrupar las poblaciones en ecotipos, donde solo F:H resultó significativamente correlacionada con la latitud (negativamente) (Fig. 3c) y la distancia de Gower (positivamente), lo que indicó que los ecotipos con clima más similar al sitio del ensayo invirtieron menos recursos en raíces (en términos de una menor abundancia de las mismas) (Tabla 3b).

A nivel poblacional las tres ratios analizadas mostraron dependencias positivas con el rango diurno medio de temperatura (MDR), con el rango anual (TAR) (Fig. 3g, h, i), y con la proporción entre MDR y TAR (ISO), mientras que no presentaron relación con la temperatura media anual (MAT) (Tabla 3a). La precipitación anual (MAP) tampoco se relacionó con ninguna de las ratios, mientras que D:H mostró una correlación negativa con el trimestre más húmedo y con el más seco (marginalmente significativa), así como también F:H, que mostró el mismo tipo de asociación con este último factor climático (Tabla 3a).

A nivel ecotípico las correlaciones entre las ratios analizados y el clima en origen siguieron un patrón similar al observado a nivel de población, con la diferencia que P:H no resultó asociado a la isothermalidad, pero sí se mostró negativamente correlacionado con el trimestre más húmedo (Fig. 3k). Por otra parte, el trimestre más seco no mostró relación significativa con ninguno de las ratios (Tabla 3b).

Tabla 3. Coeficientes de correlación ( $r$ ) entre las ratios de caracteres de raíces (diámetro, profundidad, frecuencia) y altura del árbol (D:H; P:H y F:H; respectivamente) a nivel de población (a) y ecotipo (b) y varias variables ecogeográficas en origen de 53 poblaciones agrupadas en 15 ecotipos de pino carrasco (el ecotipo 16 corresponde a reforestaciones de la Meseta Norte (España) de origen geográfico incierto y por lo tanto no ha sido incluido en el análisis). Las probabilidades comprendidas entre 0,10 y 0,05 se representan en cursiva, mientras que las probabilidades significativas ( $<0,05$ ) se muestran en negrita. DGower = distancia de Gower; DGeo = distancia geográfica; MDR = rango de temperatura diurno; ISO = isotermalidad; MAT = temperatura media anual; TAR = rango anual de temperatura; MAP = precipitación media anual; PQH = precipitación del trimestre más húmedo; PQS = precipitación del trimestre más seco; PsP = relación entre precipitación de verano y precipitación anual.

Poblaciones											
Latitud	Longitud	DGower	DGeo	MDR	ISO	MAT	TAR	MAP	PQH	PQS	PsP
-0.28 <b>(0.039)</b>	-0.29 <b>(0.034)</b>	0.16 (0.241)	-0.19 (0.153)	0.42 <b>(0.002)</b>	0.30 <b>(0.029)</b>	-0.11 (0.447)	0.41 <b>(0.002)</b>	-0.21 (0.130)	<b>-0.29</b> <b>(0.033)</b>	-0.27 (0.054)	0.08 (0.545)
-0.19 (0.167)	-0.35 <b>(0.010)</b>	0.03 (0.815)	-0.31 <b>(0.022)</b>	0.40 <b>(0.003)</b>	0.35 <b>(0.010)</b>	-0.15 (0.270)	0.36 <b>(0.008)</b>	-0.16 (0.251)	-0.23 (0.099)	-0.12 (0.392)	-0.123 (0.378)
-0.46 <b>(&lt;0.001)</b>	-0.31 <b>(0.023)</b>	0.15 (0.273)	-0.19 (0.176)	0.44 <b>(0.001)</b>	0.30 <b>(0.030)</b>	-0.16 (0.256)	0.44 <b>(0.001)</b>	-0.20 (0.147)	-0.20 (0.154)	-0.34 <b>(0.012)</b>	0.22 (0.118)
Ecotipos											
Latitud	Longitud	DGower	DGeo	MDR	ISO	MAT	TAR	MAP	PQH	PQS	PsP
-0.24 (0.385)	-0.34 (0.220)	0.22 (0.425)	-0.24 (0.384)	0.65 <b>(0.009)</b>	0.49 (0.063)	-0.35 (0.201)	0.64 <b>(0.010)</b>	-0.33 (0.230)	<b>-0.58</b> <b>(0.024)</b>	-0.10 (0.724)	-0.06 (0.828)
-0.18 (0.531)	-0.42 (0.116)	0.16 (0.558)	-0.43 (0.113)	0.54 <b>(0.040)</b>	0.43 (0.114)	-0.29 (0.290)	0.51 <b>(0.050)</b>	-0.33 (0.232)	<b>-0.56</b> <b>(0.030)</b>	0.02 (0.938)	-0.349 (0.203)
-0.57 <b>(0.028)</b>	-0.37 (0.379)	0.53 <b>(0.041)</b>	-0.23 (0.413)	0.63 <b>(0.012)</b>	0.57 <b>(0.030)</b>	0.010 (0.973)	0.57 <b>(0.027)</b>	-0.28 (0.308)	-0.46 (0.086)	-0.43 (0.109)	0.20 (0.482)

