



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento TERRITORIO e SISTEMI AGRO-FORESTALI

Scuola di Dottorato di Ricerca in  
TERRITORIO, AMBIENTE, RISORSE E SALUTE

Indirizzo: ECOLOGIA

Ciclo XX

**ANALISI DELLA CRESCITA INTRA-ANNUALE IN  
CONIFERE E RELAZIONI CON IL DEFICIT IDRICO**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Vasco Boatto

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Tommaso Anfodillo

**Dottorando:** Carlo De Zan

Anno Accademico 2007



# Riassunto

Lo scopo della presente ricerca è quello di studiare l'accrescimento intra-annuale in conifere, mediante analisi anatomiche e l'utilizzo di dendrometri.

Nel primo capitolo, attraverso l'utilizzo delle microcarote, vengono illustrate le dinamiche di formazione dell'anello attraverso le diverse fasi: di distensione, di ispessimento della parete fino ad arrivare alle cellule mature dello xilema. L'uso delle microcarote permette in particolare di monitorare in maniera diretta l'accrescimento dell'anello mediante la quantificazione delle cellule prodotte di settimana in settimana. La produzione di nuove cellule avviene nel cambio la cui attività è regolata dall'influenza di processi fisiologici interni e fattori ambientali esterni nell'ambito dei limiti fissati dal genoma. Nel corso del loro sviluppo, le derivate cambiali evolvono sia morfologicamente che fisiologicamente assumendo caratteristiche più o meno specifiche, differenziandosi nei diversi elementi costituenti i tessuti del fusto. Il presente lavoro si concentra sulla produzione di nuovi elementi xilematici, fenomeno associato a cambiamenti che avvengono sia nella composizione che nell'organizzazione delle pareti cellulari. A seguito del turgore cellulare le pareti cellulari si distendono, incrementando così le dimensioni degli elementi cellulari. Dopo la deposizione di microfibrille di cellulosa e di lignina e l'autolisi dei protoplasti si conclude la maturazione delle cellule. Per questo studio sono stati selezionati due siti con esposizione nord e sud e diversa altitudine per verificare le differenze nell'accrescimento radiale. Per ciascun sito sono inoltre state selezionate 3 specie, tipiche della zona situata al limite superiore del bosco: *Larix decidua*, *Picea abies* e *Pinus cembra*. Sono state raccolte con cadenza settimanale delle microcarote legnose su 26 piante durante le stagioni di crescita 2002, 2003, 2004 e

2005. Le carote sono state incluse in paraffina e tagliata al microtomo per ottenere sezioni trasversali di 8-12  $\mu\text{m}$ . Le sezioni sono state colorate e osservate al microscopio in luce normale e polarizzata per differenziare le cellule xilematiche dell'anello in formazione. Per ogni settimana di campionamento sono state contate il numero di cellule cambiali presenti, di tracheidi in distensione cellulare, in ispessimento e lignificazione della parete ed il numero di cellule mature. Nelle tre specie analizzate sono stati osservati andamenti simili di formazione del legno. La stagione di crescita del fusto inizia a fine aprile e si protrae fino all'inizio di ottobre. La prima specie ad riattivare le divisioni meristematiche è risultato essere il *P. cembra* seguito da *L. decidua* e *P. abies*. Nel sito con esposizione nord si è rilevato un ritardo nell'avvio della stagione vegetativa e della fasi di distensione cellulare e un più basso numero di cellule nell'anello a fine stagione.

Nel secondo capitolo è stata presentata la seconda tecnica utilizzata per lo studio della formazione dell'anello intra-annuale. Con l'utilizzo di dendrometri automatici, rispetto alla metodologia precedente, è possibile monitorare le variazioni volumetriche del fusto in continuo. I dati, infatti, vengono registrati ogni 5 minuti, ma la misurazione effettuata è di tipo indiretto in quanto non permette di distinguere tra le diverse fasi di formazione dell'anello. Inoltre questo metodo non consente di discriminare tra nuove cellule dello xilema e floema prodotte ed è fortemente influenzato dai parametri idrici. In particolare in primavera la reidratazione dei tessuti legnosi provoca un espansione nel fusto non legata ad un reale accrescimento e che invece provoca un disturbo nella determinazione dell'avvio della stagione vegetativa. Per questo motivo la variazione volumetrica misurata con i dendrometri è stata confrontata con i dati istologici al fine di verificare se si ottengano gli stessi risultati. È stata utilizzata l'equazione di Gompertz per entrambe le metodologie e i parametri ottenuti da tale funzione sono stati confrontati

statisticamente non evidenziando in nessun caso delle differenze significative. Le microcarote tuttavia sono risultate indispensabili per calibrare la variazione volumetrica misurata con il dendrometro e per identificare con precisione l'avvio della stagione vegetativa.

Nel terzo capitolo sono state utilizzate le analisi istologiche per verificare le influenze di un deficit idrico su semenzali di *Abies balsamea*, specie tipica della foresta boreale. La metodologia utilizzata è la stessa descritta nel primo capitolo, sono stati effettuati prelievi su 264 piante prelevate per intero e da cui sono stati realizzati i vetrini. Sono stati effettuati due trattamenti: di controllo e l'altro dove le piante sono state sottoposte a deficit idrico. Oltre alle dinamiche di formazione dell'anello, che non hanno dimostrato differenze tra i trattamenti, sono stati analizzati la dimensione del lume e delle pareti cellulari. Le cellule sono state divise in 3 gruppi a seconda del momento in cui si sono formate: pre-stress, stress e post-stress. Si è verificato che in presenza di deficit idrico vengono prodotte cellule di minori dimensioni durante lo stress, mentre dopo il trattamento tali dimensioni sono tornate uguali a quelle degli alberi di controllo. La parete cellulare invece è risultata più sottile nelle piante trattate rispetto alle piante controllo dimostrando come ci sia un'influenza anche dopo il deficit idrico.



# Abstract

The goal of the PhD thesis is to verify the intra-annual radial growth in conifers, using the anatomical analysis of cells (microcores) and dendrometers data.

In the first chapter, using the microcores, the formation of ring wood is illustrated by the analysis of its different phases: cell enlargement, cell wall thickening and mature cell of xylem. In particular, the use of microcores allows to asses directly the ring formation, by counting the new cells produced every week. The production of new cells occurs by the cell divisions of the cambium which is regulated by internal physiological processes and by environmental factors, within limits established by genome. During their development, the cambial derivatives change in a morphological and physiological way, and they assume more or less specific characteristics and differentiate into the various elements that form stem tissues. The latter phenomenon is related to changes in the composition and in the organisation of cells walls. Because of the increase of the turgor pressure into vacuoles due to water absorption, cell walls become stretched, so that cell size increase. After the cellulose and lignin deposition and the protoplastes autolysis, cell maturation ends.

Two different study sites were selected, one facing north and one facing south; moreover, the sites have different altitude, in order to evaluate the differences in the radial growth. In each site, three species of treeline were sampled: *Larix decidua*, *Picea abies* and *Pinus cembra*.

Wood microcores were collected every week during the growing season 2002, 2003, 2004, and 2005 from 26 trees. Cross-sections were embedded in paraffin and cut at 8-12  $\mu\text{m}$ . Then they were observed with visible and polarized light to differentiate

xylem cells of the growing tree-ring. The cells in the cambial zone, the enlargement cells, the secondary wall thickening cells and mature xylem cells were counted.

Similar patterns of tree-ring formation were observed among the three species studied. In fact, the growing season of the stem started at the end of April and continued until the beginning of October. The first species reactivating the cambium was *P. cembra* followed by *L. decidua* and *P. abies*. In the site facing north, we found a delay in the beginning of the growing season and in the cell enlargement phase; furthermore, a smaller number of cells in the wood ring was observed at the end of the growing season.

The second chapter presents the second method used to study the intra-annual tree-ring development. Thanks to the use of automatic dendrometers, differently to the microcores, the radial fluctuations of the stem were continually monitored. Those instruments register data every five minutes, but the measurement is indirect because it does not allow to distinguish the different phases of tree-ring formation. Moreover, the method does not permit the discrimination between new xylem cells and phloem produced and is strongly influenced by water status. Particularly, during spring, the re-hydration of wood tissues causes a stem expansion that is not linked to a real growth. Instead, the re-hydration provokes a noise in the determination of the beginning of the growing season. For that reason, the volume variation measured by dendrometers was compared with the histological data, in order to verify if the results from the two methods are the same or not. Data collected with the two methods were both processed by the Gompertz equation and the function parameters were statistically compared. This comparison did not highlight significant differences in any cases. Nevertheless, microcores resulted essential in order to calibrate the volume variation measured by dendrometers and to precisely identify the beginning of the growing season.

In the third chapter, histological analysis were used to analyze the effects of a water stress on young trees of *Abies balsamea* which is a typical specie of boreal forest. The method utilized was the same described for the first chapter. 264 samplings were collected by taking whole young trees from which slides were realized. Young trees were submitted to two treatments: control (with no stress) and individuals with water stress. The dynamic of the ring formation did not show any differences between the two treatments. The dimension of the lumen and of the cell walls were also analyzed. The sampled cells were divided in three groups in accordance with the moment in which they were developed: pre-stress, stress and post-stress. When a water stress occurs, we found that the produced cells have smaller size, while after the treatment their size become the same of cells in control trees. The wall cells appeared more thin in treated trees than in control ones, showing that the water stress has an influence also after it was stopped.



## Indice

1. Dinamica xilogenetica .....	13
1.1. Introduzione .....	13
1.1.1. Meristema secondario .....	15
1.1.2. Differenziazione cellulare .....	16
1.2. Materiali e metodi .....	18
1.2.1. Aree di studio .....	18
1.2.2. Misurazione dell'accrescimento radiale ed analisi istologiche .....	19
1.2.3. Caratterizzazione anatomica delle cellule in differenziazione dello xilema .....	21
1.2.4. Analisi statistiche .....	22
1.3. Risultati .....	23
1.3.1. Attività cambiale .....	23
1.3.2. Differenziazione cellulare .....	27
1.3.3. Numero di cellule xilematiche mature nell'anello legnoso .....	37
1.4. Discussione .....	40
2. Accrescimento radiale giornaliero comparato con le analisi istologiche .....	45
2.1. Introduzione .....	45
2.2. Materiali e metodi .....	48
2.2.1. Elaborazioni statistiche .....	49
2.3. Risultati .....	52
2.3.1. Comparazione tra la variazione dimensionale del fusto ed i dati istologici .....	52

2.3.2.	Utilizzo della modellizzazione di Gompertz nel dato di accrescimento misurato attraverso i dendrometri e le microcarote.....	60
2.4.	Discussione.....	65
2.4.1.	Conclusioni.....	68
3.	Effetti dello stato idrico sulla morfogenesi delle tracheidi nel fusto di semenzali di <i>Abies balsamea</i> Mill.....	69
3.1.	Introduzione .....	69
3.2.	Materiali e Metodi.....	72
3.2.1.	Disegno sperimentale .....	72
3.2.2.	Andamento dello sviluppo dell'anello legnoso.....	73
3.2.3.	Analisi delle dimensioni cellulari.....	74
3.2.4.	Analisi statistiche .....	74
3.3.	Risultati .....	76
3.3.1.	Sviluppo nel tempo delle cellule xilematiche .....	76
3.3.2.	Analisi delle dimensioni cellulari.....	78
3.4.	Discussione.....	83
3.4.1.	Dinamiche di sviluppo cellulare.....	83
4.	Bibliografia.....	87

# 1. Dinamica xilogenetica

## 1.1. Introduzione

La maggioranza degli studi dendrocronologici analizza le variazioni di spessore degli anelli legnosi (Schweingruber 1996). Questa disciplina si interessa inoltre dell'anatomia dell'anello, della densità e della composizione chimica del legno, utilizzando in alcuni casi gli isotopi radioattivi (Schweingruber 1996). Tuttavia il limite di tale tecnica consiste nel fatto di non poter conoscere il momento dell'anno in cui si forma l'anello. L'analisi viene effettuata analizzando una serie temporale di diversi anni, ma non le variazioni all'interno dell'anno stesso. Recentemente, dettagliate analisi anatomiche sono state condotte sempre con maggiore frequenza sull'accrescimento stagionale. Tali studi hanno lo scopo di comprendere meglio quale sia lo sviluppo intra-annuale dell'anello in relazione ai fattori ambientali (Antonova e Stasova 1993, 1997; Deslauriers *et al.* 2003b; Mäkinen *et al.* 2003; Schmitt *et al.* 2004) e possono essere utilizzati per analizzare l'impatto del clima sull'accrescimento arboreo (Camarero *et al.* 1998; Gindl *et al.* 2000; Deslauriers *et al.* 2003b; Rossi *et al.* 2003; Schmitt *et al.* 2004). Differenti metodi possono essere utilizzati per effettuare questa analisi:

- attraverso il *tilting* (Kozłowski 1971) viene prodotta "un'impronta" nello xilema tenendo piegati fusti di semenzali di gimnosperme per un periodo di 2 giorni, inducendo così la produzione di legno di reazione. Contando il numero di cellule comprese fra un'impronta e quella successiva è possibile identificare il ritmo di accrescimento; tuttavia, questo metodo può essere utilizzato solo su piante giovani;

- il *pinning* consiste, invece, nell'inserzione e successiva estrazione di un ago (lungo circa 0.7 mm) all'interno della corteccia fino a raggiungere lo xilema (Von Wilpert 1991; Schweingruber 1996; Ohashi *et al.* 2001; Schmitt *et al.* 2004). In seguito al trauma, anche in questo caso si sviluppa del tessuto di reazione morfologicamente diverso dalle normali cellule xilematiche. L'operazione viene ripetuta periodicamente (settimanalmente, quindicinalmente o mensilmente) in diversi punti del fusto durante tutta la stagione vegetativa permettendo di ricostruire il ritmo di crescita dello xilema;
- ulteriori metodi, simili tra loro, sono costituiti dal prelievo di blocchi interi di legno di varie dimensioni (Gričar *et al.* 2005, 2006), quali, ad esempio, carote incrementali (Camarero *et al.* 1998) e microcarote (Antonova e Stasova 1993, 1997; Antonova *et al.* 1995; Forster *et al.* 2000; Deslauriers *et al.* 2003a 2003b; Rossi *et al.* 2006a, 2006b).

Tra questi metodi il meno invasivo e con il minore impatto sulla fisiologia degli alberi è quello che utilizza microcarote, in quanto la porzione di legno prelevata è minima, rendendo possibile il prelievo per diversi anni senza arrecare gravi danni alla pianta (Rossi *et al.* 2006b). Inoltre in questo modo è possibile la misurazione diretta della formazione dello xilema attraverso il prelievo periodico ad intervalli determinati (Rossi *et al.* 2003) tramite l'utilizzo di appositi strumenti (Rossi *et al.* 2006b). Il campionamento può essere effettuato attraverso l'*increment puncher* (Forster *et al.* 2000) – che consiste nell'uso di una siringa chirurgica (Deslauriers *et al.* 2003a) usata per i prelievi ossei – o con il *Trephor* (Rossi *et al.* 2006b) da cui si ottengono delle microcarote di 2 mm di diametro.

### 1.1.1. Meristema secondario

Il cambio è costituito da cellule meristematiche che continuano a dividersi indefinitivamente e senza differenziarsi producendo continuamente nuove cellule e nuovi organi. Una parte dei prodotti della divisione cellulare (cellule iniziali) rimane meristematica, mentre l'altra parte (cellule derivate o figlie) dà luogo a cellule adulte che sono molto importanti per la pianta in quanto costituiranno poi alle cellule destinate al trasporto di sostanze nutritive e acqua e alla funzione di sostegno. Il cambio è collocato fra xilema e floema e si estende ininterrottamente dall'apice radicale fino all'apice dei germogli. I suoi ruoli principali consistono nell'incremento in diametro e in lunghezza di fusto, branche e radici e nella formazione dei tessuti legnosi. L'attività cambiale garantisce così la vita degli alberi attraverso il periodico rinnovamento dei tessuti floematici e xilematici.

Nelle zone temperate il cambio entra in fase di dormienza in seguito a condizioni climatiche (fattori esogeni) limitanti, che ne bloccano le differenziazioni lasciandolo inattivo. L'attività cambiale riprende poi solo con il miglioramento delle condizioni climatiche. Nell'area Alpina il più importante fattore limitante è rappresentato dalle basse temperature invernali, mentre nelle zone del centro-sud Italia anche la disponibilità idrica diviene uno dei principali fattori limitanti (Cherubini *et al.* 2003). Una volta riattivatosi, il cambio produce nuove cellule in differenziazione che passano attraverso vari stadi. Durante il periodo di stasi vegetativa il cambio dormiente è costituito da un numero minimo di cellule, alla ripresa vegetativa il numero di cellule del cambio aumenta fino ad un massimo di attività (Bannan 1962) per poi diminuire nuovamente e infine cessare le divisioni.

### 1.1.2. Differenziazione cellulare

Nel corso dello sviluppo le cellule che vengono prodotte dal cambio entrano in differenziazione e formano le nuove cellule dello xilema passando attraverso diverse fasi: distensione, ispessimento della parete e cellula matura (Savidge 2000; Deslauriers *et al.* 2003a; Rossi *et al.* 2003; Rossi *et al.* 2006a). Nelle cellule xilematiche questo fenomeno avviene attraverso cambiamenti sia nelle dimensioni, sia nella composizione e nell'organizzazione delle pareti cellulari. La distinzione tra le suddette fasi è ovviamente frutto di una schematizzazione che, pur non riflettendo con precisione un fenomeno che in realtà avviene in maniera graduale, si rende necessaria al fine di effettuare analizzare in dettaglio la formazione del legno. Le cellule in fase di distensione sono costituite da un protoplasto racchiuso da una sottile ed elastica parete primaria. Con l'aumento del turgore per l'assorbimento di acqua nei vacuoli, la parete cellulare si distende, incrementando il diametro radiale della cellula e la superficie del lume (Kramer 1964).

La seconda fase della maturazione cellulare prevede l'ispessimento della parete secondaria, che avviene verso l'interno essendo le dimensioni cellulari raggiunte già definitive. Tale processo si realizza tramite la coordinazione di diversi geni coinvolti nella sintesi dei componenti della parete cellulare come polisaccaridi, lignina e proteine cellulari (Plomion *et al.* 2001). La deposizione delle microfibrille di cellulosa (ovvero, le unità strutturali di base che costituiscono il 40-50% del legno) e delle emicellulose (costituenti il 25% circa del legno) avvia la formazione dei tre strati che formeranno la cosiddetta parete secondaria. La lignina (25-35% del legno) viene quindi deposta negli strati intercellulari e negli spazi intermicrofibrillari della parete cementificando assieme le microfibrille. La lignina ha diverse funzioni, sia strutturali che di difesa. Il ruolo di questo polimero aromatico viene infatti associato con il supporto meccanico degli

organi della pianta, il miglioramento nella conduzione linfatica attraverso gli elementi vascolari e con il meccanismo di difesa da agenti patogeni (Zhong *et al.* 1997, Lauvergeat *et al.* 2001).

Il processo di differenziazione di una singola derivata cambiale necessita generalmente di un periodo che va da pochi giorni a diverse settimane e varia con la specie, con il tipo di cellula e con il momento dello sviluppo durante la stagione vegetativa (Kutscha *et al.* 1975). Il tempo richiesto infatti per la distensione di una tracheide di conifera è più lungo in primavera che nella tarda estate quando, invece, aumenta il tempo disponibile per la deposizione di parete secondaria. È proprio questo fenomeno a determinare la formazione, verso la fine della stagione vegetativa, di tracheidi con diametri radiali minori ma con pareti cellulari più spesse rispetto alle cellule del legno primaticcio. Questo fenomeno è legato ad una minore durata della distensione delle pareti cellulari ed un maggiore tempo per la maturazione (Uggla *et al.* 2001). Lo stadio finale della maturazione di un elemento vascolare (tracheide) comporta l'autolisi dei protoplasti. Nell'arco di pochi giorni gli organelli presenti all'interno della cellula (membrane vacuolari, organelli citoplasmatici, citoplasma e plasmalemma) degenerano. Un segnale fino ad oggi ancora sconosciuto induce il collasso dei vacuoli con il rilascio di sostanze idrolizzanti che degradano tutto il contenuto cellulare lasciando intatte le pareti secondarie (Kramer e Kozlowski 1979, Plomion *et al.* 2001).

L'obiettivo del lavoro esposto in questo primo capitolo è quello di studiare in maniera approfondita l'accrescimento intra-annuale di alcune specie arboree, *Picea abies* Karst., *Pinus cembra* L., *Larix decidua* Mill., al limite superiore del bosco in due siti con diversa esposizione. In particolare si vuole verificare quale sia: a) l'andamento del cambio e della produzione xilematica nelle diverse fasi; b) l'inizio, la fine e la

durata delle diverse fasi di differenziazione; c) la produttività totale annuale delle diverse specie.

## **1.2. Materiali e metodi**

### **1.2.1. Aree di studio**

L'area di studio è situata al limite superiore del bosco, nella parte orientale delle Alpi italiane (Dolomiti, Cortina d'Ampezzo, BL) (46°27'N, 12°08'E). La formazione arborea è composta da una foresta mista di *Larix decidua* Miller, *Pinus cembra* L. e *Picea abies* (L.) Karst che hanno colonizzato un'area abbandonata dal pascolo. Lo studio è stato condotto su due differenti siti, 5 torri 1 e 5 torri 2, che nel testo di seguito vengono sinteticamente indicati come 5T1 e 5T2. Il primo presenta esposizione prevalente sud, è posto ad una quota di 2080 m s.l.m. e ha una pendenza compresa tra 5° e 15°, mentre il secondo ha esposizione prevalente nord, si colloca ad una quota media di 2130 m s.l.m. e presenta una pendenza fino a 40°. Si tratta di popolamenti con piante di età compresa tra i 45 e 74 anni insediatesi, quindi, intorno alla metà del secolo scorso (tab. 1). I primi due anni di analisi sono stati ottenuti dai lavori di tesi di tesi. I campioni dell'anno 2004 sono stati raccolti dai tecnici del Centro Studi per l'Ambiente Alpino di San Vito di Cadore (BL) ed i vetrini e le analisi sono state effettuate durante il primo anno di tesi di dottorato, mentre per l'ultimo anno si è partecipato, sempre in collaborazione con i tecnici, sia alla fase di raccolta che di laboratorio.