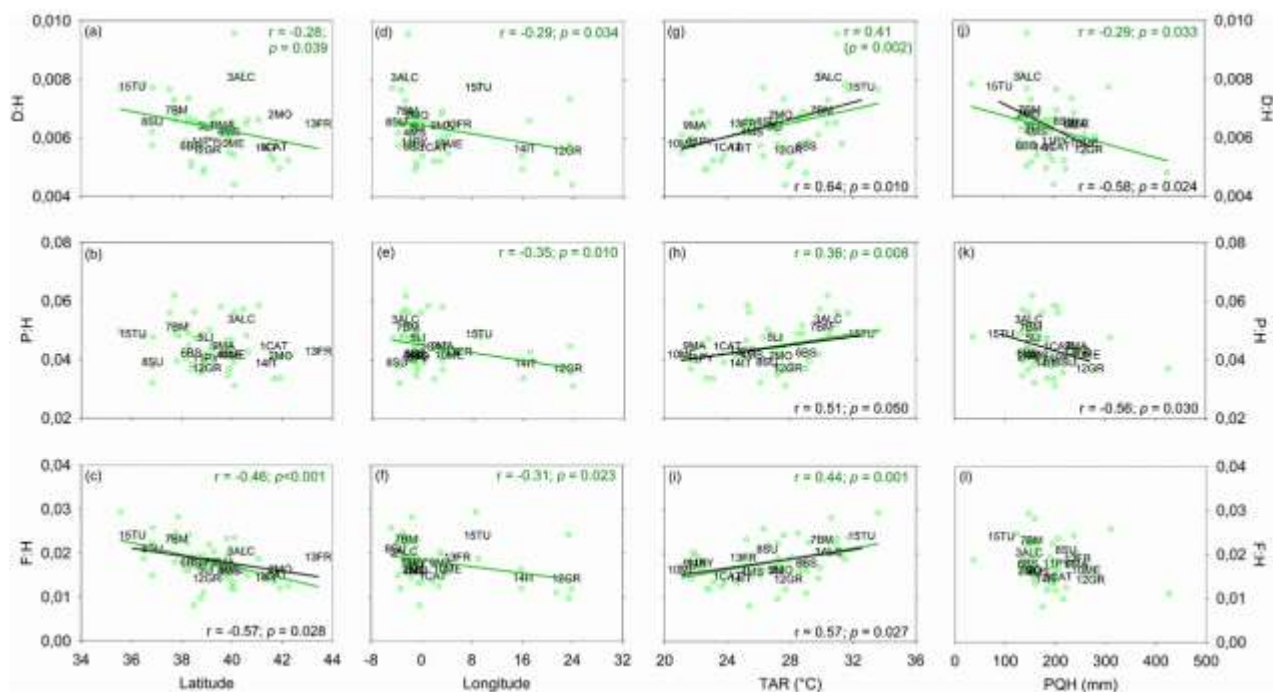


Figura 3. Correlaciones entre las ratios entre diámetro, profundidad o frecuencia de raíces y altura del árbol (D:H; P:H; F:H, respectivamente). Los datos corresponden a 56 poblaciones de pino carrasco (puntos verdes) agrupadas en 16 ecotipos (códigos) (los códigos se definen en la Tabla 1) analizados en un ensayo genético en Altura (España). Las correlaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ) se indican con líneas continuas verdes (a nivel de población) y negra (a nivel de ecotipo) y van acompañadas del coeficiente de correlación ( $r$ ) y la probabilidad asociada ( $p$ ), en verde (a nivel de población,) y en negro (a nivel de ecotipo).