## 1.2.2. Misurazione dell'accrescimento radiale ed analisi istologiche

Le misurazioni dell'accrescimento radiale intra-annuale sono state effettuate attraverso analisi istologiche del legno. I dati sono stati raccolti durante gli anni 2002-2005 su piante di *L. decidua*, *P. abies* e *P. cembra* le cui caratteristiche sono riportate in tabella 1. ). I primi due anni di analisi sono stati ottenuti da dei lavori di tesi di tesi. I campioni dell'anno 2004 sono stati raccolti dai tecnici del Centro Studi per l'Ambiente Alpino di San Vito di Cadore (BL) ed i vetrini e le analisi sono state effettuate durante il primo anno di tesi di dottorato, mentre per l'ultimo anno si è partecipato, sempre in collaborazione con i tecnici, sia alla fase di raccolta che di laboratorio.

Site	Specie	Età (anni)	Diametro(cm)	Altezza (m)	MC
	<i>L.decidua</i>	60.6±18.7	26.8±4.8	11.6±1.0	5
5T1	<i>P. abies</i>	45.0±8.7	22.4±6.2	10.4±0.6	5
	<i>P.cembra</i>	60.4±7.9	29.2±8.6	10.1±0.7	5
	<i>L.decidua</i>	63.8±9.2	15.4±1.6	6.4±0.7	5
5T2	<i>P. abies</i>	74.0	22.8	8.0	1
	<i>P.cembra</i>	56.0±13.4	20.4±5.2	6.7±1.5	5

Tabella 1: Media e deviazione standard dell'età (anni), diametro (cm), altezza della pianta (m) e numero di alberi campionati con le microcarote (MC).

Ogni settimana a partire dagli inizi di aprile fino a fine ottobre sono state prelevate delle microcarote di legno per la quantificazione delle cellule xilematiche in formazione. I campionamenti sono stati effettuati su 5 alberi per ogni specie analizzata (tab. 1), tranne nel sito 2 dove è stato campionato un unico esemplare di abete rosso.

Le microcarote sono state prelevate ad un'altezza compresa tra 1.0 m e 1.6 m dal terreno mediante l'uso dell'*Increment Puncher* (Forster *et al.* 2000), nel 2002 e 2003, e del *Trephor* (Rossi *et al.* 2006b), nel 2004 e nel 2005. Esse in genere contengono, oltre al cambio, al floema e alle cellule in differenziazione, un numero di anelli variabile da 3 a 10. In alcuni casi si è reso necessario asportare parte della corteccia prima di poter effettuare il prelievo. I campionamenti sono stati effettuati lungo la circonferenza facendo attenzione ad eseguire il prelievo ad una distanza di almeno 5 cm dai fori praticati precedentemente ed evitando le zone di compressione, in modo da escludere dal campionamento il legno di reazione (Deslauriers *et al.* 2003a). I campioni sono stati messi in una soluzione di alcool (50% in H<sub>2</sub>O) e conservati in frigorifero a 5°C. Quindi le microcarote, dopo essere state chiuse dentro apposite bio-cassette, sono state orientate mediante l'osservazione delle fibre nella zona distale dello xilema e quindi inserite in un processore (Shandol citadel 1000) contenente delle vasche con soluzioni a diverse concentrazioni di alcool, β-limonene e paraffina allo stato liquido (a 75°C) per permettere la preparazione e disidratazione dei campioni (Anderson e Bancroft 2002). In ogni vasca le bio-cassette sono rimaste per un periodo di tempo compreso tra 90 e 120 minuti (Rossi *et al.* 2006b). A questo punto le microcarote sono state fissate in blocchetti di paraffina il cui primo strato è stato tolto al momento della preparazione dei vetrini in modo da mettere a contatto il campione di legno con l'acqua che lo idrata e facilita il taglio. Le sezioni sono poi state preparate con l'uso di un microtomo rotativo semiautomatico (Leica RM2145), tagliate ad uno spessore di 8-12 μm, immerse in un bagno d'acqua a 50°C che ne favorisce la distensione ed infine adagate su un vetrino porta oggetto. Successivamente, i campioni sono stati inseriti in stufa per circa 45 minuti a 75°C e quindi immersi in bagni di β-limonene ed alcool per 20 minuti. Infine, le sezioni sono state immerse per 10 minuti nel colorante *Cresyl violet acetate* (0.16%

in acqua) ed osservate entro 20 minuti al microscopio (Nikon 80i) ad un ingrandimento di 500x.

L'area che è stata analizzata per la presente ricerca è stata quella prossima al cambio, ciò ha permesso l'osservazione delle cellule xilematiche in formazione, dalla fase di distensione fino a quella di cellula matura. Tali cellule sono state, in particolare, quantificate lungo 3 file radiali.

### 1.2.3. Caratterizzazione anatomica delle cellule in differenziazione dello xilema

Durante il riposo vegetativo, le cellule cambiali delle conifere si presentano appressate tra loro, con forma leggermente allungata, pareti sottili e diametri radiali ridotti (Fujii *et al.* 1999) e sono situate tra il legno tardivo prodotto l'anno precedente e le cellule mature del floema. Quando inizia la stagione vegetativa è possibile osservare che il numero di cellule cambiali aumenta.

Le cellule in distensione si trovano subito dopo il cambio, hanno dimensioni decisamente maggiori, forma squadrata e non brillano in luce polarizzata, in quanto formate ancora solo dalla parete primaria che produce non alcuna reazione con il colorante. La seconda fase di ispessimento della parete si avvia con la deposizione della lignina che inizia dagli angoli della cellula, quindi si diffonde nella lamella mediana fino ad incrostare completamente la parete cellulare (Gričar *et al.* 2005). Tale fenomeno è visibile al microscopio per la presenza agli angoli delle cellule di punti più scuri che si allargano fino a tutta la parete cellulare. Il fenomeno è osservabile anche in luce polarizzata, in quanto le cellule brillano reagendo con il colorante *Cresyl violet acetate* permettendo di distinguere questo stadio dal precedente (Donaldson 1991, Abe *et al.* 1997). Il completamento della fase di maturazione si individua poiché il colorante

utilizzato reagisce con la lignina presente nelle pareti cellulari e viene evidenziato con il viraggio del colore da violetto a blu, momento nel quale si suppone sia appunto avvenuta la maturazione cellulare (Antonova e Shebeko 1981).

Una delle problematiche relative a questa metodologia consiste nel fatto che l'ampiezza totale dell'anello, e quindi il numero di cellule nelle file radiali che lo costituiscono, non è costante ma varia da punto a punto lungo la circonferenza. Per questo motivo si riscontra un'ampia variabilità nei dati istologici specie verso la fine della stagione vegetativa. Inoltre non è possibile seguire la dinamica di sviluppo di una singola cellula nel tempo, per cui, ad esempio, non è possibile quantificare in maniera diretta quanto rimanga una singola cellula in fase di distensione cellulare.

#### 1.2.4. Analisi statistiche

L'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per analizzare i dati (inizio e fine della produzione legnosa, durata della xilogenesi, numero finale di cellule prodotte) tra specie, siti e anni (GLM procedure in SAS).

## 1.3. Risultati

### 1.3.1. Attività cambiale

L'attività cambiale ha mostrato un andamento di tipo campaniforme (fig. 1 e 2), simile per tutte le specie, in entrambi i siti e in tutti gli anni. Durante l'inverno, quando la pianta è in riposo vegetativo, il cambio delle specie analizzate ha mostrato avere un numero minimo di cellule, che sono apparse essere di piccole dimensioni e molto appressate tra loro rispetto ai periodi successivi. Successivamente in primavera si è riscontrato un aumento della numerosità cellulare fino a raggiungere un massimo di produttività, in seguito questa è diminuita fino ad un valore simile a quello osservato all'inizio quando doveva ancora iniziare la stagione vegetativa, quando la pianta conclude il ciclo con il ritorno alla fase di quiescenza meristemica. In figura 1 e 2 il numero minimo di cellule è rappresentato dalla linea tratteggiata orizzontale, mentre l'inizio del periodo vegetativo è evidenziato dall'area in grigio, momento nel quale il numero di cellule inizia ad incrementare. Il numero minimo di cellule osservate nel cambio è variato tra 6 e 10 a seconda della specie, dell'anno e del sito. In maggior dettaglio in *L. decidua* è variato da 7 a 8 in 5T1 e da 6 a 7.5 in 5T2, in *P. abies* si è mantenuto di circa 8 in 5T1 nei 4 anni e varia tra 7 e 8.5 in 5T2 e in *P. cembra* la numerosità cellulare è variata da 7 a 10 in 5T1 e da 7 a 9 in 5T2. Si è riscontrata una maggiore stabilità nella numerosità minima delle cellule cambiali tra gli anni piuttosto che tra le specie, come evidenziato in particolare nel caso di *P. abies*.

L'avvio delle divisioni cambiali, e quindi dell'attività vegetativa, si considera che abbia inizio quando la numerosità cellulare aumenta in modo significativo e la deviazione standard non interseca la linea che rappresenta il numero minimo. Nel 2002,

ed in alcuni casi nel 2003, il campionamento è stato eseguito troppo tardi, quando l'attività cambiale era già iniziata. In tali casi è stato difficile determinare con precisione l'avvio della stagione vegetativa che potrebbe essere avvenuta una o due settimane prima di quanto indicato in figura. Anche nel caso dell'abete rosso di 5T2 non è stato facile individuare l'avvio della stagione vegetativa, in quanto la presenza di un unico individuo rende la valutazione piuttosto soggettiva. L'inizio delle divisioni cambiali è variato tra fine aprile (*P. cembra* nel 2003 e nel 2005 di 5T1) ed inizio giugno (*P. cembra* nel 2004 e *L. decidua* nel 2005 di 5T2). In tutti i casi la specie che per prima ha riattivato il cambio è stato il pino cembro, seguito dopo 1-2 settimane da larice e abete rosso. Le piante di 5T1 hanno attivato il cambio con 1-2 settimane di anticipo rispetto a 5T2 con l'eccezione del pino cembro nel 2002 e dell'abete rosso nel 2004.

Il numero massimo di cellule che sono state quantificate nella zona cambiale è di 10-14 cellule a seconda di sito, specie ed anno. Il raggiungimento della massima numerosità cambiale è variato dall'11 maggio per il pino cembro di 5T1 nel 2004 ed il cembro di 5T2 nel 2003, fino all'8 giugno per il larice di 5T1 nel 2004. In genere la specie con il maggior numero di cellule cambiali è stato l'abete rosso, con l'eccezione di 5T2 nel 2004, seguito da larice e cembro e del cembro di 5T1 nel 2002 dove si è osservata una produzione del cambio molto elevata.

La fine delle divisioni cellulari è avvenuta prima in 5T2 che in 5T1 con l'eccezione del larice nel 2002, nel 2003 e nel 2005 dove è accaduta contemporaneamente. In tale fase non sono state più prodotte nuove derivate ed è terminata la differenziazione delle ultime cellule in distensione e lignificazione. Nei cembri e nei larici di 5T2 nel 2004 si è osservata un'attività cambiale molto breve, pari a soli 35-45 giorni. I periodi vegetativi più lunghi sono invece stati osservati nel 2003 per tutte le specie ed, in particolare, per l'abete rosso di 5T1 che ha presentato 105 giorni di attività cambiale. La riattivazione

più precoce e la chiusura più tardiva dell'attività cambiale in 5T1 ha determinato una stagione vegetativa più lunga rispetto a quella di 5T2.

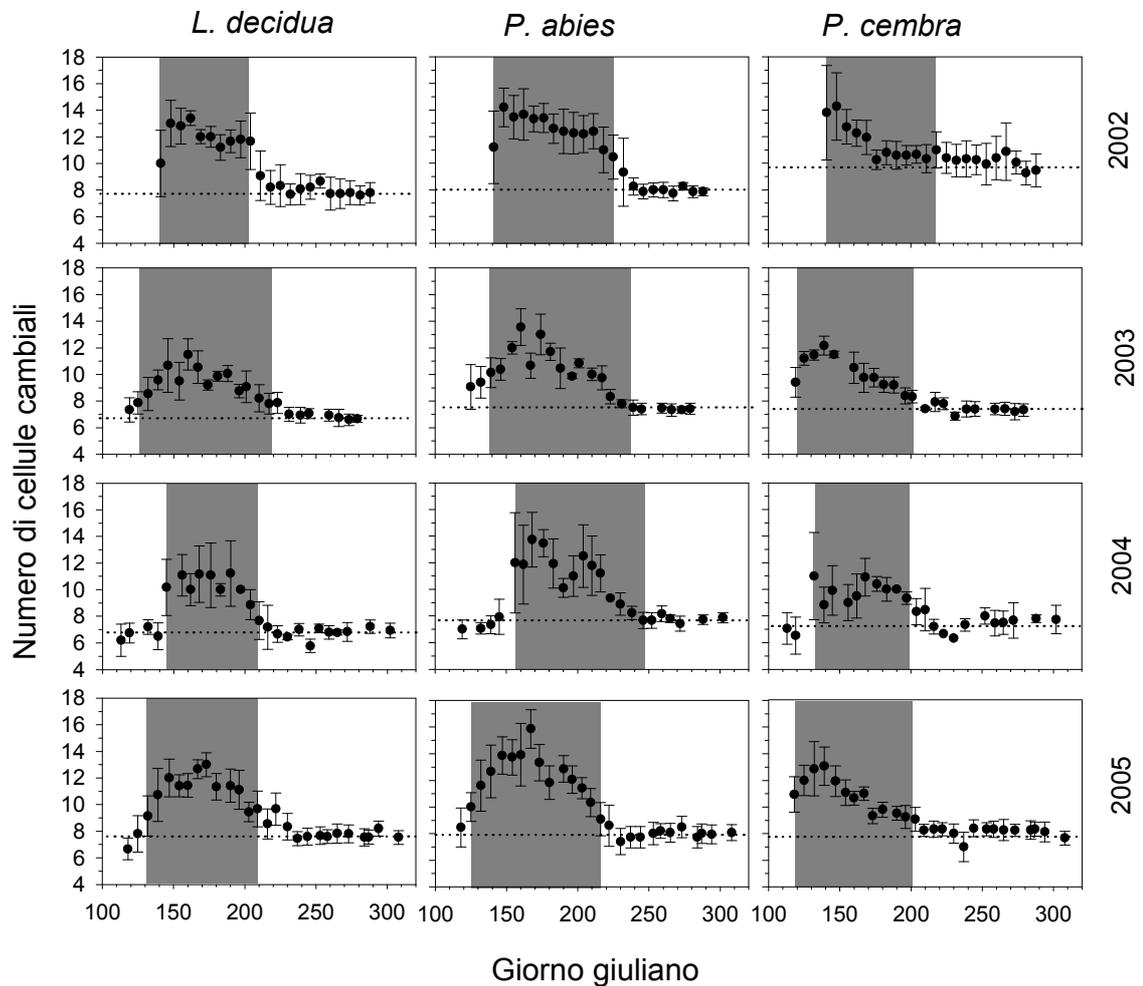


Figura 1: Attività cambiale in 5T1. I punti e le barre verticali associate rappresentano il numero medio e la deviazione standard delle cellule cambiali osservate nei 5 alberi campionati. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta il valore minimo di cellule che si riscontrano quando il cambio è dormiente. L'area in grigio rappresenta il periodo di attività cambiale.

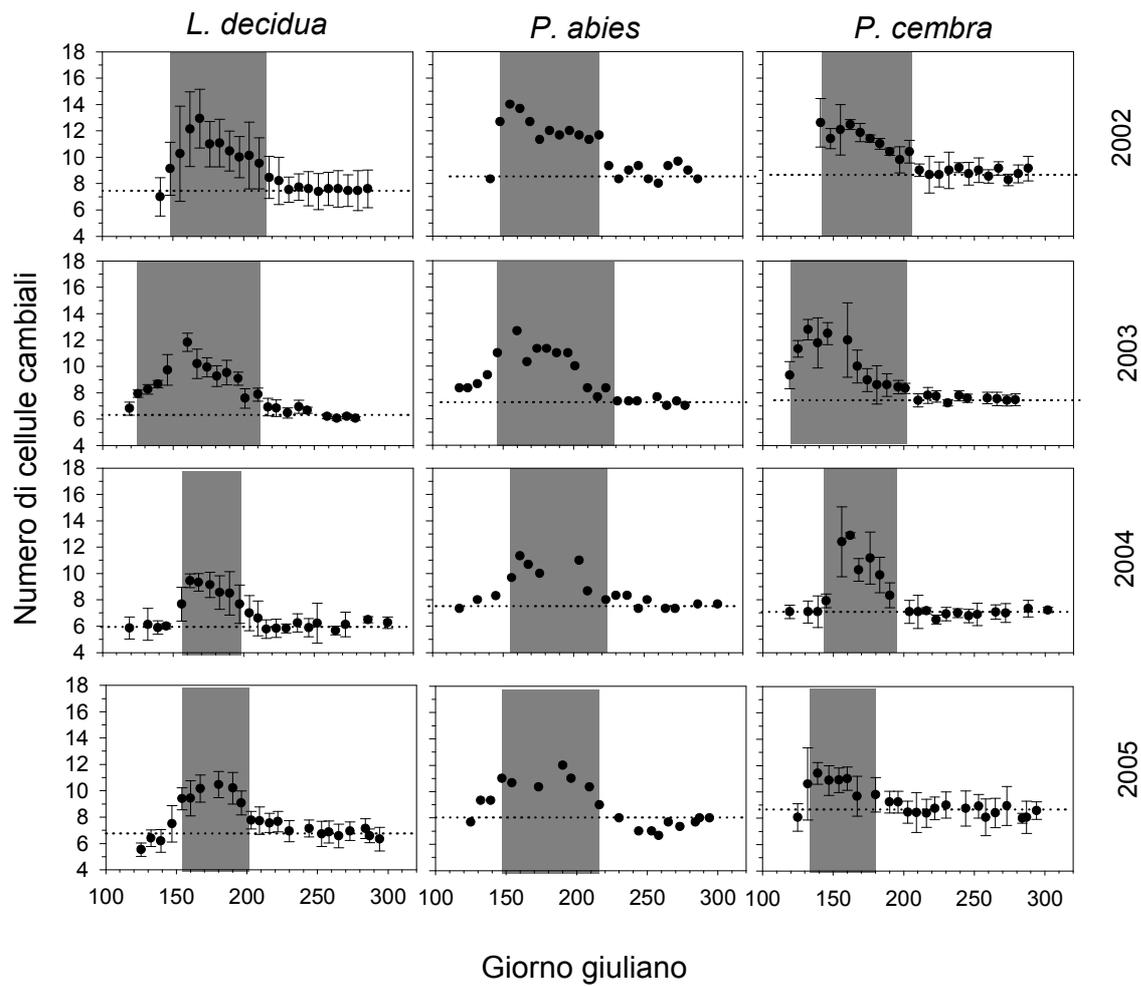


Figura 2: Attività cambiale in 5T2. I punti e le barre verticali associate rappresentano il numero medio e la deviazione standard delle cellule cambiali osservate nei 5 alberi campionati. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta il valore minimo di cellule che si riscontrano quando il cambio è dormiente. L'area in grigio rappresenta il periodo di attività cambiale. La *P. abies* è l'unico albero presente in 5T2 di questa specie pertanto non presenta le barre della deviazione standard.

### 1.3.2. Differenziazione cellulare

Durante la stagione invernale, le uniche cellule che si sono osservate tra le cellule floematiche e quelle xilematiche mature prodotte l'anno precedente a quello di indagine, sono quelle cambiali. Le cellule in distensione, che hanno mostrato dimensioni 3-5 volte maggiori delle cellule del cambio e non presentano ancora parete secondaria, non sono ancora state prodotte. L'andamento generale della numerosità delle cellule in distensione nella formazione dell'anello è simile per tutte le specie analizzate ed ha mostrato un andamento a campana come per il numero delle cellule cambiali (fig. 3 e 4). Generalmente 1-2 settimane dopo il riattivarsi delle divisioni cambiali sono notate le prime cellule in distensione che sono aumentate in numero fino ad un massimo e alla fine sono tornate ad un valore pari a 0. L'inizio del periodo di differenziazione è variato dall'11 maggio (per *P. abies* nel 2003 in 5T1 e *P. cembra* di 5T1 nel 2003 e nel 2005) al 16 giugno (per *P. abies* di 5T2 nel 2004), mentre il termine è variato tra il 3 agosto (per *P. abies* di 5T2 nel 2005) e il 2 settembre (tab. 3). Le variazioni osservate sono causate dalle differenze tra specie, siti e anni (tab. 3).

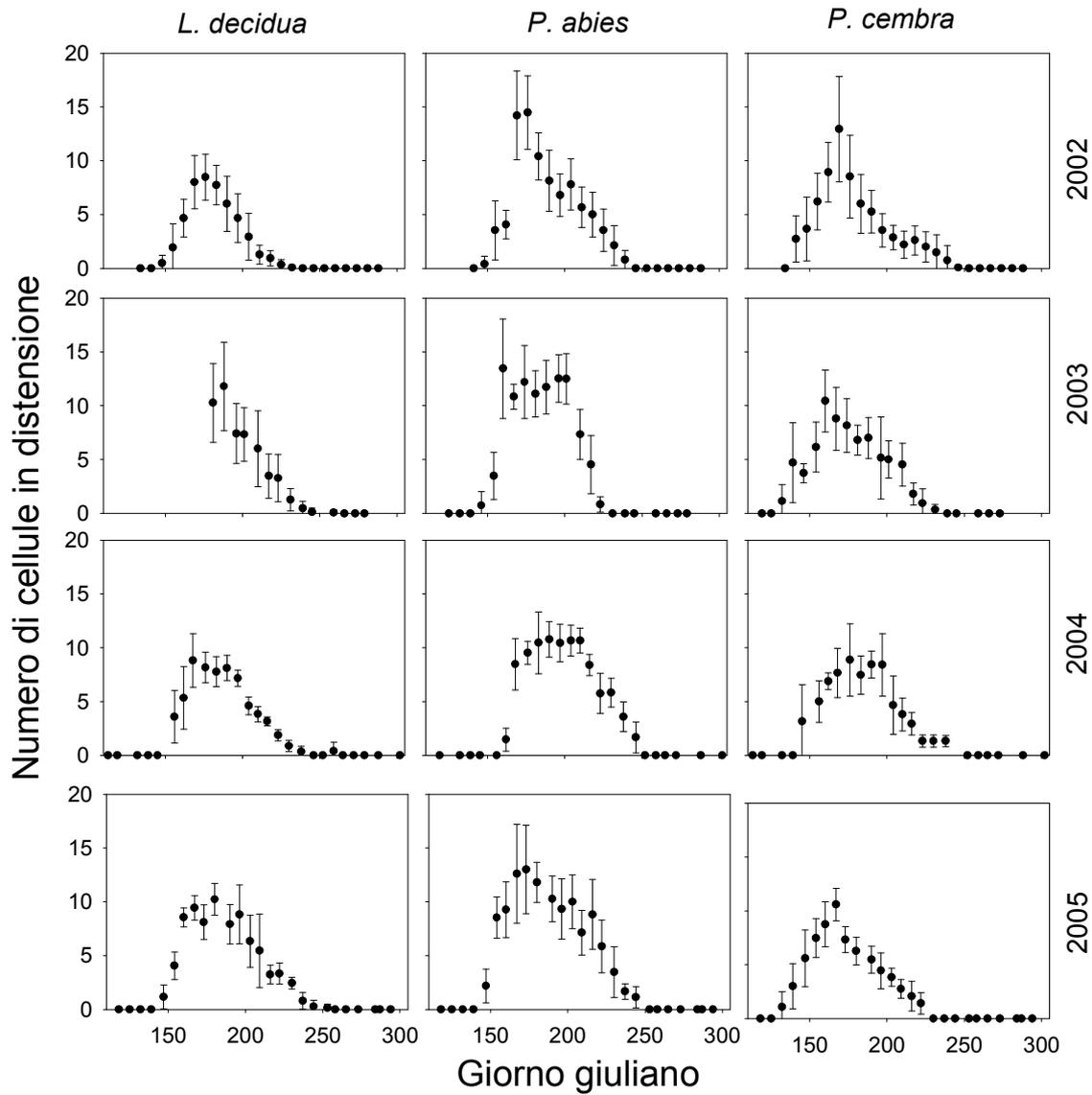


Figura 4: Cellule in distensione di 5T1. I punti e le relative barre verticali rappresentano la media e la deviazione standard per i 5 alberi campionati.

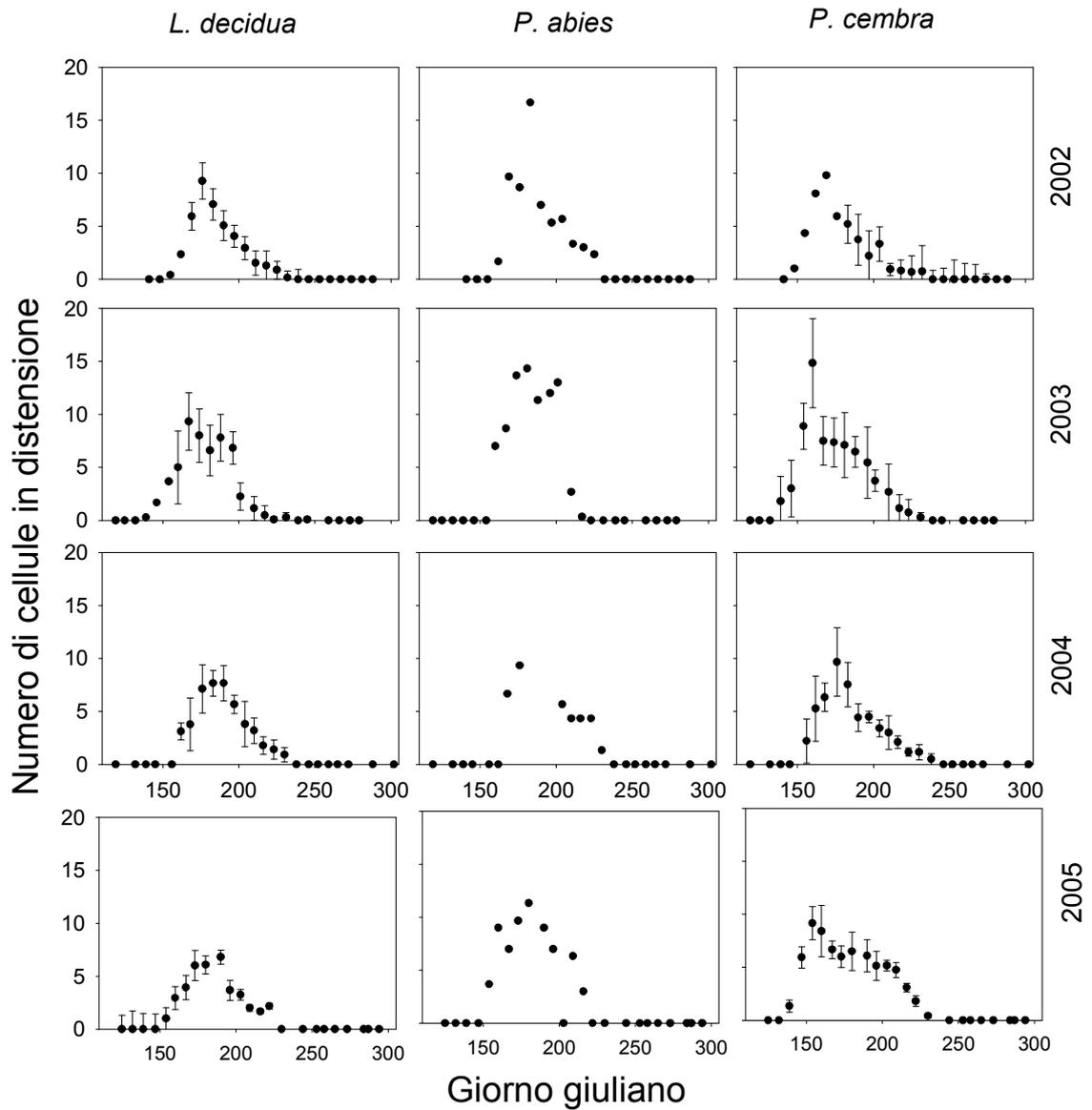


Figura 5: Cellule in distensione di 5T2. I punti e le relative barre verticali rappresentano la media e la deviazione standard per i 5 alberi campionati.

		<i>L. decidua</i>			<i>P. abies</i>			<i>P. cembra</i>		
		Avvio	Inizio	Fine	Avvio	Inizio	Fine	Avvio	Inizio	Fine
		cambio	distensione	distensione	cambio	distensione	distensione	cambio	distensione	distensione
5T1	2002	141	148	230	134	141	246	134	141	246
	2003	125	139	246	125	132	232	125	132	246
	2004	145	156	238	156	162	246	132	145	238
	2005	132	147	253	125	147	244	118	132	222
5T2	2002	148	155	230	148	155	225	141	148	230
	2003	125	139	232	139	139	217	125	139	230
	2004	156	162	230	156	168	230	149	156	238
	2005	154	160	222	147	154	216	132	139	222

Tabella 3: Avvio del cambio (giorni giuliani), inizio e fine della distensione cellulare (giorni giuliani), per le 3 specie (*L. decidua*, *P. abies*, *P. cembra*), per i 2 siti (5T1 e 5T2) nei 3 anni (2002, 2003, 2004).

L'analisi della varianza (ANOVA) ha evidenziato come esistano delle differenze significative tra le 3 specie (ANOVA,  $F=24.00$ ,  $p<0.0001$ ). In generale la prima specie a produrre cellule in differenziazione è stato il cembro in entrambi i siti e in tutti e 3 gli anni. La produzione delle tracheidi nel larice di 5T1 ha avuto inizio 4-14 giorni dopo il cembro e 2-11 giorni prima dell'abete, con l'eccezione del 2002 quando la formazione delle tracheidi degli abeti è iniziata prima di quelle del larice. Le conifere di 5T2, in generale, hanno iniziato la differenziazione circa una settimana prima con il medesimo ordine, prima cembro, poi larice e abete con l'eccezione del 2005 in 5T2 dove l'abete ha iniziato la distensione prima del larice. Tuttavia in questo ultimo caso questo può essere dovuto al fatto che in 5T2 siamo in presenza di un solo individuo di abete rosso.

Nel complesso questa fase ha mostrato una durata variabile da 62 giorni (per i larici di 5T2 nel 2005 e per l'abete di 5T2 nel 2004 e 2005) fino ad un massimo di 114 giorni per i cembri di 5T1 nel 2003. L'anno in cui il periodo con cellule in distensione è stato più lungo è stato il 2003, seguito dal 2002, dal 2005 ed infine dal 2004.

L'abete rosso è stata la specie con la maggiore produttività in fase di distensione cellulare, per il quale sono infatti state osservate contemporaneamente 14 cellule nel sito di 5T1 nel 2002; seguono larice e cembro. In tutte le specie l'inizio della fase di distensione è avvenuto 3-10 giorni prima nel sito con esposizione sud (ANOVA,  $F=16.40$ ,  $p<0.01$ ).

La fase di ispessimento della parete ha avuto un andamento simile a quella della distensione, presentando anch'essa una forma a campana (fig. 5 e 6), l'osservazione della prima cellula in questa fase è avvenuta il 18 maggio, per gli abeti e i cembri di 5T1 nel 2003, ed è terminata il 14 ottobre nei cembri di 5T1 nel 2004 (tab. 4 ). In genere *L. decidua* è la specie che per ultima ha avviato tale fase con l'eccezione del 2004 in 5T1, mentre non sembra esserci una rilevante differenza nell'avvio tra *P. abies* e *P. cembra*, mentre per quanto riguarda i due siti in genere 5T1 ha iniziato l'ispessimento prima di 5T2.

Complessivamente, la durata della fase è variata da un minimo di 76 giorni nei larici di 5T2 nel 2002, ad un massimo di 133 giorni negli abeti rossi e nei cembri di 5T1 nel 2003. Anche in questo caso, l'anno nel quale questa fase ha avuto la durata maggiore è il 2003, seguito però (a differenza della distensione) dal 2005, quindi dal 2004 e dal 2002.

		<i>L. decidua</i>		<i>P. abies</i>		<i>P. cembra</i>	
		Inizio	Fine	Inizio	Fine	Inizio	Fine
5T1	2002	169	265	162	265	162	274
	2003	156	272	139	272	139	272
	2004	162	272	176	272	176	288
	2005	160	273	160	273	154	258
5T2	2002	176	252	162	252	169	260
	2003	162	259	156	246	154	259
	2004	183	265	176	265	176	272
	2005	173	258	173	253	160	253

Tabella 4: Inizio e fine della fase di ispessimento della parete (giorno giuliano).

SI può ipotizzare che la prima cellula che entra in fase di distensione, sia anche la prima ad iniziare il processo di ispessimento della parete. Il tempo che è intercorso tra l'inizio di queste due fasi può essere ritenuto una stima attendibile dei giorni rischiesti

perché una cellula completi la fase di distensione, almeno per quanto riguarda la prima parte della stagione vegetativa (tab. 5).

Giorni che una cellula rimane nella fase di distensione				
		<i>L. decidua</i>	<i>P. abies</i>	<i>P. cembra</i>
5T1	2002	21	21	21
	2003	17	7	7
	2004	6	14	31
	2005	13	13	22
	2002	21	7	21
5T2	2003	23	17	15
	2004	21	8	20
	2005	13	19	21

Tabella 5: Tempo richiesto per una cellula per potersi distendere e completare la prima fase della maturazione cellulare.

Dalla tabella 5 si osserva come il tempo durante il quale una cellula è rimasta in fase di distensione vari da 7 a 31 giorni. Il 2003, in particolare, è stato l'anno nel quale le cellule sono rimaste il minor tempo in questa fase con una media di 14.3 giorni, considerando entrambi i siti e tutte le specie, mentre non sono state riscontrate grosse differenze tra gli altri anni, dove il tempo richiesto è variato tra i 16.6 e i 18.6 giorni. La specie più rapida a completare la distensione di una singola cellula è risultata essere *P. abies* (con una media di 13.2 giorni), seguita da *L. decidua* (16.9 giorni) e *P. cembra* (19.7 giorni). Per quanto riguarda i due siti, invece, mediamente è risultato un solo giorno di differenza per il completamento della fase di distensione, con 16.1 giorni per 5T1 e 17.2 giorni per 5T2.

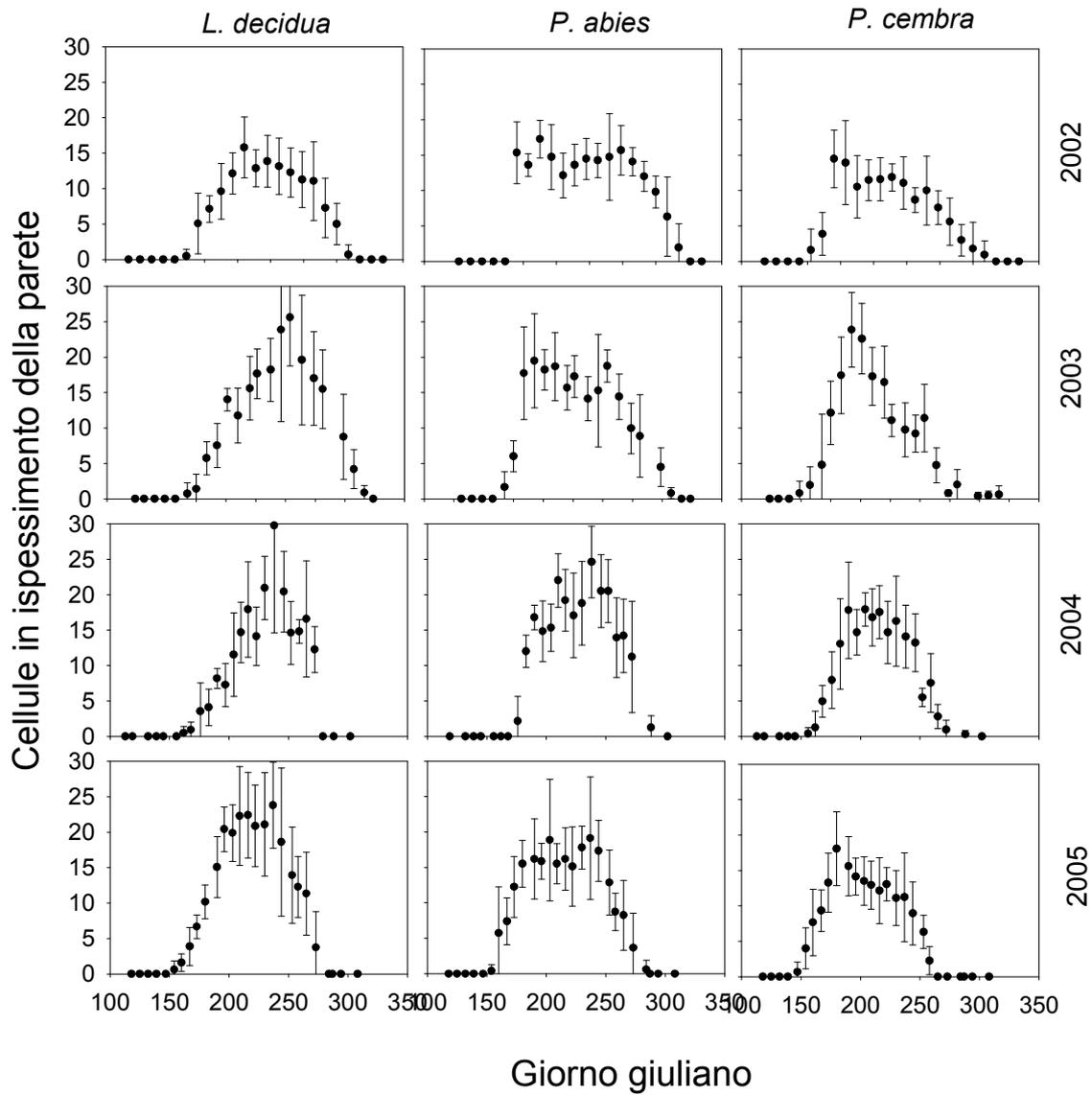


Figura 5: Cellule in ispessimento della parete in 5T1. I punti e le relative barre verticali rappresentano la media e la deviazione standard per i 5 alberi campionati.

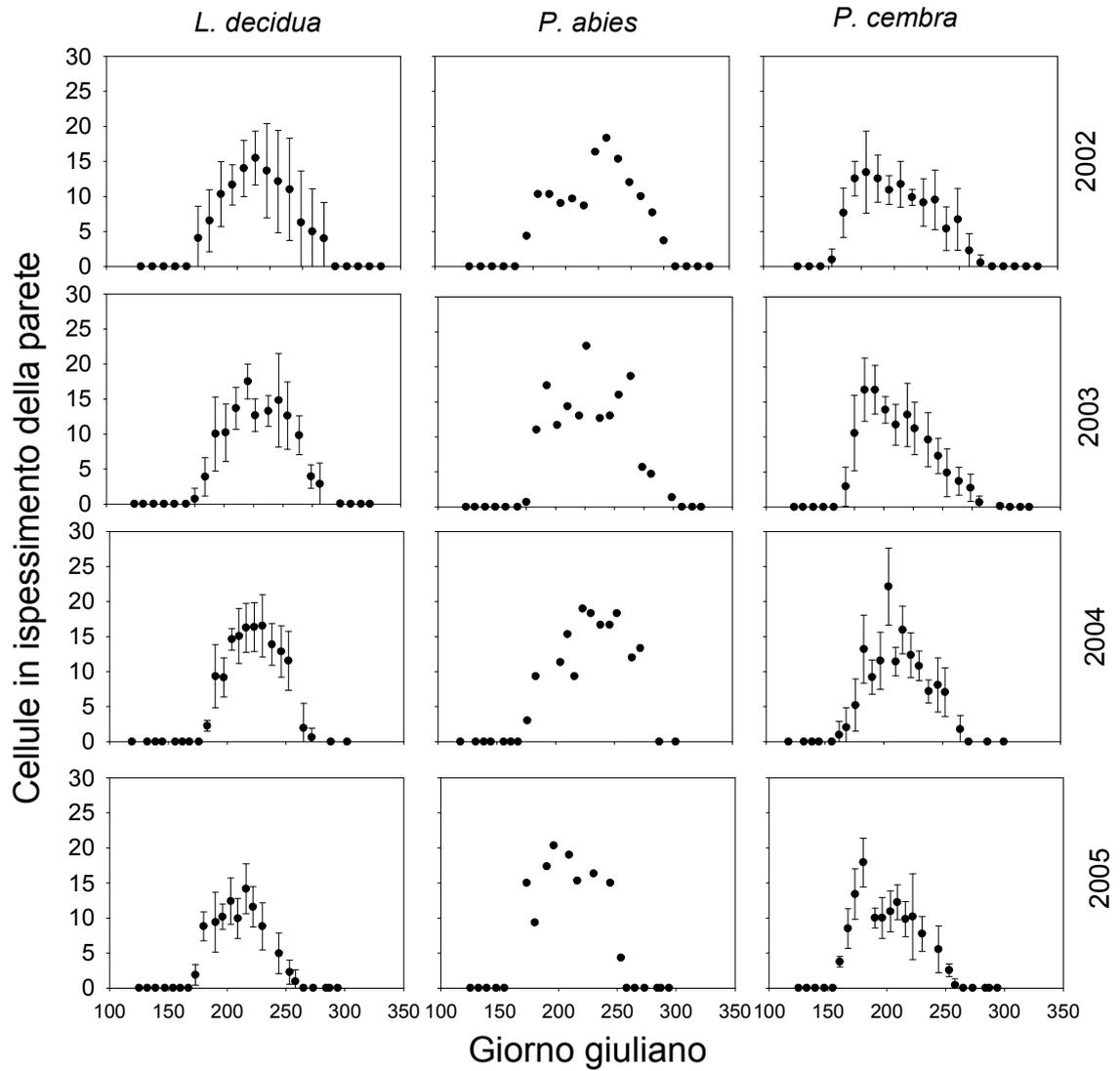


Figura 6: Cellule in ispessimento della parete in 5T2. I punti e le relative barre verticali rappresentano la media e la deviazione standard per i 5 alberi campionati.