## 5. Discusión

Este estudio ejemplifica el uso de dispositivos GPR como herramientas de fenotipado de alto rendimiento para evaluar la diferenciación intraespecífica en recursos asignados a raíces respecto al crecimiento aéreo, que se encuentra potencialmente relacionada con el uso del agua y las estrategias de tolerancia a la sequía de los árboles forestales. Amplía el uso habitual del GPR para la detección de raíces de árboles en estudios ecológicos (Guo et al. 2013a). Mediante el uso de una antena de 800 MHz pudimos detectar 1.835 raíces con diámetros iguales o superiores a 2,2 cm a una profundidad máxima de 88 cm para unos 330 árboles monitoreados en un ensayo de aprox. 0,8 ha. La calibración *in situ* proporcionó evidencia directa de la idoneidad de las mediciones GPR para la detección de raíces. Una indicación adicional (indirecta) del potencial del GPR para la detección de raíces fue la observación de que la variabilidad detectada en los caracteres de las raíces del pino carrasco coincidía (al menos en parte) con la información derivada de los isótopos de agua en los mismos árboles (Voltas et al., 2015). Sin embargo, debemos tener en cuenta que solo las asociaciones que involucran a  $\delta^{18}O$  del agua de xilema de principios de otoño fueron significativas, mientras que no se detectaron relaciones relevantes con los registros del GPR en el pico del verano. Esto sugiere que el gradiente electromagnético existente entre las raíces y el suelo en el momento de las mediciones de GPR (es decir, a mediados de junio) podría haber identificado más raíces que las que absorben agua de manera efectiva durante la sequía aguda de verano. Para una especie isohídrica como el pino carrasco, una fracción de las raíces gruesas podría haber permanecido en una condición quiescente durante el secado del suelo en verano como estrategia para evitar fallos hidráulicos. Esta condición podría ser el resultado de un desarrollo reversible de barreras de transporte de agua como la suberina o la cutina, estimuladas por la escasez de nutrientes y el estrés por sequía (Vandeleur et al. 2008; Schreiber 2010; Barberon et al. 2016). Las raíces también pueden

estar sujetas a embolia estacional, ya que la cavitación parcial en las raíces es menos dañina que los fallos de la xilema del tronco porque las raíces pueden recuperarse después de la sequía rellenando el conducto embolizado (Domec et al. 2004). Los cambios en la turgencia y el reemplazo de las raíces son algunas de las consecuencias predominantes de la elevada temperatura del suelo y el estrés por déficit de agua en las plantas (Brunner et al. 2015, Gill y Jackson 2000), y ambos fenómenos han sido ampliamente descritos para el caso de raíces finas (Gill y Jackson 2000; Kitajima et al. 2010; Montagnoli et al. 2019). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia de inactivación de raíces gruesas en especies de árboles forestales. Esta posibilidad merecería una investigación detallada a través de, por ejemplo, la evaluación temporal de las señales del GPR tras cambios en el estado hídrico del suelo durante la temporada de crecimiento.

Es conocido que la arquitectura del sistema radical varía entre los pinos ibéricos, y las especies de montaña (ej., *P. sylvestris*) suelen presentar raíces más superficiales que las especies típicas del Mediterráneo (ej., *P. pinaster*, *P. halepensis*) (Andivia et al. 2019). Esta variabilidad se correlaciona con los nichos ecológicos de las especies y la intensidad del estrés por sequía presente en sus ambientes (Andivia et al. 2019). También es notorio que los árboles forestales asignan carbono preferentemente al sistema radical como respuesta a la escasa disponibilidad de nutrientes (Hermans et al. 2006; Vicca et al. 2012), que precede a la síntesis de metabolitos secundarios (Prescott et al. 2020). Sin embargo, todavía existe una falta de información sobre la variabilidad de los rasgos funcionales de las raíces a nivel intraespecífico (Kirfel et al. 2017), así como en la comprensión de las compensaciones entre la asignación de recursos a partes subterráneas y aéreas y las posibles relaciones existentes entre dichos rasgos y el clima en origen. El objetivo principal de este estudio fue llenar este vacío de conocimiento para una especie forestal de gran importancia ecológica y, en particular, caracterizar patrones intraespecíficos de asignación a caracteres de raíces gruesas potencialmente relacionados con diferentes estrategias de crecimiento y de uso de agua en el pino carrasco.