La xilogenesi si considera terminata quando non vengono più osservate cellule in ispessimento della parete. La fine della differenziazione cellulare è avvenuta tra l'inizio di settembre e la metà ottobre. Differenze significative nella fine della differenziazione sono state inoltre osservate tra le specie (ANOVA 15.8,  $p < 0.001$ ), con una variazione media di 8 giorni tra cembri e larici e 2 settimane tra cembri e abeti. I cembri inoltre sono stati gli ultimi a terminare l'ispessimento della parete e a completare la xilogenesi, con l'eccezione del 2005 per entrambi i siti. La fase di ispessimento ha avuto termine per tutte le specie prima in 5T2 (ANOVA,  $F=16.05$ ,  $p < 0.001$ ), i larici mostrano la maggiore differenza tra 5T1 e 5T2. Differenze significative sulla fine della differenziazione si sono osservate inoltre tra gli anni (ANOVA,  $F=57.23$ ,  $p < 0.0001$ ), il 2004 si è dimostrato l'anno in cui viene terminata con il maggior ritardo.

La durata della xilogenesi, cioè il periodo di tempo compreso tra la prima cellula in distensione osservata e l'ultima cellula in ispessimento della parete, è variato tra 98 e 140 giorni, con delle differenze significative tra le specie (ANOVA,  $F=20.15$ ,  $p < 0.01$ ), i cembri infatti sono stati gli alberi con il maggior tempo impiegato nella produzione di nuove tracheidi con una media di 125 giorni, seguito da larice e abete rosso. Sono state rilevate anche delle differenze significative tra i 2 siti (ANOVA,  $F=22.15$ ,  $p < 0.001$ ), con una maggiore durata nella formazione dell'anello in 5T1, dove 123.5 giorni sono richiesti per completare la differenziazione. In 5T2 il periodo medio del processo di xilogenesi è di 106.9 giorni. Maggiore stabilità invece si è riscontrata tra gli anni, infatti nel 2002, 2004 e 2005 il tempo necessario per la xilogenesi è stato di circa 114 giorni, mentre nel 2003 questo è stato pari a 127 giorni.

### 1.3.3. Numero di cellule xilematiche mature nell'anello legnoso

L'andamento della variazione delle cellule xilematiche mature nel tempo è stato di tipo sigmoide (fig. 7 e 8), all'inizio del periodo di campionamento non si sono osservate nuove cellule mature prodotte, una volta che vengono osservate cellule in distensione e le prime cellule in ispessimento della parete, dopo 1-2 settimane si sono osservate le cellule mature. Queste ultime sono incrementate continuamente fino ad arrestare la crescita nella parte finale della stagione vegetativa.

Al termine della stagione di crescita delle piante, le 3 specie hanno un diverso numero di cellule all'interno dell'anello legnoso (ANOVA,  $F=9.73$ ,  $p<0.01$ ). Il numero maggiore di tracheidi è stato osservato nell'abete rosso con valori che sono variati da 45, nel 2002 in 5T2, a 76, nel 2002 in 5T1, mentre il numero di cellule xilematiche mature nel larice è variato tra 32, nel 2002 in 5T2, a 51, nel 2003 in 5T1. Un numero minore di cellule è stato prodotto in 5T2 (ANOVA,  $F=7.13$ ,  $p<0.05$ ) con una riduzione del 15.3-30.5% di tracheidi in meno rispetto a 5T1 (57.1 cellule prodotte in 5T1 e 45.5 cellule prodotte in 5T2, prendendo in considerazione tutte e 3 le specie). Il numero finale di cellule varia in modo significativo tra gli anni (ANOVA,  $F=16.77$ ,  $p<0.0001$ ), nel 2002 è stato osservato il numero minore di cellule prodotte, mentre non sembra esserci una differenza tra il 2003 e il 2004. Il massimo numero di cellule prodotte è stato raggiunto dall'abete nel 2004 e dal larice e dal cembro nel 2003.

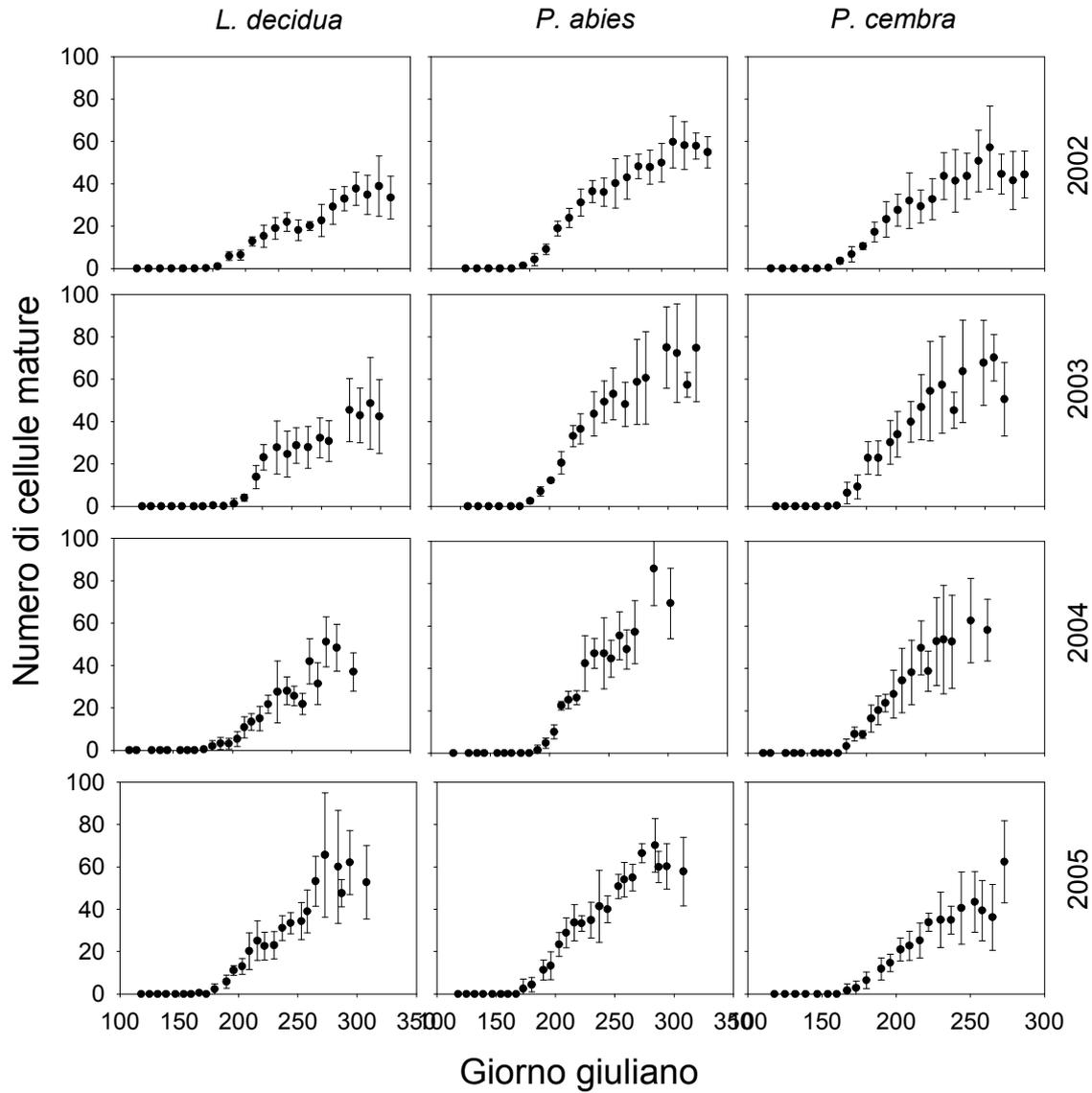


Figura 9: Cellule mature in 5T1. I punti e le relative barre verticali rappresentano la media e la deviazione standard per i 5 alberi campionati.

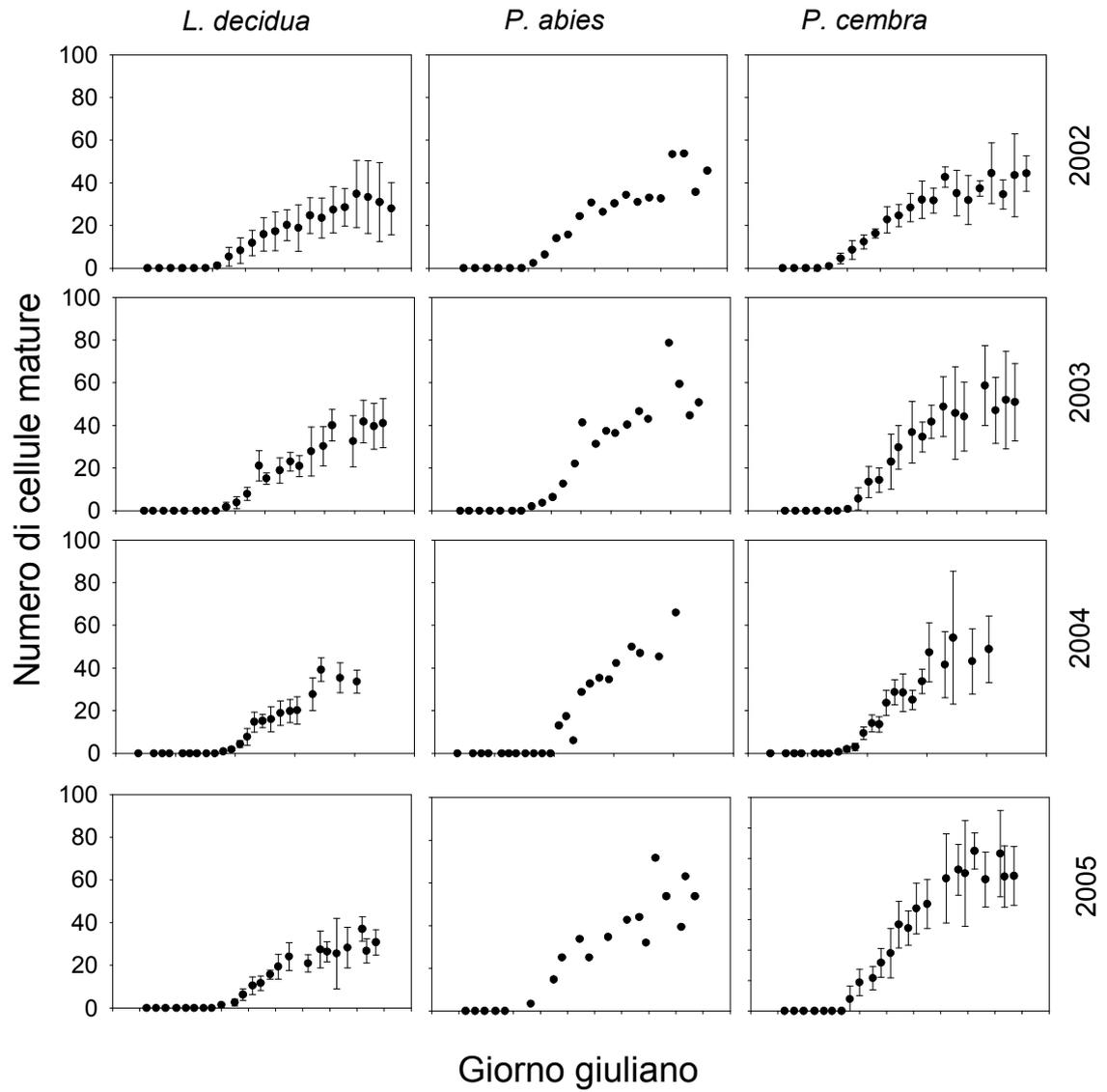


Figura 10: Cellule mature in 5T2. I punti e le relative barre verticali rappresentano la media e la deviazione standard per gli alberi campionati.

## 1.4. Discussione

La crescita dell'anello attraverso la divisione cellulare si verifica in un periodo compreso tra maggio ed agosto, mentre le attività metaboliche connesse con l'ispessimento e la lignificazione continuano fino ad inizio ottobre. Come osservato da Iqbal (1994), le zone cambiali sono considerevolmente più larghe nel primo periodo di formazione dell'anello, quando il ritmo di divisione cellulare è più alto di quello di differenziazione. Quando tuttavia il ritmo di differenziazione sorpassa quello di produzione cellulare (da metà giugno ad agosto), le zone cambiali diventano lentamente più sottili fino a formare il numero minimo di cellule destinate a superare l'inverno in fase di dormienza e a costituire un nuovo anello l'anno successivo (Wilson 1964).

All'avvio della stagione vegetativa non si notano particolari differenze fra le cellule in differenziazione del floema e quelle dello xilema (Oribe *et al.* 2003; Gričar *et al.* 2006), ed in alcuni casi si verifica la formazione prima delle cellule del floema e successivamente dello xilema (Gričar *et al.* 2006).

Sebbene nella zona cambiale dormiente il numero di cellule non sia costante, ma vari da una fila all'altra e tra le piante con scarti di 1-2 cellule, i valori nelle specie studiate possono essere confrontati con quelli di altri studi. Timmel (1980) riporta 6-8 cellule per *P. abies* ed un arresto dell'attività cambiale che avviene a metà settembre nelle Alpi svizzere. Studi più recenti indicano un numero minimo per *P. abies* di 4-5 cellule nelle foreste intorno Ljubljana (Gričar *et al.* 2006). In altre specie un numero minimo di 6 cellule è stato osservato in *Larix laricina* (Mahmood 1971) e 6-10 cellule in *Pinus strobus* (Murmanis 1971).

Tutte le specie oggetto di questo studio hanno mostrato un andamento simile nella dinamica xilogenetica con differenze nell'avvio e nel numero di cellule prodotte a seconda del sito, della specie e dell'anno di analisi. La distensione cellulare si è verificata in un periodo compreso fra maggio e agosto, mentre l'ispessimento della parete continua fino a metà ottobre. L'avvio più precoce nella distensione cellulare è stato osservato per le tracheidi di abete rosso e pino cembro nel 2003 in 5T1. L'avvio delle divisioni cellulari è avvenuto nella stagione quando le temperature di aria e fusto sono ancora basse e si è concluso alla fine di luglio o in agosto quando le temperature raggiungono i loro valori massimi (12-15 °C) (Rossi *et al.* 2007). In particolare Rossi *et al.* (2007) hanno verificato che la xilogenesi abbia inizio quando la temperatura media dell'aria varia tra valori compresi tra 5.6 e 8.5 °C, mentre le temperature del fusto variano tra 7.2 e 9 °C.

Una minore durata dell'attività cambiale viene osservata nel sito con esposizione nord (5T2), dove la produzione cellulare dura per 6-11 settimane. Questi risultati sono simili a quelli evidenziati da Schmitt *et al.* (2004) per il *Pinus sylvestris* in zona di *treeline* in Finlandia dove viene indicato un periodo di accrescimento di 6 settimane. Sebbene la conclusione delle divisioni cellulari indichi la fine della produzione di nuove tracheidi, la formazione dell'anello continua fino in autunno attraverso la fase di ispessimento della parete delle cellule neo-formate. Gli alberi di climi freddi concentrano la formazione dell'anello nella prima parte della stagione vegetativa sincronizzando il massimo della produttività cellulare con il fotoperiodo e massimizzano la produzione xilematica alla fine di giugno quando la lunghezza del giorno è maggiore nell'anno (Rossi *et al.* 2006c). In questo modo, limitando la produzione di nuove cellule durante la tarda estate le piante possono completare la maturazione delle cellule prodotte prima dell'inverno e del sopraggiungere delle basse

temperature, in particolare per permettere il completamento del legno tardivo (Rossi *et al.* 2006a).

Nel larice, nel pino cembro e nell'abete rosso, nelle aree oggetto di studio, la formazione completa dell'anello legnoso varia tra i 100 ed i 140 giorni compresi tra la metà di maggio e l'inizio di ottobre. Questi dati confermano quelli di altri lavori, come ad esempio quelli di Körner e Paulsen (2004), che indicano un periodo di accrescimento stimato tra i 129-139 giorni, ricavato quantificando i giorni nei quali la temperatura del suolo supera i 3.2°C. Lavori condotti su *P. abies* in zona di *treeline* in Svizzera indicano un periodo di crescita del fusto compreso tra l'inizio di giugno e agosto (Müller 1981). Tali risultati sono in linea con quelli di questo studio. Infatti, sebbene i processi metabolici, come visto, continuino fino a ottobre con il processo di ispessimento e lignificazione della parete, l'effettiva crescita radiale, ovvero la formazione del numero di cellule definitivo e la dimensione finale, può essere considerata terminare a fine agosto. Infatti una volta cessate le divisioni cambiali, cioè la neo-formazione di cellule, e una volta avvenuta la fine della distensione, l'accrescimento radiale si considera concluso, in quanto le cellule hanno tutte già raggiunto la grandezza definitiva.

Tra il sito con esposizione sud e quello nord, è stata stimata una riduzione del periodo di attività del cambio di 1-2 settimane in linea con il declino nell'altezza e nell'accrescimento stagionale delle radici che viene osservato lungo il gradiente altitudinale nell'ecotono della *treeline* (Hansen-Bristow 1986; Stevens and Fox 1991; Sveinbjörnsson 2000). Tale riduzione ha portato ad un ritardo di 3-10 giorni nell'avvio della differenziazione e ad un anticipo di 3-20 giorni nella lignificazione ed ispessimento della parete del sito con esposizione nord. La differenza tra le durate di formazione del legno fra il sito 1 ed il sito 2 può essere considerato come la conseguenza,

sia di un ritardo nell'avvio della distensione cellulare, sia di una fine anticipata della fase di lignificazione. Un più precoce inizio della fase di distensione, evidenziato in 5T1, può essere dovuto ad un più precoce scioglimento della neve rispetto a 5T2. Anche le temperature del suolo rivelano simili andamenti: durante il 2002 il forte innalzamento della temperatura del suolo nel sito 2 si è verificato con 10-15 giorni di ritardo rispetto al sito 1 e valori sopra zero sono stati osservati solamente dopo il 13 maggio. Infatti, come riportato anche in altri studi (Wardle 1968; Heikkinen 1985; Graumlich e Brubaker 1986; Hansen-Bristow 1986; Schweingruber 1996; Cairns e Malanson 1998; Vaganov *et al.* 1999; Kirilyanov *et al.* 2003), poichè la temperatura limita fortemente la crescita degli alberi, affinché la crescita radiale possa prendere avvio, il disgelo dello strato superiore del suolo deve essere cominciato (Rossi *et al.* 2007).

Nei 3 anni analizzati sono state riscontrate differenze nella durata della produzione xilogenetica con una variabilità del 15% nel completamento della maturazione cellulare. Le differenze nell'avvio dell'accrescimento non corrispondono necessariamente con differenze nella conclusione della differenziazione. Infatti, si registrano circa  $10 \pm 8.3$  giorni all'avvio della xilogenesi contro  $22 \pm 13.6$  per la conclusione dell'ispessimento e lignificazione della parete cellulare per entrambi i siti. La formazione del legno infatti è un meccanismo complesso che passa attraverso diverse fasi, le cellule prodotte in primavera ed inizio-estate devono, infatti, passare attraverso varie fasi prima di raggiungere la completa maturazione. Inoltre, un'alta produzione cellulare durante l'attività cambiale porta conseguentemente ad un maggior sviluppo di tracheidi (Ford 1978), e prolunga anche la maturazione durante la stagione (Gričar *et al.* 2005).



## **2. Accrescimento radiale giornaliero comparato con le analisi istologiche**

### **2.1. Introduzione**

Nel primo capitolo è stata presentata una delle metodologie usate per analizzare l'accrescimento legnoso intra-annuale. Tuttavia tale tecnica risulta laboriosa in quanto prevede la raccolta settimanale dei campioni e una lunga preparazione in laboratorio dei vetrini ed inoltre l'analisi non è in continuo, ma viene effettuata con scala settimanale. Un'ulteriore tecnica che può essere utilizzata prevede l'utilizzo di dendrometri, che sono degli strumenti che misurano in continuo la variazione dimensionale dei fusti arborei, senza danneggiare la pianta e possono perciò essere utilizzati per misurazioni di lungo periodo (Kuroda e Kiyono 1997). Esistono due tipi di dendrometri: a bindella e a puntale. Il primo tipo misura i cambiamenti nella circonferenza del fusto arboreo, mentre il secondo misura i cambiamenti in un singolo punto sull'albero (Beylea *et al.* 1951; Bormann e Kozlowski 1961; Tardif *et al.* 2001). Entrambi i tipi hanno alcuni vantaggi e svantaggi. I dendrometri a bindella possono dare luogo a errori di misurazione dovuti all'allentamento della bindella (Keeland e Sharitz 1993), mentre il vantaggio nel loro utilizzo è dovuto al fatto che i dati rilevati vengono utilizzati per stimare le variazioni della circonferenza come media della somma dei raggi posizionati intorno al tronco. Invece, i dendrometri a puntale forniscono una misurazione puntuale che può variare, in valore assoluto, a seconda del posizionamento dello strumento lungo il fusto (Bormann e Kozlowski 1961), ma forniscono una stima migliore e più precisa

dell'accrescimento (Kozlowski e Winget 1964). Inoltre, secondo alcuni autori, le principali componenti che causano le variazioni dimensionali sono dovute ai tessuti esterni al cambio, ovvero floema e parenchima (Panterne *et al.* 1998; Zweifel *et al.* 2000). Secondo altri autori, invece, anche lo xilema avrebbe una forte influenza nelle misurazioni ottenute e sarebbe possibile registrarne l'andamento eliminando la parte di corteccia esterna al cambio ed appoggiando lo strumento direttamente sullo xilema (Irvine e Grace 1997; Offenthaler *et al.* 2001; Sevanto *et al.* 2003). Questo metodo risulta però maggiormente invasivo dato che prevede l'asportazione di tali tessuti. Entrambi i tipi di dendrometri presentano tuttavia lo svantaggio determinato dalla difficoltà di interpretazione dei risultati ottenuti. Infatti, oltre alla difficoltà di non poter distinguere tra l'accrescimento dovuto al floema, allo xilema ed al perenchima, l'accrescimento reale può essere confuso con le variazioni dimensionali dovute alla idratazione e reidratazione dei tessuti legnosi (Fraser 1956; Kozlowski e Winget 1964; Abe e Nakai 1999; Tardif *et al.* 2001; Sevanto *et al.* 2003). Nella variazione dimensionale ottenuta con i dendrometri possono essere distinte delle fasi caratteristiche, sia ad intervallo giornaliero, sia annuale. A livello giornaliero, vengono registrate oscillazioni che sono simili a quelle relative al potenziale idrico; generalmente si misurano delle espansioni notturne, dovute alla reidratazione del fusto dovuta all'assorbimento radicale, mentre durante il giorno si osservano delle contrazioni causate dalla disidratazione determinata dalla traspirazione (Kozlowski e Winget 1964; Abe e Nakai 1999; Tardif *et al.* 2001; Sevanto *et al.* 2003). Attraverso la creazione di cicli giornalieri è possibile estrarre il segnale di accrescimento giorno per giorno (Downes *et al.* 2002; Deslauriers *et al.* 2003a). A scala annuale, è possibile osservare differenti stadi della dinamica di accrescimento del fusto, principalmente legati ad una fase produttiva, cioè alla formazione di nuove cellule, e ad una non produttiva,

corrispondente a quando il cambio è ancora dormiente (Zweifel and Häsler, 2000; Tardif *et al.* 2001).

Come visto nel primo capitolo tuttavia, per evitare errori nella misurazione e come suggerito anche da alcuni autori sarebbe consigliabile utilizzare in parallelo con i dendrometri le analisi istologiche, avendo entrambe le tecniche vantaggi e svantaggi (Fraser 1952, 1956; Zahner *et al.* 1964; Tardif *et al.* 2001). L'obiettivo principale di questo capitolo è quello di verificare se la variazione dimensionale ottenuta attraverso i dendrometri sia paragonabile alle analisi istologiche già presentate, anche attraverso l'elaborazione dell'accrescimento attraverso la curva di Gompertz ed effettuando una comparazione statistica, oltre che visiva, dei risultati ottenuti. Infatti sono pochi i lavori in letteratura che hanno messo a confronto queste due metodologie ottenendo in alcuni casi dei risultati discordanti (Ohashi *et al.* 2001; Mäkinen *et al.* 2003).

## 2.2. Materiali e metodi

Per misurare la variazione dimensionale del fusto sono stati utilizzati entrambi i tipi di dendrometri automatici: a puntale e a bindella (tenco Penta S.a.s., Teolo (PD), Italy). Quelli a bindella registrano lo spostamento lineare della fascia (banda) che è posta sopra la corteccia e circonda il fusto. Il principio di funzionamento di questi strumenti è basato sull'uso di un potenziometro lineare: quando il fusto si contrae o si espande, la banda trasmette il segnale al potenziometro con una risoluzione di 6  $\mu\text{m}$ . La frizione tra la corteccia ed il tronco viene ridotta grazie all'utilizzo di fogli di Teflon posti tra i due. I dendrometri a puntale invece misurano lo spostamento lineare nel punto dove lo strumento viene appoggiato sopra la corteccia ed hanno una risoluzione di 0.6  $\mu\text{m}$ . Entrambi i tipi di strumenti sono stati installati sopra la corteccia. Per rendere confrontabili i dati ottenuti dai due tipi di dendrometri è stata calcolata la variazione di raggio da quelli a bindella.

I dati sono stati raccolti ogni 5 minuti, registrati in un *dataloger* (CR10X, Cambell Scientific Corporation) e successivamente mediati con un valore orario.

In entrambi i siti sono stati campionati 2 alberi per ogni specie, tranne che per l'abete rosso di 5T2 essendovi un unico esemplare a disposizione (tab. 2). Tranne che per l'unico abete rosso di 5T2, gli alberi campionati con i dendrometri non sono gli stessi alberi campionati con le microcarote.

Nel 2004 nel sito di 5T1 a causa di un malfunzionamento del *dataloger* non sono disponibili gli ultimi 35 giorni di misurazione.

### 2.2.1. Elaborazioni statistiche

Come già accennato, i dati dei dendrometri forniscono un dato di variazione dimensionale del fusto continuo nel tempo, mentre le microcarote sono state prelevate settimanalmente. Obiettivo di questo lavoro è quello di confrontare i dati di accrescimento radiale ottenuti dai dendrometri e dalle microcarote, motivo per cui queste due tecniche verranno analizzate in parallelo. Per poter rendere comparabili i due dati e analizzare la variabilità, i valori ottenuti dai dendrometri sono stati mediati con un valore settimanale, e le serie di dati ottenute dai due dendrometri sono state mediate tra loro.

L'inizio della stagione vegetativa nell'accrescimento radiale ottenuto con i dendrometri è stata valutata attraverso l'analisi istologica ed è stata fatta partire in corrispondenza del periodo di riattivazione delle divisioni meristematiche. In questo modo, è stato possibile eliminare il fenomeno dell'espansione primaverile dei tessuti legnosi (*swelling*) che porta ad un'espansione del fusto collegata solo a parametri idrici e non ad un reale accrescimento cellulare.

Il confronto tra i dati di variazione dimensionale rilevati con i dendrometri da un lato e con le microcarote dell'altro è stato eseguito attraverso l'utilizzo di una funzione di Gompertz (Winsor 1932). Questa curva ha forma sigmoide asimmetrica che si adatta bene alla crescita radiale intra-annuale (Camarero *et al.* 1998, Deslauriers *et al.* 2003a, Mäkinen *et al.* 2003, Rossi *et al.* 2003, 2006b), com'è risultato anche dall'analisi dell'errore standard, dei residui e dell' $R^2$  (Zhang 1997; Rossi *et al.* 2003). Per l'elaborazione della curva è stata utilizzata la procedura NLIN (NonLINear regression, Marquardt iterative option) del pacchetto statistico di SAS v 8.2 (SAS Institute Inc. 1994, 2001).

La funzione di Gompertz può essere così rappresentata (Rossi *et al.* 2003):

$$y = A \exp[-e^{(\beta - \kappa x)}]$$

Dove:

y è la variabile di accrescimento;

x è il tempo;

A è l'asintoto superiore;

$\beta$  è la posizione lungo l'asse delle x;

$\kappa$  determina la forma della curva.

Poiché per i dendrometri si ha un parametro di accrescimento in mm e per le microcarote in numerosità cellulare, i valori di accrescimento sono stati riportati in percentuale, in modo da poter considerare le due curve nello stesso grafico.

Gli *outlier* sono stati eliminati attraverso la procedura del *t-student residual* (Motulsky and Christopoulos 2003).

La variazione radiale del fusto è stata mediata con valori settimanali in modo da poter confrontare le due curve ottenute, così come sono stati mediati i 5 alberi dal campionamento eseguito con le microcarote. L'avvio della stagione vegetativa, e quindi la partenza della curva, nel dato di variazione dimensionale, è stata fatta coincidere con la data di inizio delle divisioni meristematiche. In questo modo è stato possibile eliminare il disturbo causato dall'espansione primaverile (*swelling*).

Per confrontare le curve di accrescimento realizzate con i due metodi sono stati messi a confronto i parametri,  $\beta$  e  $\kappa$ , ottenuti dalla funzione di Gompertz,  $\beta$  e  $\kappa$ , utilizzando il test Z (Zar 1999):

$$z = \frac{\text{Parametro}_1 - \text{Parametro}_2}{(s_1^2 + s_2^2)^{1/2}}$$

Dove:

$z$  è il valore della statistica;

$s^2$  è la varianza;

I parametri 1 e 2 sono i parametri ottenuti dalla funzione di Gompertz calcolata sulle serie di dati e quindi rispettivamente  $\kappa_1$  e  $\kappa_2$  e  $\beta_1$  e  $\beta_2$ .

Il valore di  $z$  ottenuto è stato confrontato con il valore tabulare; l'ipotesi nulla è che le popolazioni siano uguali, mentre l'ipotesi alternativa è che siano differenti. Se il valore di  $z$  ottenuto dalla formula è superiore a quello tabulare al 95% allora la prima ipotesi viene rifiutata e si assume che i due parametri confrontati siano diversi in modo significativo (Zar 1999).

## 2.3. Risultati

### 2.3.1. Comparazione tra la variazione dimensionale del fusto ed i dati istologici

L'andamento della variazione radiale misurata attraverso l'uso dei dendrometri è stato simile per entrambi i siti e per tutte e 3 le specie studiate. In figura 1 e 2 vengono riportati i dati di accrescimento volumetrico per le 3 specie in esame nei 3 anni di analisi, per 5T1 (fig. 1) e 5T2 (fig. 2). Nel dettaglio, per tutti i casi analizzati si evidenzia un andamento sigmoide dell'accrescimento radiale con espansioni e contrazioni del diametro radiale durante i primi mesi dell'anno ed in quelli finali. Come si potrebbe in prima analisi affermare da questi dati un sensibile aumento della variazione radiale si è verificato tra marzo e aprile, mentre nel primo autunno la distribuzione dei dati ha mostrato un appiattimento. Nei mesi successivi si può notare un andamento lievemente decrescente fino alla fine di dicembre. Nel caso del cembro si 5T1 nel 2002 il grafico mostra apparentemente un andamento diverso da quello sopra descritto, che è tuttavia dovuto semplicemente all'effetto della scala scelta. Come già accennato nel capitolo relativo a materiali e metodi (cap. 3.2) nel primo sito nel 2004 si osserva che non sono disponibili i dati degli ultimi 35 giorni dell'anno (fig. 1 e fig. 5).

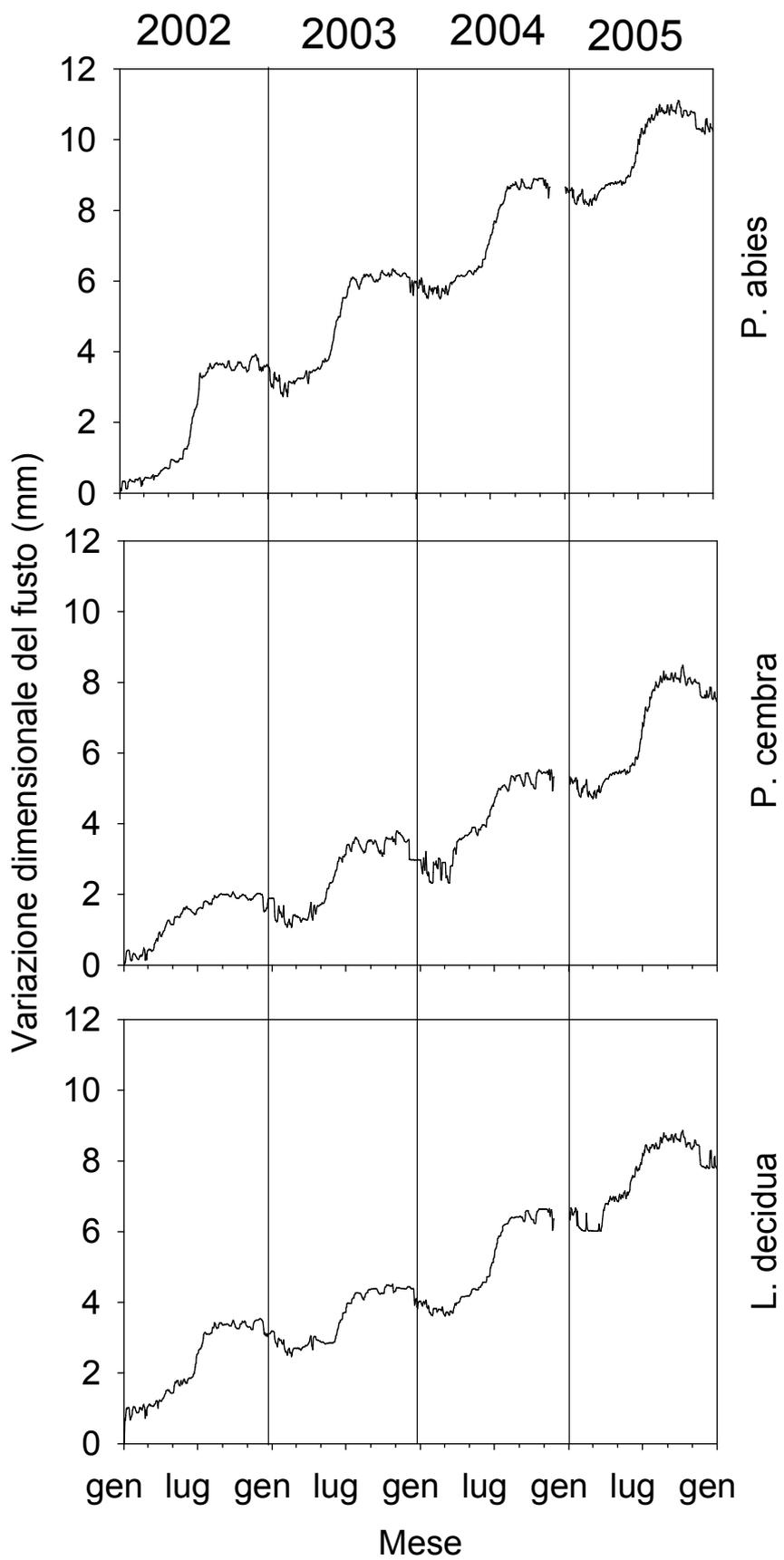


Figura 1: Accrescimento radiale del fusto rilevato dai dendrometri, nei 3 anni e per le 3 specie di 5T1

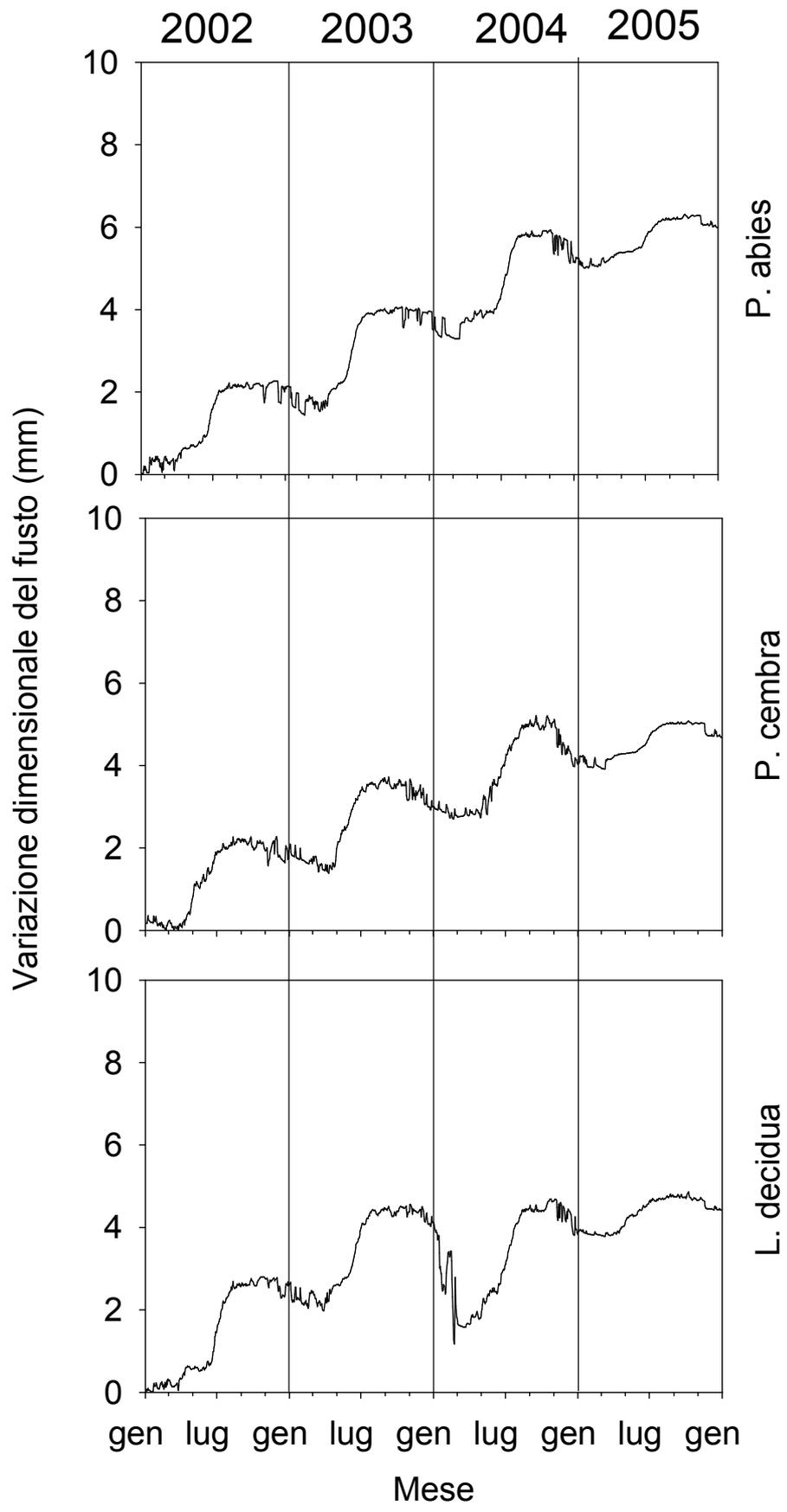


Figura 2: Accrescimento radiale del fusto rilevato dai dendrometri, nei 3 anni e per le 3 specie di 5T2.

Tuttavia tali dati sono nettamente in contrasto con i dati di accrescimento riportati nel precedente capitolo, dove si è visto che l'avvio della stagione vegetativa ha avuto inizio molto dopo rispetto a quanto si può osservare tramite questi grafici. Quindi per chiarire meglio l'andamento annuale della variazione dimensionale misurata con i dendrometri, sotto viene riportato l'esempio specifico del *L. decidua* di 5T2 nel 2002 (fig. 3). Nell'esempio si possono evidenziare i risultati precedentemente descritti, ma è possibile notare come l'individuazione dell'esatto momento di avvio della stagione vegetativa non sia semplice e neppure oggettiva. Infatti, secondo quanto si può osservare in figura 3, l'avvio della stagione vegetativa potrebbe essere datato tra l'inizio di aprile e metà maggio. Per poter chiarire tale incertezza, i dati del dendrometro sono stati rivisti alla luce dei dati di laboratorio ottenuti dall'analisi delle microcarote. In tal modo è stato possibile individuare l'inizio delle divisioni meristematiche del cambio (indicata dalla freccia in fig. 4) e la durata della fase di distensione, cioè la prima e l'ultima cellula osservate in tale fase (area in grigio di fig. 4).

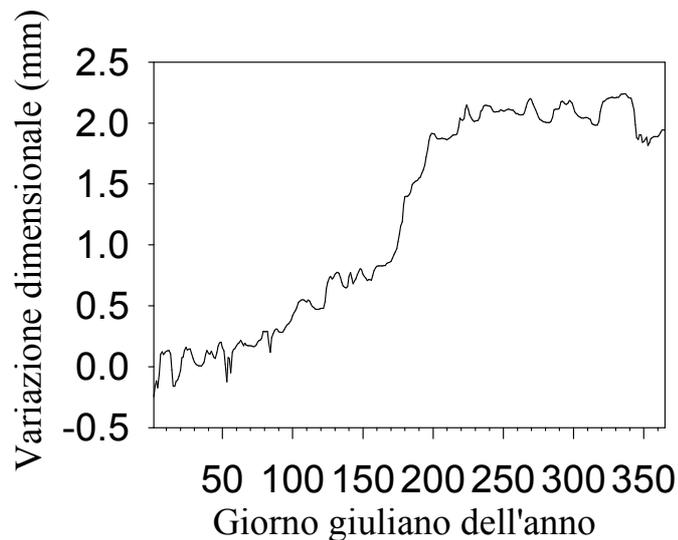


Figura 3: esempio della variazione dimensionale del fusto rilevato dai dendrometri in mm, nel larice di 5T2 nel 2002.

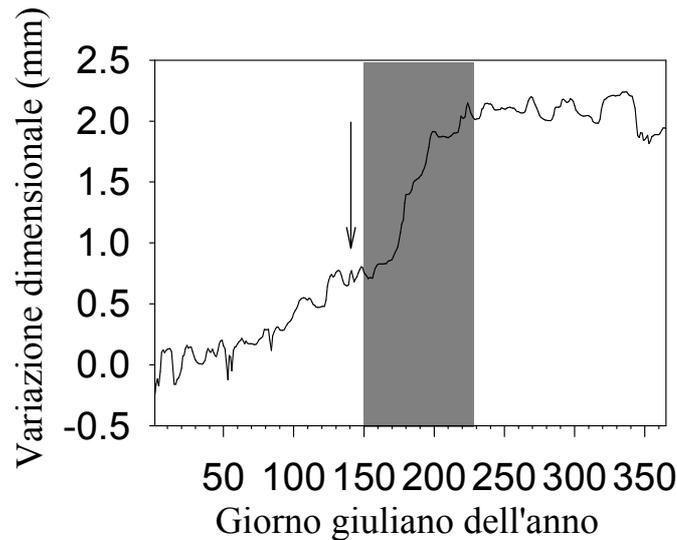


Figura 4: Esempio della variazione dimensionale del fusto rilevato dai dendrometri, nel larice di 5T2 nel 2002. La freccia indica il periodo di inizio dell'attività cambiale. L'area in grigio rappresenta l'inizio e la fine della distensione cellulare.