Se encontró diferenciación poblacional para las ratios entre diversos caracteres de raíz y la altura del individuo, que se estructuró geográficamente siguiendo un patrón ecotípico. Estos patrones se han observado previamente en pino carrasco para rasgos relacionados con el balance hídrico del árbol, como la eficiencia en el uso del agua (Voltas et al. 2008), la transpiración (Santini et al. 2019b) y el uso de diferentes fuentes de agua (Voltas et al. 2015). En particular nuestros resultados mostraron que las poblaciones procedentes de ambientes generalmente másicos, que tienen alto potencial de crecimiento (Voltas et al. 2018; Patsiou et al. 2020), asignan los recursos preferiblemente a parte aérea y en menor medida a raíces, como lo ejemplifican las poblaciones de los ecotipos 12GR y 14IT, que presentaron las ratios menores para los tres rasgos de raíz analizados y que proceden de la cuenca centro-oriental mediterránea. Estos ecotipos experimentan condiciones climáticas suaves en origen (MAP > 500 mm) y se sabe que exhiben una plasticidad de crecimiento en altura mayor en comparación con ecotipos xéricos bajo gradientes de disponibilidad de agua (Patsiou et al. 2020). Nuestros resultados también destacaron la existencia de compensación entre crecimiento aéreo y desarrollo radicular, sugiriendo que la asignación a raíces (diámetro, profundidad y frecuencia) disminuye respecto a la asignación a crecimiento aéreo a lo largo de una clina longitudinal hacia el este y latitudinal hacia el norte en las poblaciones de pino carrasco. Estos resultados concuerdan con resultados previos que informan de otros patrones de asignación de recursos en pino carrasco, y que mostraron disminuciones en el esfuerzo reproductor (Climent et al. 2008) y la eficiencia del uso del agua (Voltas et al. 2018) en poblaciones orientales de la especie.

La diferencia intraespecífica de las ratios entre diámetro, profundidad o frecuencia de raíces y altura de los árboles (D:H, P:H, F:H, respectivamente) sugiere que existe una compensación entre desarrollo del sistema radical y de la parte aérea que presenta una estructura geográfica clara. Esto puede estar relacionado con la existencia de diferentes estrategias de adaptación que se hacen evidentes en una serie de rasgos de historia vital y sus posibles compensaciones, además de las características propias de la raíz. Ello permitiría a la especie hacer frente a las condiciones ecológicas



diversas propias de su rango de distribución, de acuerdo a la modulación ejercida por estreses (sequías, bajas temperaturas, plagas) y perturbaciones (incendios).

Resulta curioso que la relación entre el rango anual de temperaturas (TAR) y las ratios analizados mostró un patrón inverso al de la latitud de las poblaciones. De todos modos, el rango de latitud representado en las poblaciones no fue tan extenso como para encontrar diferencias relevantes en la TAR que reflejasen un patrón latitudinal. Efectivamente, la variación en TAR se debe mayoritariamente a las poblaciones originarias de Túnez y del interior de la Península Ibérica, donde los valores superan los 30°C. Además, nuestro estudio ha mostrado la existencia de relaciones negativas entre D:H, P:H y el trimestre más húmedo. Este resultado también sugiere que la existencia de compensaciones entre reproducción, defensa y crecimiento vegetativo en el pino carrasco (Climent et al. 2008; Santini et al. 2019a; Voltas et al. 2008) pueden implicar una disminución de la asignación al crecimiento aéreo en beneficio del sistema radical del individuo (mayor diámetro y profundidad) en hábitats con escasez de precipitaciones en la época más húmeda del año.

## 6. Conclusiones

Este estudio proporciona una nueva aproximación al análisis de la variabilidad intraespecífica en las características del sistema radical de las especies forestales utilizando el GPR como método de fenotipado de alto rendimiento. Observamos diferenciación intraespecífica en la ratio entre caracteres de la raíz (diámetro, profundidad y frecuencia) y altura en pino carrasco, que sigue patrones geográficos de este a oeste y de norte a sur (frecuencia de la raíz). Se encontró que procedencias originarias de condiciones xéricas exhiben una mayor asignación a raíces en relación al crecimiento aéreo. Esta observación se atribuye a la existencia de diferentes estrategias adaptativas bajo diferentes condiciones ambientales para la especie, lo que probablemente conduce a compensaciones en el uso de recursos. Además, este resultado puede estar relacionado con la existencia de un alto potencial de crecimiento de las procedencias de origen méxico, que asignan los recursos mayormente a la parte aérea en relación a su sistema radical. En este sentido, nuestro trabajo contribuye a desentrañar la complejidad evolutiva de una conífera de elevada importancia ecológica en la cuenca mediterránea.

El GPR ha sido reconocidos como una herramienta indirecta suficientemente precisa para estimar la frecuencia de raíces gruesas (Butnor et al. 2003; Hirano et al. 2009, Hirano et al. 2012; Guo et al. 2013a), pero a pesar de su alta capacidad de detección y evaluación no destructiva de las características de las raíces, no está exento de limitaciones técnicas para los estudios de fenotipado de árboles. Estas limitaciones están relacionadas sobre todo con la posición potencialmente solapada de las raíces y las condiciones de humedad del suelo (Hirano et al. 2009; Butnor et al. 2016; Rodríguez-Robles et al 2017). En este sentido, nuestra campaña de campo se centró en un período de plena actividad vegetativa de los árboles, evitando así valores extremos de humedad del suelo. En futuros estudios sería interesante utilizar el GPR en diferentes periodos estacionales para comprender cómo varía su capacidad de detección bajo gradientes electromagnéticos contrastados entre las raíces y el propio suelo.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por el Gobierno de España, proyectos AGL2015-68274-C3-3-R (MINECO / FEDER) y RTI2018-094691-B-C31 (MCIU / AEI / FEDER, UE). E. Lombardi contó con el apoyo de una beca pre-doctoral AGAUR FI-2020 (Secretaría de Universidades e Investigación del Ministerio de Empresa y Conocimiento de la Generalitat de Catalunya y el Fondo Social Europeo).

## 8. Bibliografía

ALANI, AM.; LANTINI, L.; 2020. Recent Advances in Tree Root Mapping and Assessment Using Non-destructive Testing Methods: A Focus on Ground Penetrating Radar, *Surv in Geophy* 41, 605-646.

ANDIVIA, E.; ZUCCARINI, P.; GRAU, B.; DE HERRALDE, F.; VILLAR-SALVADOR, P.; SAVÉ, R.; 2019. Rooting big and deep rapidly: the ecological roots of pine species distribution in southern Europe. *Trees - Struct Funct* 33 293–303.

BARBERON, M.; VERMEER, JEM.; DE BELLIS, D.; WANG, P.; NASEER, S.; ANDERSEN, TG.; HUMBEL, BM.; NAWRATH, C.; TAKANO, J.; SALT, DE.; GELDNER, N.; 2016. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell* 164 447–459.

BARTON, CVM.; MONTAGU, KD.; 2004. Detection of tree roots and determination of root diameters by ground penetrating radar under optimal conditions. *Tree Physiol* 24 1323–1331.

BRUNNER, I.; HERZOG, C.; DAWES, MA.; AREND, M.; SPERISEN, C.; 2015. How tree roots respond to drought. *Front Plant Sci* 6 1–16.

BUTNOR, JR.; DOOLITTLE, JA.; KRESS, L.; COHEN, S.; JOHNSEN, KH.; 2001. Use of ground-penetrating radar to study tree roots in the southeastern United States. *Tree Physiol* 21 1269–1278.

BUTNOR, JR.; DOOLITTLE, JA.; JOHNSEN, KH.; SAMUELSON, L.; STOKES, T.; KRESS, L.; 2003. Utility of ground-penetrating radar as a root biomass survey tool in forest systems. *Soil Sci Soc Am J* 67 1607–1615.

BUTNOR, JR.; SAMUELSON, LJ.; STOKES, TA.; JOHNSEN, KH.; ANDERSON, PH.; GONZÁLEZ-BENECKE, CA.; 2016. Surface-based GPR underestimates below-stump root biomass. *Plant Soil* 402 47–62.

CLIMENT, J.; PRADA, MA.; CALAMA, R.; CHAMBEL, MR.; DE RON, DS.; ALÍA, R.; 2008. To grow or to seed: Ecotypic variation in reproductive allocation and cone production by young female Aleppo pine (*Pinus halepensis*, Pinaceae). *Am J Bot* 95 833–842.

DOMEC, JC.; WARREN, JM., MEINZER, FC.; BROOKS, JR.; COULOMBE, R.; 2004. Native root xylem embolism and stomatal closure in stands of Douglas-fir and ponderosa pine: Mitigation by hydraulic redistribution. *Oecologia* 141 7–16.