Mettendo quindi insieme i dati grezzi del dendrometro con quelli delle microcarote, si evince come la variazione dimensionale rilevata dal dendrometro sia in realtà dovuta a diversi fenomeni non sempre facilmente distinguibili. Da gennaio a fine marzo-inizio aprile, sono state osservate delle espansioni e delle contrazioni che, sapendo che il cambio non è ancora attivo poiché dai dati di accrescimento si conosce che la stagione vegetativa inizia dopo, non appaiono essere dovute ad una fase di produzione cellulare. In primavera, si rileva una fase di espansione nel dato della variazione dimensionale. Tuttavia, confrontando ancora una volta questo dato con quello derivato dalle microcarote, si evince come questo non sia in realtà un accrescimento cellulare, poiché avviene prima del riattivarsi del cambio, quando la pianta è ancora in riposo vegetativo. Tramite l'utilizzo delle microcarote, in figura 4 è possibile evidenziare nel dato della variazione dimensionale l'inizio dell'accrescimento reale. Quindi nella variazione dimensionale, senza l'ausilio delle analisi istologica, non risulta possibile identificare con precisione l'inizio della stagione vegetativa, mentre una certa corrispondenza si trova tra la fine della distensione e la fine dell'accrescimento radiale misurato per

mezzo dei dendrometri. Successivamente, finita la fase di distensione cellulare, le variazioni radiali misurate dal dendrometro ancora una volta non sono dovute a variazioni di accrescimento cellulare. Nella parte finale della figura si osservano delle contrazioni che possono essere graduali o abbastanza brusche, come nel caso del cembro di 5T2 nel 2004.

Nella figura 5 si riporta la visione d'insieme relativa alla comparazione dei dati rilevati con le 2 tecniche, per 3 specie, i 3 anni e i 2 siti analizzati. Come si può notare, l'accrescimento è stato fatto partire da zero dal momento in cui si avvia l'attività cambiale e per tutti i casi si possono osservare le fasi precedentemente descritte. In questo caso si è ottenuto un dato molto più preciso e privo di errori rispetto a quello di figura 1 e 2. Mettendo a confronto i dati di variazione dimensionale radiale ottenuti dai dendrometri (fig. 5 e 6) con quelli delle microcarote (Capitolo 1, fig. 9-10) si sono ottenuti risultati analoghi. In entrambi i casi la forma della curva è stata di tipo sigmoideale, vi sono state inoltre delle differenze tra le specie i siti e gli anni. La specie con l'accrescimento maggiore è stata *P. abies* con un accrescimento che è variato da 2.72 mm nel 2002 in 5T1 a 1.31 mm nel 2002 in 5T2, seguito da *L. decidua* con una variazione di accrescimento radiale annuale che è andato da un massimo di 1.99 in 5T1 nel 2004 ad un minimo di 1.44 nel 2002 in 5T1, mentre per il *P. cembra* è variato da 1.75 nel 2003 in 5T1 a 0.63 nel 2002 di 5T1. Questi dati sono simili a quelli rilevati con le microcarote con l'eccezione del cembro di 5T1 nel 2002 dove si è registrato un minore accrescimento nel dato delle microcarote e nei larici di 5T2 nel 2002 e 2004 dove invece le microcarote hanno mostrato una maggiore crescita. Anche per quanto riguarda le differenze nei vari anni i dati sono in linea con quelli riscontrati per le microcarote dove l'anno con la crescita minore è stato il 2002, mentre non sono state

evidenziate differenze significative tra il 2003 e 2004. Anche per quanto riguarda la differenza tra i due siti si è stato verificato che 5T2 è meno produttivo di 5T1.

Un dato importante che si riscontra è quello relativo alla corrispondenza tra il termine della fasi di distensione cellulare e fine dell'accrescimento radiale in tutti i casi.

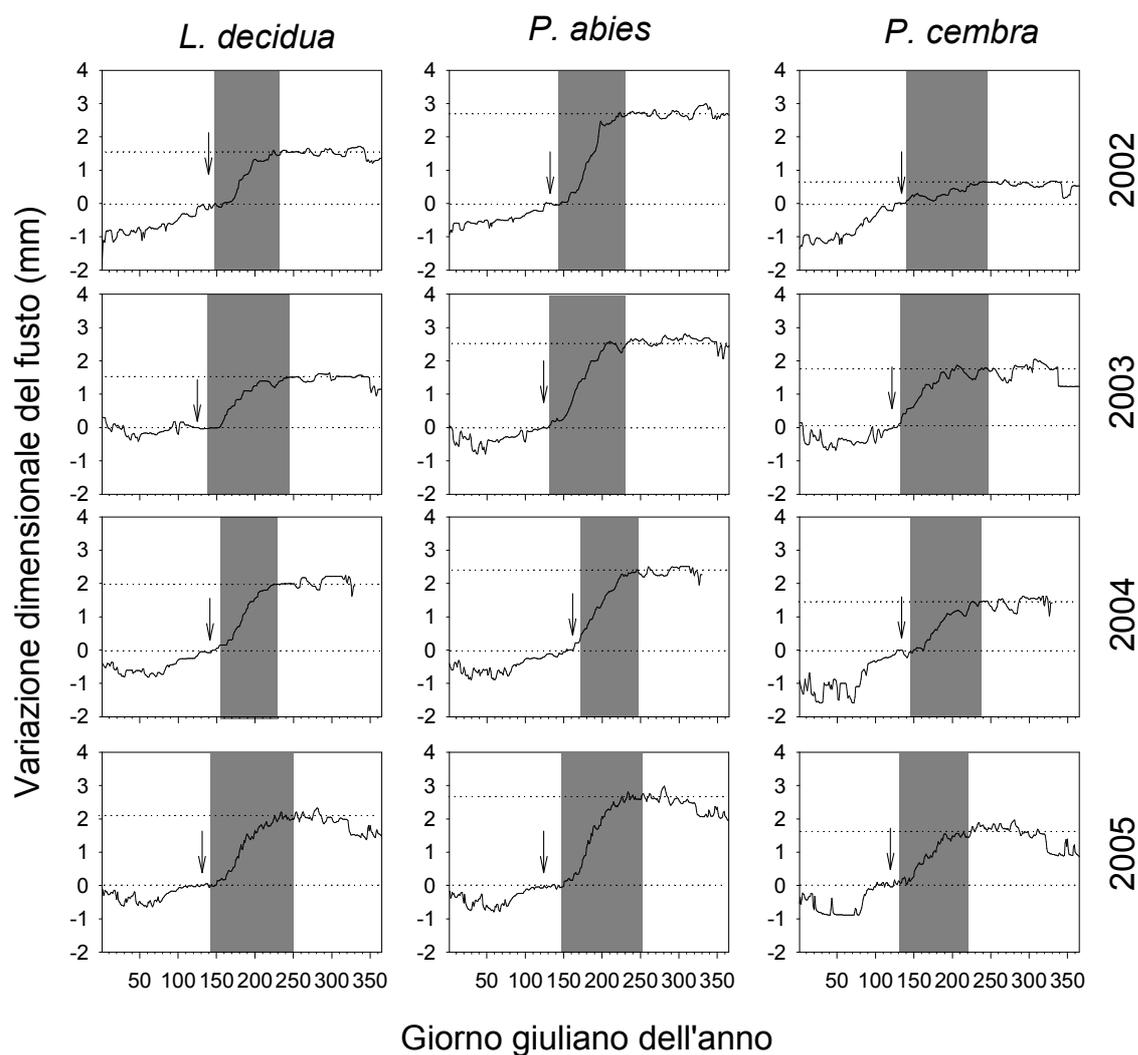


Figura 5: Variazione dimensionale annuale misurata con i dendrometri in 5T1. La freccia indica l'inizio dell'attività cambiale. L'area in grigio rappresenta il periodo di distensione cellulare. La linea tratteggiata orizzontale rappresenta l'accrescimento radiale.

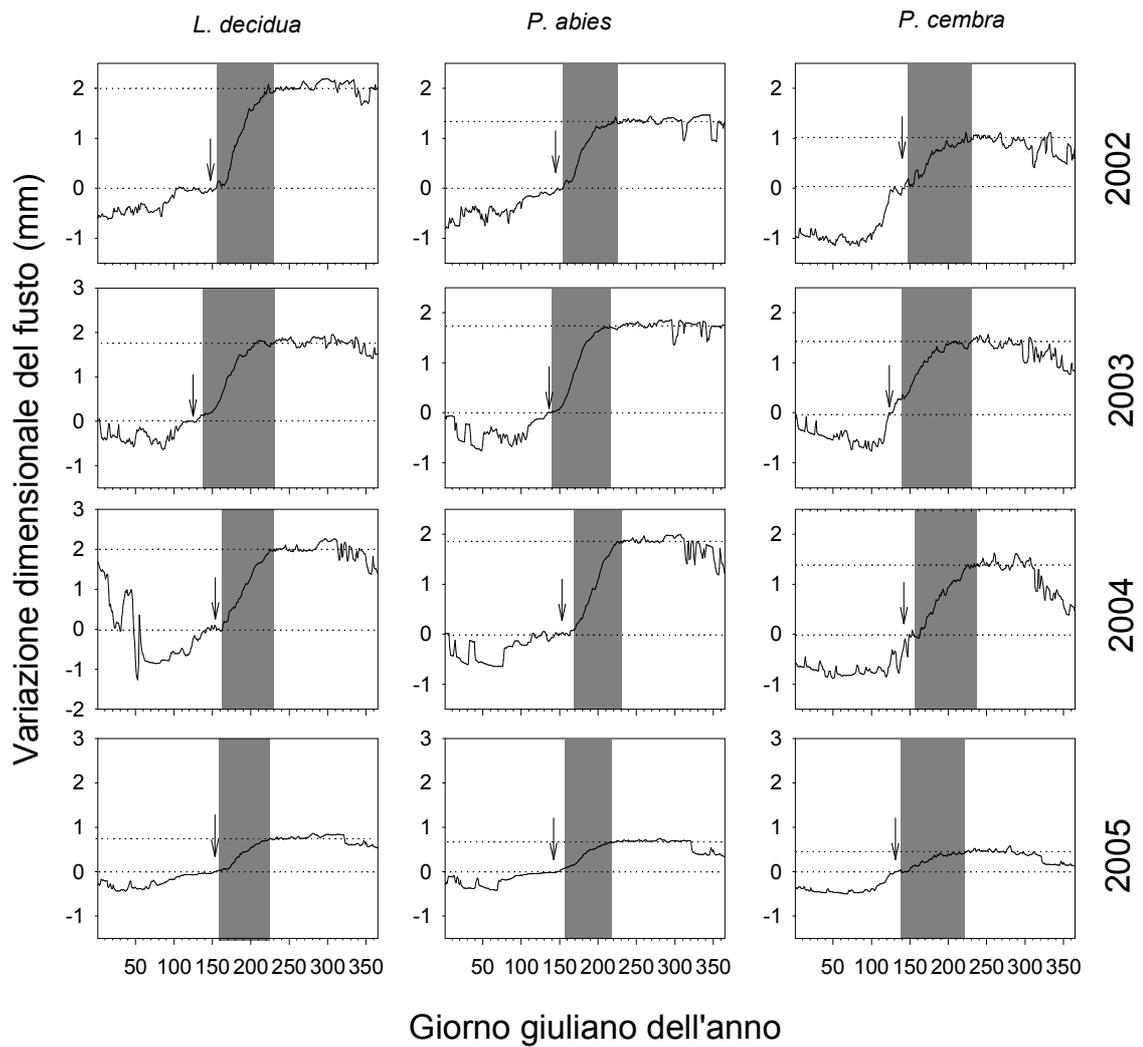


Figura 6: Variazione dimensionale annuale misurata con i dendrometri in 5T2. La freccia indica l'inizio dell'attività cambiale. L'area in grigio rappresenta il periodo di distensione cellulare. La linea tratteggiata orizzontale rappresenta l'accrescimento radiale.

### 2.3.2. Utilizzo della modellizzazione di Gompertz nel dato di accrescimento misurato attraverso i dendrometri e le microcarote

Al fine di evidenziare eventuali differenze nella descrizione dell'accrescimento radiale fornita dai dendrometri da un lato e dalle microcarote dall'altro, le serie di dati rilevate dalle due metodologie sono state elaborate attraverso la funzione di Gompertz (fig. 7 e 8). La figura mostra come in tutti i casi le curve di accrescimento descritte dai due metodi abbiano la stessa forma e come siano in molti casi praticamente sovrapposte. I dati sono stati riportati in percentuale per i dendrometri e per le microcarote sono state utilizzate le cellule totali (somma delle cellule in distensione, in ispessimento della parete e cellule mature). Come già visto l'andamento è stato di tipo sigmoide, si è verificato un lento accrescimento fino all'inizio di giugno, successivamente questo è aumentato per poi arrestarsi nuovamente a metà ottobre circa. L'errore standard medio delle 18 curve è stato del 10%, tuttavia la variabilità è risultata minore nei dendrometri (7.7%) rispetto alle microcarote (12.9%). La comparazione finale delle curve è stata effettuata attraverso l'analisi dei parametri  $\beta$  e  $\kappa$  e in nessun caso si sono riscontrate differenze significative, dimostrando come la forma dell'accrescimento e l'avvio siano uguali in tutti i casi (tab. 1). Il parametro  $\beta$  per le microcarote è variato da 5.28 a 13.9, mentre per il dendrometro è variato tra 5.11 e 15.32. Il parametro  $\kappa$  in entrambi i casi è variato tra 0.031 e 0.083.

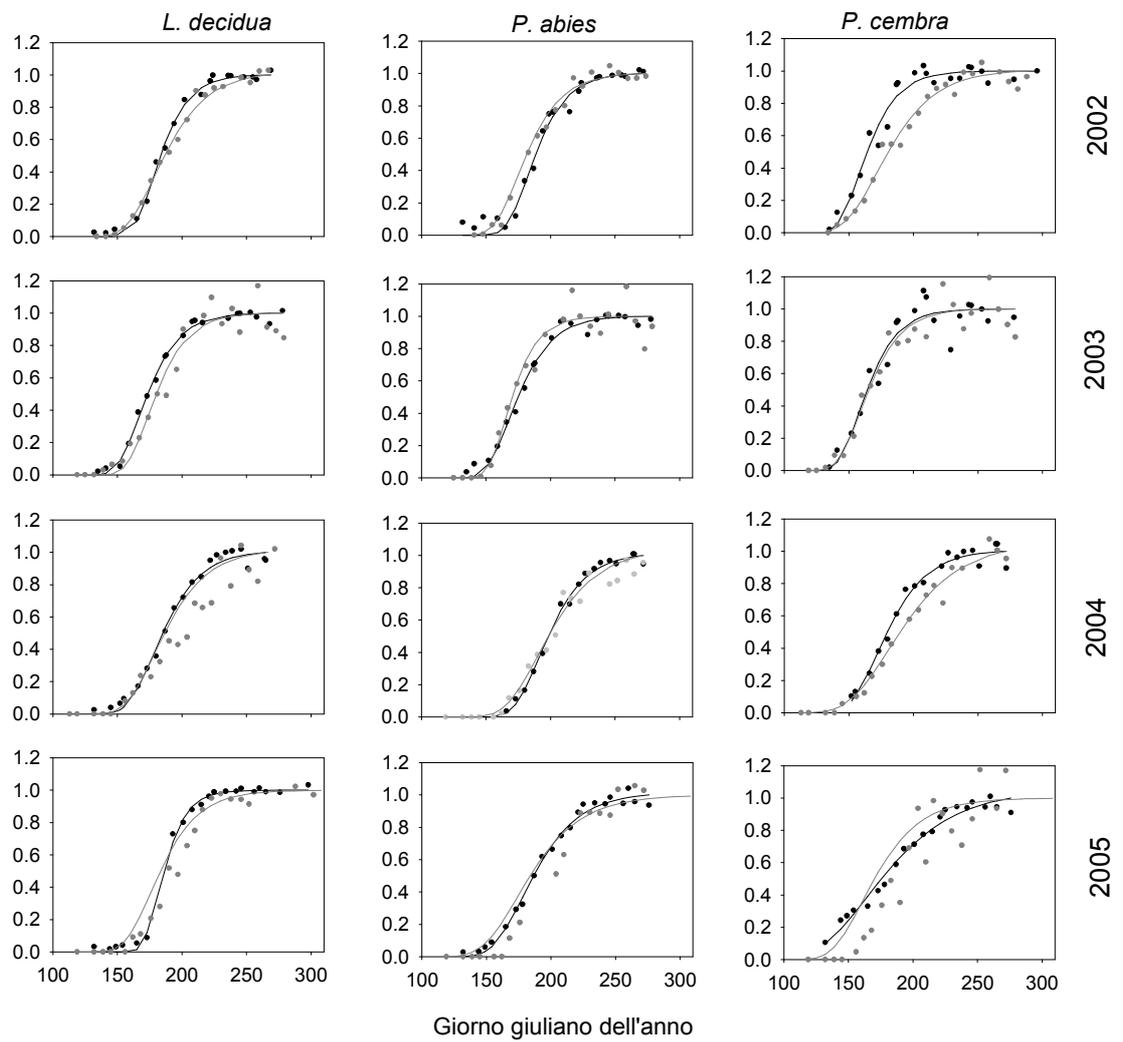


Figura 7: Accrescimento radiale percentuale di microcarote (punti in grigio) e dei dendrometri (punti in nero) e relative curva di Gompertz (in grigio per le microcarote e in nero per i dendrometri).

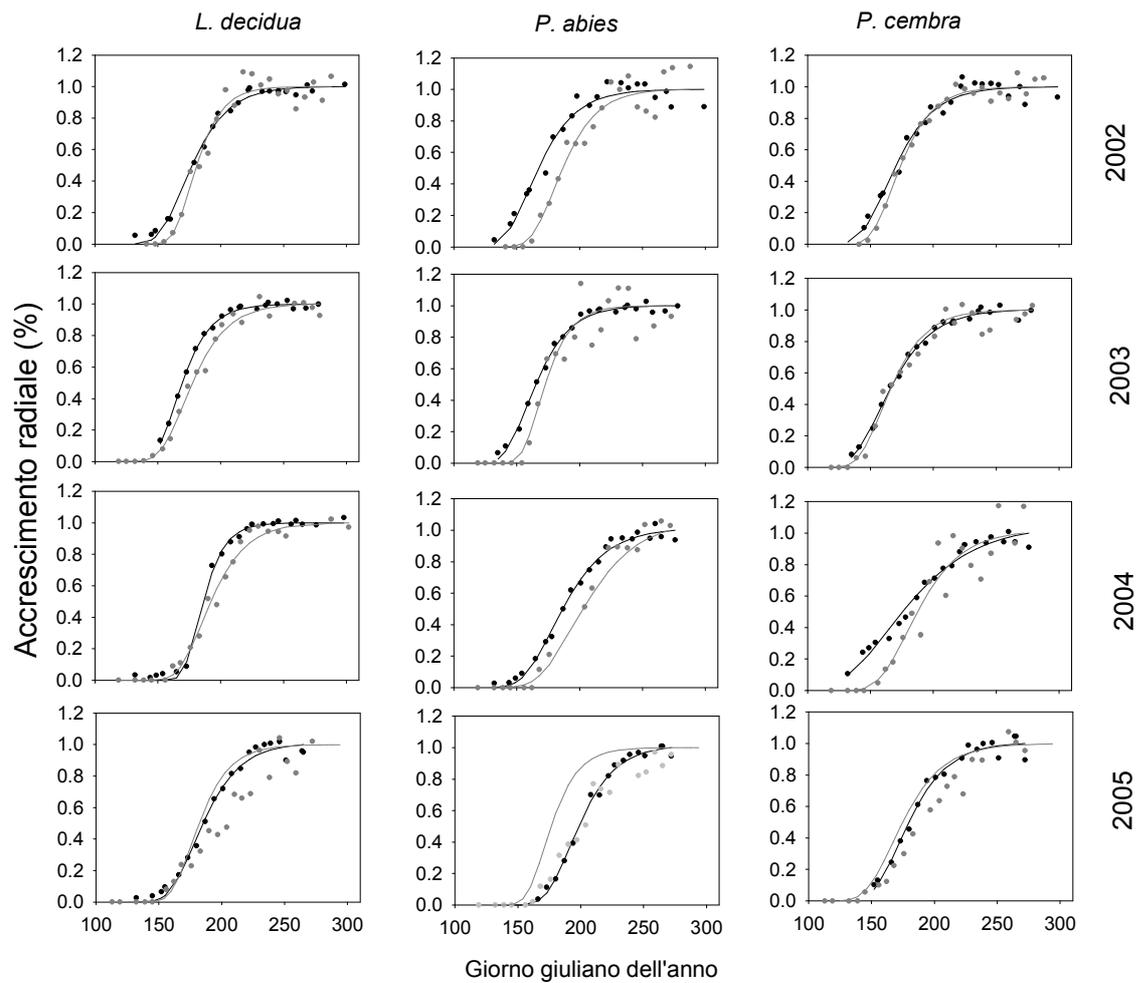


Figura 8: Accrescimento radiale percentuale di microcarote (punti in grigio) e dei dendrometri (punti in nero) e relative curva di Gompertz (in grigio per le microcarote e in nero per i dendrometri).

Sito	Anno	Specie	$\beta$ MC	$\beta$ D	K MC ( $10^{-2}$ )	K D ( $10^{-2}$ )	TestZ K	TestZ $\beta$
5T1	2002	<i>L. decidua</i>	7.57(0.71)	13.77(1.11)	4.2(0.27)	7.8(0.63)	-0.39	-1.21
		<i>P. abies</i>	7.07(0.72)	12.55(1.01)	5.5(0.47)	7.0(0.61)	0.62	0.55
		<i>P. cembra</i>	9.85(0.84)	11.48(1.27)	4.1(0.42)	6.3(0.69)	-0.08	-0.66
	2003	<i>L. decidua</i>	9.35(1.79)	9.51(0.65)	5.3(1.0)	5.7(0.39)	-0.002	-0.20
		<i>P. abies</i>	11.1(2.15)	8.88(0.74)	6.7(1.3)	5.3(0.44)	0.022	0.60
		<i>P. cembra</i>	9.02(1.69)	8.47(1.64)	5.6(1.1)	5.4(1.0)	0.007	0.04
	2004	<i>L. decidua</i>	5.28(0.77)	8.48(0.75)	2.7(0.43)	4.7(0.43)	-0.19	-0.32
		<i>P. abies</i>	8.07(0.89)	8.06(0.63)	4.3(0.48)	4.6(0.34)	0.0005	-0.046
		<i>P. cembra</i>	5.65(0.48)	7.46(0.34)	3.1(0.27)	4.3(0.2)	-0.27	-1.43
	2005	<i>L. decidua</i>	8.71(3.2)	10.79(2.1)	4.9(0.89)	6.0(0.24)	-1.95	-0.58
		<i>P. abies</i>	6.43(2.2)	8.5(1.7)	3.7(0.58)	4.8(0.32)	-1.60	-1.09
		<i>P. cembra</i>	6.73(3.5)	8.7(1.9)	4.1(0.42)	5.3(0.36)	-1.38	-0.61

Tab 1: Valori dei paraetri  $\beta$  e  $\kappa$  e dell'errore standard (tra parentesi) ottenuti dalla curva di Gompertz per microcarote (MC) e dendrometri (D) in 5T1.