ESTEBAN, LG.; MARTÍN, JA.; DE PALACIOS, P.; FERNÁNDEZ, FG.; LÓPEZ, R.; 2010. Adaptive anatomy of *Pinus halepensis* trees from different mediterranean environments in Spain. *Trees - Struct Funct* 24 19–30.

FICK, SE.; HIJMANS, RJ.; 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 37 4302-4315.

Field, CB.; Barros, VR.; Dokken, DJ.; Mach, KJ.; Mastrandrea, MD.; Bilir, TE. Chatterjee, M.; Ebi, KL.; Estrada, YO.; Genova, RV.; Girma, B.; Kisttel, ES.; Levy, AN.; MacCracken, S.;

Mastrandrea, PR.; Withe LL.; IPCC, 2014a. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Cambridge University Press. 1132. Cambridge, United Kingdom and New York.

GILL, RA.; JACKSON, RB.; 2000. Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytol* 147 13–31.

GUO, L.; CHEN, J.; CUI, X.; FAN, B.; LIN, H.; 2013a. Application of ground penetrating radar for coarse root detection and quantification: a review. *Plant Soil* 362 1–23.

GUO, L.; LIN, H.; FAN, B.; CUI, X.; CHEN, J.; 2013b. Impact of root water content on root biomass estimation using ground penetrating radar: Evidence from forward simulations and field controlled experiments. *Plant Soil* 371 503–520.

HERMANS, C.; HAMMOND, JP.; WHITE, PJ.; VERBRUGGEN, N.; 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci* 11 610–617.

HERNÁNDEZ, EI.; VILAGROSA, A.; PAUSAS, JG.; BELLOT, J.; 2010. Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species. *Plant Ecol* 207 233–244.

HIRANO, Y.; DANNOURA, M.; AONO, K.; IGARASHI, TL.; ISHII, M.; YAMASE, K.; MAKITA, N.; KANAZAWA, Y.; 2009. Limiting factors in the detection of tree roots using ground-penetrating radar. *Plant Soil* 319 15–24.

HIRANO, Y.; YAMAMOTO, R.; DANNOURA, M.; AONO, K.; IGARASHI, T.; ISHII, M.; YAMASE, K.; MAKITA, N.; KANAZAWA, Y.; 2012. Detection frequency of *Pinus thunbergii* roots by ground-penetrating radar is related to root biomass. *Plant Soil* 360 363–373.

JOHN, J.; WILLIAMS, E.; 1998. t-Latinized Designs. *Statist NZJ* 40 111-118.

KIRFEL, K.; LEUSCHNER, C.; HERTEL, D.; SCHULDT, B.; 2017. Influence of root diameter and soil depth on the xylem anatomy of fine-to medium-sized roots of mature beech trees in the top- and subsoil. *Front Plant Sci* 8 1–13.

KITAJIMA, K.; ANDERSON, KE.; ALLEN, MF.; 2010. Effect of soil temperature and soil water content on fine root turnover rate in a California mixed conifer ecosystem. *J Geophys Res Biogeosci.* 115 1–12.

KRAINYUKOY, A.; LYAKSA, I.; 2016. Detection of tree roots in an urban area with the use of ground penetrating radar. *Transp Telecommun* 17 362–370.

LORENZO, H.; PÉREZ-GRACIA, V.; NOVO, A.; ARMESTO, J.; 2010. Forestry applications of ground-penetrating radar. *For Syst* 19 5.

MATÍAS, L.; GONZÁLEZ-DÍAZ, P.; JUMP, AS.; 2014. Larger investment in roots in southern range-edge populations of Scots pine is associated with increased growth and seedling

resistance to extreme drought in response to simulated climate change. *Environ Exp Bot* 105 32–38.

MONTAGNOLI, A.; DUMROESE, RK.; TERZAGHI, M.; ONELLI, E.; SCIPPA, GS.; CHIATANTE, D.; 2019. Seasonality of fine root dynamics and activity of root and shoot vascular cambium in a *Quercus ilex* L. forest (Italy). *For Ecol Manage* 431 26–34.

PATSIU, TS.; SHESTAKOVA, TA.; KLEIN, T.; DI MATTEO, G.; SBAY, H.; CHAMBEL, MR.; ZAS, R.; VOLTAS, J.; 2020 Intraspecific responses to climate reveal nonintuitive warming impacts on a widespread thermophilic conifer. *New Phytol* 228 525-540.