Sito	Anno	Specie	$\beta$ MC	$\beta$ D	K MC ( $10^{-2}$ )	K D ( $10^{-2}$ )	TestZ K	TestZ $\beta$
5T2	2002	<i>L. decidua</i>	12.75(2.03)	8.74(0.46)	7.2(1.1)	5.1(0.27)	0.043	1.37
		<i>P. abies</i>	8.76(1.58)	9.13(1.28)	4.9(0.87)	5.6(0.78)	-0.006	-0.18
		<i>P. cembra</i>	9.61(0.86)	8.17(0.81)	5.7(0.51)	4.9(0.48)	0.071	0.35
	2003	<i>L. decidua</i>	9.42(0.82)	10.99(0.43)	5.5(0.48)	6.7(0.26)	-0.098	-1.01
		<i>P. abies</i>	13.9(3.57)	8.68(0.43)	8.3(2.1)	5.5(0.27)	0.018	1.28
		<i>P. cembra</i>	8.31(1.07)	7.32(0.39)	5.2(0.67)	4.6(0.24)	0.038	0.51
	2004	<i>L. decidua</i>	9.64(0.93)	15.32(0.87)	5.2(0.51)	8.3(0.46)	-0.26	-1.51
		<i>P. abies</i>	6.98(0.65)	8.28(0.74)	3.6(0.34)	4.6(0.41)	-0.12	-0.53
		<i>P. cembra</i>	7.64(1.74)	5.11(0.58)	4.3(0.98)	3.1(0.36)	0.035	0.64
	2005	<i>L. decidua</i>	10.7(3.4)	10.36(0.51)	6.1(0.41)	5.9(0.27)	0.10	0.32
		<i>P. abies</i>	11.76(4.4)	10.24(0.83)	6.8(1.1)	6.0(0.48)	0.06	0.77
		<i>P. cembra</i>	7.69(3.12)	10.57(0.68)	4.6(0.82)	6.2(0.6)	-0.82	-1.2

Tab 1: Valori dei paraetri  $\beta$  e  $\kappa$  e dell'errore standard (tra parentesi) ottenuti dalla curva di Gompertz per microcarote (MC) e dendrometri (D) in 5T2.

## 2.4. Discussione

Il solo utilizzo dei dendrometri non può essere utilizzato per indicare con precisione l'inizio della stagione vegetativa. Il dato misurato dai dendrometri infatti è stato fortemente influenzato dall'idratazione del fusto legnoso che crea un disturbo, specialmente nella prima parte della stagione. Infatti, il dendrometro non ha permesso di distinguere l'inizio dell'attività meristemica risultante dal cambio e/o dal fellogeno, né di differenziare la parte di nuove cellule del floema rispetto alle nuove cellule dello xilema. Quindi i dati registrati non sono altro che la somma della produzione delle espansioni e contrazioni dovute allo stato idrico del tronco e della deposizione di nuove cellule di xilema, floema e periderma (Belyea *et al.* 1951; Fraser 1952; Kramer e Kozlowski 1979).

L'avvio dell'accrescimento, all'inizio della primavera, può essere confuso con la reidratazione dei tessuti legnosi che avviene prima della reale riattivazione del cambio. Dai dati presi in esame, si è osservato come l'inizio dell'espansione misurata sia avvenuta alcune settimane prima del reale riattivarsi del cambio e sia dovuto solamente alla reidratazione del fusto legnoso. Inoltre in molti lavori si è osservato come in alcuni casi la produzione di nuove cellule floematiche preceda quello della cellule xilematiche (Oribe *et al.* 2003, Gricar *et al.* 2006). Nonostante le limitazioni discusse e la necessità di controllare l'avvio della stagione vegetativa con i dati istologici, sembra tuttavia esserci stata una corrispondenza tra la fine del periodo di distensione cellulare e la fine dell'accrescimento, fatto dovuto al minor disturbo dei parametri idrici nel fusto.

In base a questi presupposti, e con l'utilizzo dei dati istologici, 3 diverse fasi, come riscontrato anche in altri lavori (Belyea 1951; Zweifel e Häsler 2000; Tardif *et al.* 2001), possono essere osservate nella variazione diametrica del fusto misurata mediante

l'utilizzo dei dendrometri. Due di queste non sono legate ad un reale accrescimento del fusto. La prima fase si osserva alla fine dell'inverno e l'inizio primavera ed è un periodo di espansione diametrica legato alla reidratazione del fusto legnoso, che precede la reale riattivazione del cambio. La seconda fase corrisponde alla produzione di nuove cellule xilematiche, mentre la terza, che avviene in inverno, mostra un andamento negativo nel dato di variazione dimensionale legato alla disidratazione dei tessuti legnosi (Zweifel e Häsler 2000). L'inizio della stagione vegetativa prende avvio con il riattivarsi delle divisioni cambiali e successivamente queste nuove cellule prodotte entrano in differenziazione, da un lato diventano cellule in formazione del floema e dall'altro in formazione dello xilema. La quantità di cellule cambiali è variata tra 6-10 fino ad un massimo di 10-14 durante il picco produttivo, tuttavia il contributo di tali cellule non sembra essere significativo nel dato dendrometrico, questo sia per il fenomeno dello "swelling", sia perché queste comunque hanno un diametro ridotto e il loro contributo all'incremento diametrico, specie nella prima parte dell'accrescimento, è minimo (Wimmer *et al.* 2002). Per questo motivo, l'inizio della stagione vegetativa in questo studio è stato considerato esclusivamente quando hanno avuto inizio le divisioni cambiali. I fattori che influenzano lo spessore dell'anello legnoso sono il numero di cellule prodotte in una fila radiale e la dimensione delle stesse cellule all'interno della fila stessa (Vaganov 1990). Per tale ragione la parte di accrescimento reale è stata evidenziata con l'area in grigio (fig. 5 e 6). Nelle cellule in differenziazione quelle che mostrano un cambiamento in dimensione volumetrica sono infatti le cellule in distensione. Nelle fasi successive, ispessimento della parete e cellula matura, non ci sono ulteriori cambiamenti nel volume cellulare, in quanto ormai è già stata raggiunta la dimensione definitiva e per tale motivo non sono state considerate nel dato di accrescimento dendrometrico. Quindi in definitiva, è stato preso in esame solo il dato

delle cellule in espansione. In questo modo è sembrato esserci una corrispondenza tra la fine della fase di distensione cellulare e la cessazione di accrescimento misurato con il solo dendrometro (fig. 2-3).

In alcuni lavori in letteratura sono stati riscontrati dei valori discordanti sull'accrescimento radiale intra-annuale tramite l'utilizzo di diversi metodi. In particolare delle differenze sono state rilevate da Mäkinen *et al.* (2003), gli autori per effettuare l'analisi di confronto hanno elaborato i dati attraverso la funzione matematica di Gompertz. In tale studio viene riscontrata una maggiore produttività dell'accrescimento misurato attraverso le microcarote rispetto a quello misurato con il dendrometro. Tuttavia, tale differenza può essere spiegata per il fatto che Mäkinen *et al.* (2003) non hanno fatto partire i due modelli allo stesso momento, quindi in realtà il dato di accrescimento radiale, misurato attraverso i dendrometri, viene fatto iniziare prima che sia cominciato il reale accrescimento (circa tra i 60 e gli 80 giorni di anticipo), cioè comprende una fase non produttiva. I due dati in questo modo non risultano confrontabili. In un diverso studio condotto da Ohashi *et al.* (2001), un confronto fra i dati ottenuti attraverso il *pinning method* e i dendrometri ha dato esiti discordanti. In particolare si osserva un accrescimento diametrico maggiore con la prima metodologia, ma come osservano gli autori dell'articolo ciò può essere dovuto alla proliferazione di cellule che avviene a seguito della ferita inferta con l'ago.

### 2.4.1. Conclusioni

Il confronto fra il dato di variazione volumetrica e quello di accrescimento delle microcarote ha evidenziato risultati concordi sia da un punto di vista visivo che statistico. Le microcarote tuttavia si sono dimostrate fondamentali nella prima parte della stagione per verificare con certezza l'avvio della crescita. Tuttavia si sono riscontrate delle corrispondenze anche tra la fine della crescita nel dato di variazione volumetrica con quello della fine della fase di distensione in tutti i casi. Quindi tenendo conto che l'utilizzo delle microcarote prevede una elaborazione molto lunga a causa delle procedure di laboratorio, si potrebbe limitare l'uso di queste ultime solo durante le prime settimane della stagione vegetativa fino a che si è verificato l'inizio della fase di distensione cellulare. Infine tramite il confronto con le analisi istologiche si sono riscontrate delle variazioni caratteristiche nella variazione volumetrica in linea con altri lavori sui dendrometri (Tradif *et al.* 2001).

### **3. Effetti dello stato idrico sulla morfogenesi delle tracheidi nel fusto di semenzali di *Abies balsamea* Mill.**

#### **3.1. Introduzione**

La foresta boreale è uno degli ecosistema forestale più estesi del pianeta, ma l'attuale riscaldamento climatico rischia di influenzare fortemente la fisiologia e la vitalità delle piante che vi appartengono e, conseguentemente, la fisionomia di questo ambiente. Fino ad oggi sono stati condotti numerosi studi sugli effetti di un aumento delle temperature dell'aria sulla capacità di crescita degli alberi (Briffa *et al.* 1995; Antonova e Stasova 1997; Körner 1998; Smith *et al.* 2003; Gamache e Payette, 2004; Deslauriers e Morin 2005; Oribe 2006). Poco frequenti sono invece i lavori condotti sui cambiamenti dovuti alle precipitazioni che conducono peraltro a risultati più incerti (Lloyd e Fastie 2002). Sembra comunque assodato che un aumento delle temperature, non associato ad un corrispondente incremento nella quantità di precipitazioni, comporterà un aumento nella frequenza dello stress idrico, ciò potrebbe influenzare in maniera negativa l'accrescimento degli alberi della foresta boreale (Hogg e Hurdle 1995; Barber *et al.* 2000). Generalmente sono due i principali fattori di disturbo della foresta boreale: il fuoco (Bergeron *et al.* 2002) e le pullulazioni di insetti defogliatori (Krause *et al.* 2003). Tuttavia, come visto, anche la disponibilità idrica riveste un ruolo molto importante nello sviluppo dei semenzali di giovani conifere.

In diversi lavori di dendrocronologia viene riportata una riduzione dell'ampiezza dell'anello durante gli anni particolarmente siccitosi (Eilmann *et al.* 2006). Tale riduzione è dovuta alla produzione di tracheidi di minori dimensioni (Corcurea *et al.* 2004) ed in genere ad un tasso inferiore di produzione del cambio (Abe e Nakai 1999). Lo stato idrico di un albero è uno dei fattori chiave nella dinamica xilogenetica e nella produzione legnosa (Downes *et al.* 2002; Wimmer *et al.* 2002; Abe *et al.* 2003; Downes *et al.* 2006) e può essere facilmente rappresentato attraverso il potenziale idrico delle cellule dello xilema. In generale, il potenziale idrico di un albero decresce durante il giorno a causa della traspirazione ed aumenta durante la notte poiché la pianta recupera acqua attraverso le radici (Abe e Nakai 1999).

Quando inizia l'attività cambiale, le cellule dello xilema passano attraverso diversi stadi di sviluppo: distensione, ispessimento e lignificazione della parete, cellula matura (Deslauriers *et al.* 2003; Gricar *et al.* 2006; Rossi *et al.* 2006a). La distensione cellulare, con il conseguente aumento delle dimensioni, viene raggiunta quando la pressione di turgore all'interno della cellula supera la resistenza della parete primaria, a questo punto il volume cellulare, con l'inizio della formazione della parete secondaria, non subisce più modifiche (Steppe *et al.* 2005). L'accrescimento delle cellule vegetali dipende dall'interazione tra pressione di turgore e forza meccanica della parete cellulare. La pressione di turgore è la pressione del protoplasto contro la parete cellulare ed è generata dalla differenza tra la tensione di flusso e la pressione osmotica interna alle cellule di neoformazione. La distensione cellulare si genera quando il turgore cellulare supera la tensione della parete cellulare. Nello sviluppo delle cellule xilematiche delle piante arboree la dimensione delle cellule è determinata dall'interazione tra turgore cellulare e proprietà della parete cellulare delle cellule xilematiche in via di sviluppo nella zona di espansione (Abe e Nakai 1999). Durante un periodo di siccità vengono

prodotte cellule più piccole a causa della ridotta disponibilità idrica (Abe e Nakai 1999), che non permette alle cellule di distendersi in maniera ottimale. Inoltre, secondo Abe e Nakai (1999) e Abe *et al.* (2003), se il deficit idrico continua per un periodo di tempo sufficientemente lungo (oltre 18 giorni su *Cryptomeria japonica* secondo gli Autori), oppure è di forte intensità (-2 MPa sempre su *C. japonica*), intervengono anche fattori limitanti la fisiologia della pianta con conseguente diminuzione della fotosintesi e della produttività del cambio. Quindi, si deduce che l'effetto di uno stress idrico sulla dimensione delle tracheidi sia probabilmente maggiore rispetto a quello sulle divisioni cambiali, come suggeriscono anche Hsiao e Avezado (1974) e Abe *et al.*(2003). La disponibilità di acqua influisce inoltre sullo spessore delle pareti cellulari, in quanto influenza direttamente il metabolismo cellulare riducendo l'assimilazione del glucosio nella parete (Whitmore e Zahner 1967; Proseus e Boyer 2005).

Il presente studio si pone l'obiettivo di comprendere quali siano gli effetti dello stress idrico su giovani individui di *Abies balsamea* (L.) Mill., una delle specie dominanti presenti nella parte orientale della foresta boreale canadese (Krause 2006). Il lavoro è stato realizzato su semenzali cresciuti in condizioni controllate e divisi in due gruppi: di controllo e sottoposti ad un trattamento di stress idrico. L'analisi della dinamica di formazione dell'anello è stata realizzata quantificando settimanalmente il numero di cellule prodotte dal cambio legnoso nelle differenti fasi di sviluppo, in entrambi i gruppi. A fine stagione, le tracheidi formate sono state misurate, determinandone la dimensione radiale e lo spessore delle pareti e confrontando le misurazioni dei due trattamenti. Il lavoro è di particolare interesse in quanto analizza il legno, sia da un punto di vista temporale (tramite l'analisi della dinamica di formazione dell'anello), che spaziale (tramite la misurazione della dimensione delle tracheidi).

## 3.2. Materiali e Metodi

### 3.2.1. Disegno sperimentale

Lo studio ha interessato 264 semenzali di *Abies balsamea* (L.) Mill. di 8 anni che sono stati mantenuti in condizioni di accrescimento controllato in serra presso Le Pavillon de la recherche forestière, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. Le piante erano alte mediamente 32 cm ( $\pm 4.1$ ) con diametro medio del fusto di 13 mm ( $\pm 1.8$ ). La temperatura della serra è stata mantenuta simile a quella esterna durante tutta la durata dell'esperimento. Le piante sono state disposte in file parallele lungo una griglia rettangolare. I semenzali sono stati divisi in 2 gruppi: il primo è stato utilizzato come controllo, mentre gli individui appartenenti al secondo sono stati sottoposti ad una situazione di deficit idrico. La condizione di deficit idrico è iniziata il 17 giugno, con una sospensione nella somministrazione di acqua per 3 settimane (con l'eccezione degli individui che manifestavano evidenti stati di deperimento e ai quali è stata somministrata una minima quantità di acqua in modo da impedirne la morte). Alle piante di controllo invece l'acqua è stata somministrata normalmente una volta al giorno (100 ml).

Il potenziale idrico del fusto è stato misurato con una camera a pressione per avere un'indicazione generale dello stato di stress dei semenzali durante lo stress e non tanto per avere un andamento continuo nel tempo. Sono state prese delle misure in maniera discontinua dal 23 al 30 giugno e solamente sulle piante sottoposte allo stress idrico con due misurazioni una all'1.30 e l'altra alle 7.30. Il potenziale idrico per entrambi i trattamenti è stato misurato invece il 7 luglio con due misurazioni effettuate, la prima tra l'1.00 e le 3.00 e la seconda tra le 13.00 e le 15.00.

Il campionamento ha avuto inizio il 6 maggio 2005 ed è terminato il 30 settembre dello stesso anno. Ogni settimana, per ogni trattamento sono stati raccolti 6 alberi in modo casuale dalla griglia (*Randomized Complete Block*). Dagli individui campionati sono state prelevate delle rotelle alla base del fusto. Le rotelle campionate sono state immerse in bagni a diverse soluzioni di alcool,  $\beta$ -limonene (Bioclear) e paraffina secondo una procedura standard della durata di 20 ore (Rossi *et al.* 2006b). I campioni sono stati inclusi in blocchetti di paraffina, tagliati con un microtomo in sezioni di 8  $\mu\text{m}$ , adagiati su un vetrino e ripuliti dalla paraffina residua mediante immersioni in  $\beta$ -limonene (Bioclear) e alcool.

### 3.2.2. Andamento dello sviluppo dell'anello legnoso

Il processo di preparazione dei vetrini utilizzati per osservare le cellule nelle diverse fasi di sviluppo è simile a quello descritto nel primo capitolo. Le sezioni sono state colorate per 20 minuti con *cresyl violet acetate* (0.16% in acqua), ed osservate al microscopio con luce normale e polarizzata a 400 ingrandimenti. Anche la metodologia per differenziare le varie cellule è in sostanza la stessa per cui si rimanda al primo capitolo nella sezione di materiali e metodi.

### 3.2.3. Analisi delle dimensioni cellulari

Per analizzare le dimensioni delle cellule xilematiche altre sezioni sono state preparate e sono state colorate con safranina (1% in acqua) per 10 minuti. L'eccesso di colorante è stato rimosso mediante 2 successive immersioni in acqua per 10 minuti. Infine, le sezioni sono state fissate con balsamo del Canada (Eukitt®).

Le misurazioni sono state eseguite acquisendo l'immagine delle cellule tramite telecamera digitale e l'analisi è stata effettuata con il *software* Wincell™ (Reagent Instruments inc. 2000). Le misure sono state prese a 400 ingrandimenti lungo 3 file radiali per campione a partire dal legno tardivo dell'anno precedente fino a tutte le cellule formate. I parametri misurati sono stati il diametro radiale delle tracheidi e lo spessore della parete cellulare. Il numero di cellule di legno primaticcio e tardivo è stato stimato in base alla definizione di Mork per il quale si definiscono tracheidi del legno tardivo quelle cellule che hanno lo spessore della singola parete radiale uguale o maggiore di 4 volte dello spessore radiale del lume (Parr e Cameron, 2004):

singola parete cellulare  $\times 4 \geq$  lume della tracheide.

### 3.2.4. Analisi statistiche

Le cellule misurate mediante l'analisi delle dimensioni cellulari sono state suddivise in 3 gruppi a seconda del periodo di formazione: pre-stress, cellule formatesi prima del 17 giugno giorno in cui inizia il trattamento, stress, sviluppatasi durante il periodo di trattamento dal 17 giugno al 7 luglio e post-stress, formatesi dopo il 7 luglio. Al fine di individuare le cellule nei diversi trattamenti è stato sufficiente contare il numero di cellule presenti nella fase di distensione al giorno 17 giugno. Quindi nel

tracheidogramma la cellula numero 15 viene considerata come la prima cellula prodotta durante il periodo di stress, mentre le cellule da 1 a 14 sono state considerate come formatesi nel periodo pre-stress. L'ultima cellula che si è sviluppata in distensione durante il periodo di stress idrico è stata la cellula numero 37, quindi le cellule in distensione influenzate dal periodo di stress idrico sono quelle che vanno dalla numero 15 alla 37 e tutte quelle successive sono state considerate in post-stress. L'andamento delle cellule in distensione viene rappresentato dalla curva delle cellule totali (Mature + ispessimento della parete + Distensione) e dall'incrocio tra questa curva ed il periodo di stress idrico ed è stato possibile ottenere la numerosità totale delle cellule in distensione nei 3 periodi (Fig. 1). Lo stesso meccanismo è stato utilizzato per le cellule in ispessimento della parete formatesi prima, durante e dopo lo stress.