PRESCOTT, CE.; GRAYSTON, SJ.; HELMISAARI, HS.; KAŠTOVSKÁ, E.; KÖRNER, C.; LAMBERS, H.; MEIER, IC.; MILLARD, P.; OSTONEN, I.; 2020. Surplus carbon drives allocation and plant–soil interactions. *Trends Ecol Evol* 35 1110–1118.

RODRÍGUEZ-ROBLES, U.; ARREDONDO, T.; HUBER-SANNWALD, E.; RAMOS-LEAL, JA.; YÉPEZ, EA.; 2017. Technical note: Application of geophysical tools for tree root studies in forest ecosystems in complex soils. *Biogeosci* 14:5343–5357.

RUTTER, MT.; FENSTER, CB.; 2007 Testing for adaptation to climate in *Arabidopsis thaliana*: A calibrated common garden approach. *Ann Bot* 99 529–536.

SANTINI, F.; CLIMENT, JM.; VOLTAS, J.; 2019a; Phenotypic integration and life history strategies among populations of *Pinus halepensis*: an insight through structural equation modelling. *Ann Bot* 124, 1161–1171.

SANTINI, F.; KEFAUVER, SC.; RESCO DE DIOS, V.; ARAUS, JL.; VOLTAS, J.; 2019b. Using unmanned aerial vehicle-based multispectral, RGB and thermal imagery for phenotyping of forest genetic trials: A case study in *Pinus halepensis*. *Ann Appl Biol* 174 262–276.

SARDANS, J.; PEÑUELAS, J.; 2013. Plant-soil interactions in Mediterranean forest and shrublands: Impacts of climatic change. *Plant Soil* 365 1–33.

SCHREIBER, L.; 2010 Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends Plant Sci* 15, 546–553.

TANIKAWA, T.; HIRANO, Y.; DANNOURA, M.; YAMASE, K.; AONO, K.; ISHII, M.; IGARASHI, T.; IKENO, H.; KANAZAWA, Y.; 2013. Root orientation can affect detection accuracy of ground-penetrating radar. *Plant Soil* 373 317–327.

TAPIAS, R.; CLIMENT, J.; PARDOS, JA.; GIL, L.; 2004 Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecol* 171 53–68.

VANDELEUR, RK.; MAYO, G.; SHELDEN, MC.; GILLIHAM, M.; KAISER, BN.; TYERMAN, SD.; 2009. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: Diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol* 149 445–460.

- VENNETIER, M.; RIPERT, C.; RATHGEBER, C.; 2018 Autecology and growth of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.): A comprehensive study in France. *For Ecol Manage* 413 32–47.
- VICCA, S.; LUYSSAERT, S.; PEÑUELAS, J.; CAMPIOLI, M.; CHAPIN, FS.; CIAIS, P.; HEINEMEYER, A.; HÖGBERG, P.; KUTSCH, WL.; LAW, BE.; MALHI, Y.; PAPAIE, D.; PIAO, SL.; REICHSTEIN, M.; SCHULZE, ED.; JANSSENS, IA.; 2012. Fertile forests produce biomass more efficiently. *Ecol Lett* 15 520–526.
- VOLTAS, J.; CHAMBEL, MR.; PRADA, MA., FERRIO, JP.; 2008. Climate-related variability in carbon and oxygen stable isotopes among populations of Aleppo pine grown in common-garden tests. *Trees - Struct Funct* 22 759–769.
- VOLTAS, J.; LUCABAUGH, D.; CHAMBEL, MR.; FERRIO, JP.; 2015. Intraspecific variation in the use of water sources by the circum-Mediterranean conifer *Pinus halepensis*. *New Phytol* 208 1031–1041.
- VOLTAS, J.; SHESTAKOVA, TA.; PATSIU, T.; DI MATTEO, G.; KLEIN, T.; 2018 Ecotypic variation and stability in growth performance of the thermophilic conifer *Pinus halepensis* across the Mediterranean basin. *For Ecol Manage* 424 205–215.
- WANG, Y.; DONG, X.; WANG, H.; WANG, Z.; GU, J.; 2015. Root tip morphology, anatomy, chemistry and potential hydraulic conductivity vary with soil depth in three temperate hardwood species. *Tree Physiol* 36 99–108.
- WU, Y.; GUO, L.; CUI, X.; CHEN, J.; CAO, X.; LIN, H.; 2014 Ground-penetrating radar-based automatic reconstruction of three-dimensional coarse root system architecture. *Plant Soil* 383 155–172.