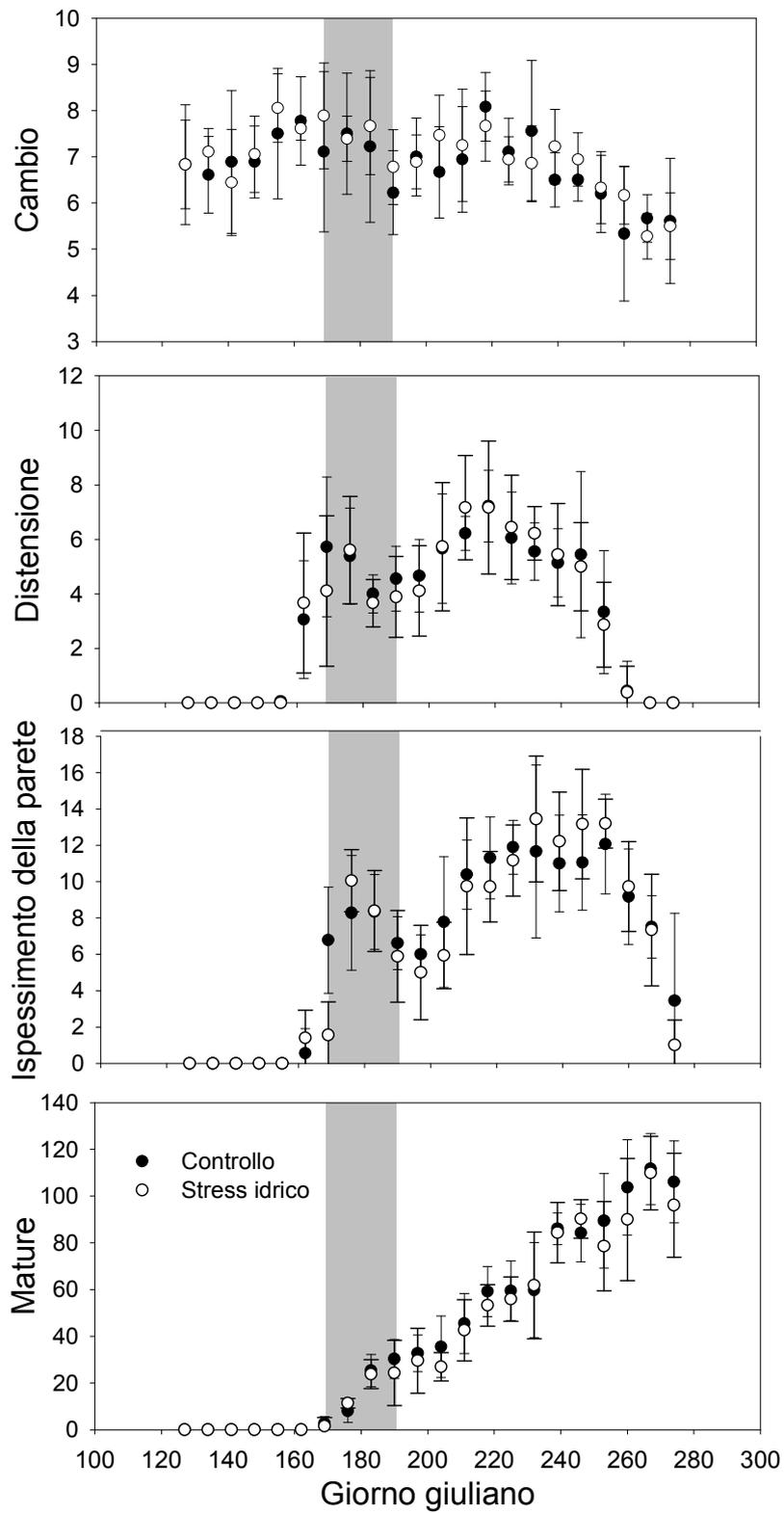
I confronti statistici per la differenza delle medie dei dati sulle dimensioni delle tracheidi sono stati eseguiti mediante la procedura *proc glm* del pacchetto statistico SAS (SAS Institute Inc. 2001 v. 8.2). La differenza tra il numero di cellule totali prodotte nei 2 trattamenti è stato eseguito mediante un test t. La proporzione di legno primaticcio e tardivo è stato confrontato con l'uso del test  $\chi^2$ .

### 3.3. Risultati

#### 3.3.1. Sviluppo nel tempo delle cellule xilematiche

Il potenziale idrico per le piante sottoposte a deficit idrico è stato di -1 MPa il 23 giugno e si è mantenuto costante fino al 28 giugno fino ad arrivare ad un valore di -2 MPa misurato il 30 giugno. Il 7 luglio sono stati registrati valori di potenziale di base di -0.3 MPa per le piante controllo e di -0.7 MPa per le piante sottoposte al trattamento e di potenziale minimo di -0.7 MPa per le piante controllo e di -1.1 MPa per le piante sottoposte a stress.

Entrambi i trattamenti hanno mostrato lo stesso andamento nella dinamica cambiale. All'inizio delle osservazioni le cellule cambiali risultavano 7 (fig. 1). L'individuazione dell'avvio della stagione vegetativa non si è dimostrata agevole, in quanto l'incremento nella produzione cambiale è stato mediamente minimo arrivando a 7-8 cellule o, in alcuni casi, a 8-9 cellule prodotte. L'avvio dell'attività cambiale è avvenuto il 3 giugno, ovvero 2 settimane prima dell'inizio del trattamento di stress idrico. A fine stagione, il numero delle cellule cambiali è diminuito gradualmente fino ad un minimo di 5, ad indicare come il cambio avesse terminato le divisioni, tornando nello stato di dormienza. Il numero di cellule contate nel cambio è stato quindi minore (5-6 cellule) rispetto al precedente stato di dormienza osservato all'inizio dei campionamenti (6-7 cellule).



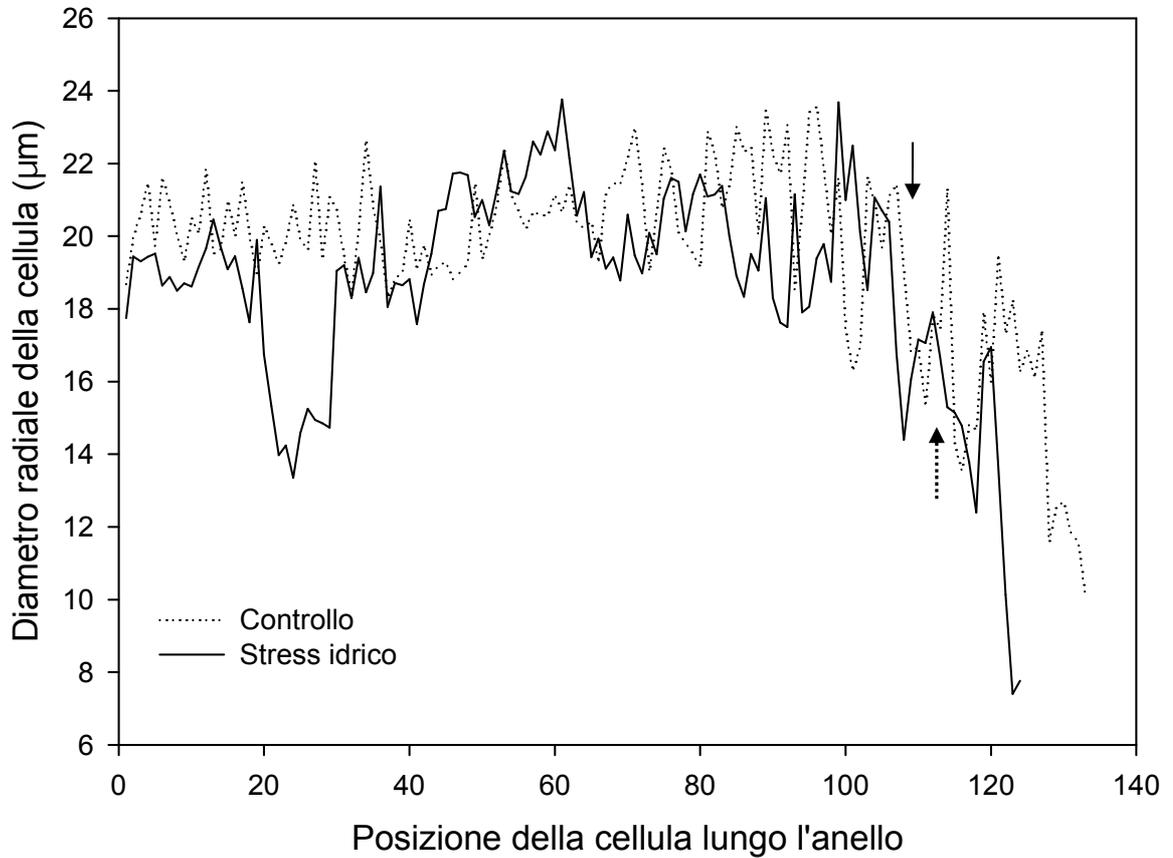
**Figura 1:** Andamento del cambio e delle cellule in distensione in ispessimento e mature. La banda grigia rappresenta il periodo in cui si è verificato lo stress idrico. Le barre verticali rappresentano la deviazione standard (n=6).

Uno stesso andamento tra i due trattamenti è stato osservato anche nelle fasi di distensione, di ispessimento della parete cellulare e lignificazione e nello stato di cellula matura (fig. 1). La prima cellula in distensione è stata osservata per entrambi i trattamenti il 18 giugno. Il numero di cellule in distensione è aumentato gradualmente per poi decrescere una settimana dopo l'inizio del periodo di stress idrico, tornando ad un valore di 4. Le cellule in distensione hanno ripreso poi a crescere di numero dopo la fine del periodo di stress idrico (fig. 1). Il massimo numero di cellule che sono state contate in distensione è stata pari a 8, successivamente la numerosità è diminuita con il procedere della stagione vegetativa ed è tornato a zero il 23 settembre. Le cellule in ispessimento della parete hanno mostrato un andamento del tutto simile a quello delle cellule in distensione. La prima cellula in ispessimento della parete è stata osservata una settimana prima dell'inizio del trattamento di stress idrico, ovvero il 10 giugno. Anche in questo caso, il numero di cellule è aumentato fino a 8-9 per poi diminuire 2 settimane dopo lo stress scendendo a 4-5 cellule. Infine il numero di cellule è tornato a crescere terminato il periodo di trattamento fino ad un valore massimo di 13, dopo di che decresce rapidamente verso lo zero nelle ultime 3 settimane. Le cellule mature hanno mostrato un andamento crescente costante fino ad un valore massimo di cellule prodotte non diverso significativamente tra i trattamenti ( $114.3 \pm 16.4$  per le piante controllo e  $104.2 \pm 20.3$  per le piante sottoposte a deficit idrico) (test t,  $t=1.04$ ,  $p>0.05$ ).

### 3.3.2. Analisi delle dimensioni cellulari

L'analisi delle dimensioni cellulari ha mostrato un diverso andamento nella dimensione delle cellule della piante sottoposte a deficit idrico, rispetto a quelle di controllo. Durante il periodo di deficit idrico, si è notata una diminuzione del lume

cellule, mentre, una volta terminato lo stress idrico, le cellule sono tornate delle stesse dimensioni del periodo precedente lo stress (fig. 2).



**Figura 2:** Andamento della dimensione radiale delle tracheidi prodotte a partire dal legno primaticcio (a sinistra) fino al legno di chiusura (a destra). Le frecce indica l'inizio del legno tardivo.

Il diametro radiale delle cellule durante il periodo precedente al deficit idrico è stato di  $19.21 \pm 1.6 \mu\text{m}$  per le piante trattate e di  $20.17 \pm 1.7 \mu\text{m}$  per le piante controllo. Durante il periodo di stress idrico, il diametro radiale delle cellule prodotte è sceso a  $16.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$ , mentre è rimasto costante per le piante controllo ( $19.36 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ). Dopo la fine del trattamento, la dimensione delle cellule si è mostrata simile nei 2 trattamenti infatti le cellule sottoposte a stress hanno presentato una dimensione di  $19.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$ , mentre quelle controllo di  $18.96 \pm 1.3 \mu\text{m}$  (tab.1).

	Controllo	Stress idrico	F	p
Pre-stress	20.17 ±1.7	19.21 ±1.6	3.78	N.S.
Stress	19.36 ±1.6	16.6 ±1.8	27.8	p<0.01
Post-stress	18.96 ±1.3	19.3 ±1.7	0.73	N.S.

**Tabella 1:** Diametro radiale della cellule (lunghezza lumen + spessore pareti) ± deviazione standard. Test eseguito con la procedura *proc glm* del pacchetto statistico SAS (SAS Institute Inc. 2001 v 8.2).

Lo spessore delle pareti cellulari formate nel periodo precedente lo stress è stato di  $1.83 \pm 0.28 \mu\text{m}$  e per le piante controllo di  $1.71 \pm 0.28 \mu\text{m}$  (fig. 3). Durante il periodo di deficit idrico si è registrato uno spessore medio di  $2.03 \pm 0.32 \mu\text{m}$  per le piante controllo e di  $2.03 \pm 0.37 \mu\text{m}$  per le piante trattate e dopo lo stress è stato di  $3.16 \pm 0.32 \mu\text{m}$  per le piante controllo e di  $2.89 \pm 0.37$  per le altre (fig. 3).

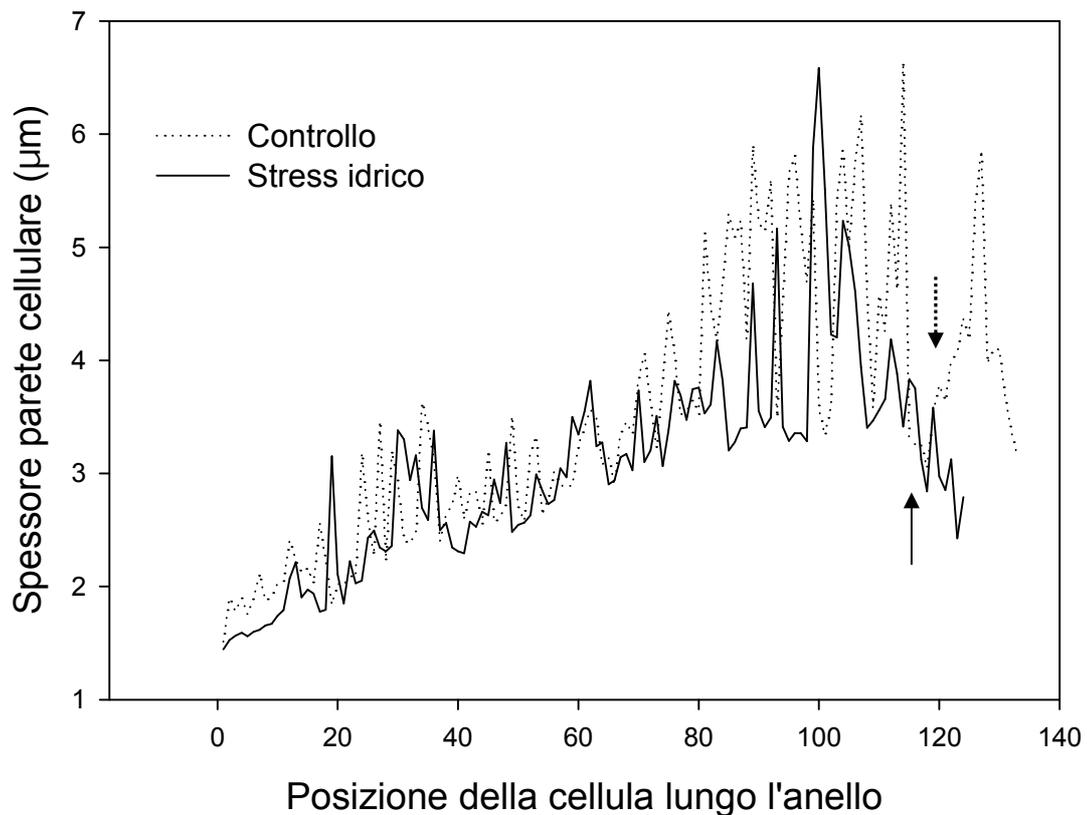


Figura 3: Andamento dello spessore della parete cellulare delle tracheidi prodotte a partire dal legno primaticcio (a sinistra) fino al legno di chiusura (a destra). Le frecce indica l'inizio del legno tardivo.

Il diametro radiale delle tracheidi è risultato uguale nelle cellule degli alberi nel periodo pre-stress (Test ANOVA,  $F=3.78$ ,  $p>0.05$ ), ed è risultato diverso in modo significativo durante il periodo di stress (Test ANOVA,  $F=27.8$ ,  $p<0.01$ ) e di nuovo non è risultato diverso significativamente nel post-stress (Test ANOVA,  $F=0.73$ ,  $p>0.05$ ) (tab. 1). Lo spessore delle pareti cellulari è stato uguale durante e nel periodo che precede il trattamento ( $p>0.05$ ), mentre ha avuto un'influenza nel periodo che segue lo stress idrico (Test ANOVA,  $F=7.19$ ;  $p=0.01$ ) (tab.2).

	Controllo	Stress idrico	F	P
Pre-stress	1.83 ±0.28	1.71 ±0.28	2.11	N.S.
Stress	2.03 ±0.32	2.03 ±0.37	0.00	N.S.
Post-stress	3.16 ±0.32	2.89 ±0.37	7.19	P=0.01

**Tabella 2:** Spessore della parete cellulare ± deviazione standard. Test eseguito con la procedura *proc glm* del pacchetto statistico SAS (SAS Institute Inc. 2001 v 8.2).

La produzione di legno primaticcio e tardivo non è risultata diversa nei due trattamenti ( $\chi^2 = 17.06$ ;  $p > 0.05$ ) infatti le piante controllo hanno prodotto il 71% di tracheidi nel legno primaticcio e 29% in quello tardivo, mentre quelle sottoposte al trattamento ne hanno prodotte 75% nel legno primaticcio e 25% nel legno tardivo (tab. 3).

	Controllo (%)	Stress idrico (%)
Legno primaticcio	71	75
Legno tardivo	29	25
Totale	100	100

**Tabella 3:** Numero di tracheidi prodotte da tutte le piante analizzate in percentuale ( $\chi^2 = 17.06$ ; N.S.).

## 3.4. Discussione

### 3.4.1. Dinamiche di sviluppo cellulare

Le dinamiche di sviluppo dell'anello, l'attività del cambio e la durata delle fasi di distensione cellulare e di ispessimento della parete e di cellula matura nei semenzali sottoposti a stress non hanno mostrato differenze rispetto alle plantule controllo. Lo stress idrico è iniziato il 17 giugno, quando cioè l'attività di divisione nel meristema cambiale aveva avuto già inizio. Per questo motivo probabilmente non si sono avute influenze nella dinamica di sviluppo dell'anello. Alcune fasi di sviluppo cellulare possono invece essere influenzate dallo stress idrico, in particolare, la fase di distensione può venire inibita. Infatti le cellule, a causa della diminuzione della pressione di turgore, dovuta alla mancanza di acqua, non riescono a distendersi (Zweifel *et al.* 2006).

L'analisi della dinamica di formazione dell'anello ha permesso comunque di conoscere quali cellule fossero state prodotte prima, durante e dopo lo stress. La dimensione delle cellule è stata determinata esclusivamente durante il periodo di distensione, poiché delle successive fasi di ispessimento e maturazione la rigidità della parete non influenza più la dimensione (Von Wilpert 1991).

La dimensione delle tracheidi è risultata diversa nelle piante sottoposte a stress idrico, rispetto a quelle di controllo. Questo è dovuto al fatto che la distensione cellulare, e quindi la dimensione delle cellule, sono maggiormente influenzate rispetto alla produzione cambiale in caso di deficit idrico (Hsiao *et al.* 1973). Le dimensioni radiali delle tracheidi e delle pareti delle cellule si sono dimostrate minori nelle piante sottoposte a stress. Ciò è probabilmente avvenuto perché in situazioni di stress idrico, si

realizzano più rapidamente le limitazioni fisiche legate alla diminuzione della pressione di turgore interno alla cellula. Tale diminuzione viene indotta dalla mancanza di acqua che va direttamente ad influire sulla distensione delle cellule. Quindi, nella prima fase del deficit idrico, quando la distensione cellulare è regolata da fattori fisici, vengono prodotte cellule con lume minore (Corcurea *et al.* 2004). Solo in un secondo momento la produzione cellulare viene inibita da fattori fisiologici che portano alla diminuzione della fotosintesi e della produttività cambiale (Abe e Nakai 1999, Zweifel *et al.* 2006).

Nello studio realizzato, il deficit idrico è stato avviato quando ormai le fasi di distensione e lignificazione erano già iniziate; inoltre, il breve tempo del trattamento (3 settimane) non ha probabilmente fatto insorgere i fattori limitanti la fisiologia. Infatti, la dinamica di sviluppo dell'anello dà una risposta fortemente significativa solo nei casi in cui si verifichi un forte stress idrico, altrimenti la produzione cellulare non diminuisce (Von Wilpert 1991; Abe e Nakai 1999).

L'ispessimento della parete è principalmente influenzato dalla temperatura, anche se la disponibilità di acqua rimane fondamentale per garantire il normale corso dei processi responsabili per la sintesi della parete cellulare (Zahner 1963). A livello cellulare lo stress idrico influenza direttamente il metabolismo cellulare delle pareti delle derivate cambiali, riducendo l'assimilazione di glucosio nelle pareti delle tracheidi (Whitmore e Zahner 1967; Proseus e Boyer 2005). Nel presente contributo, l'effetto del deficit idrico sulle pareti si è notato non tanto durante il periodo di stress idrico, ma successivamente, mediante una diminuzione dello spessore.

In conclusione il deficit idrico indotto non è stato di forte entità, tuttavia le tracheidi sono risultate più piccole e con una parete cellulare più sottile. Il numero di cellule prodotte è invece rimasto lo stesso, confermando l'ipotesi che lo stress idrico influenzi primariamente le dimensioni e che solo in un secondo momento possa limitare

anche la produttività di nuove cellule (Zweifel *et al.* 2006). I semenzali di *A. balsamea*, come in generale le conifere, hanno dimostrato comunque di sopportare uno stress idrico di tre settimane in modo positivo, senza che la funzionalità della pianta venisse compromessa. Tuttavia sarebbe interessante verificare se vi possa essere una certa influenza negli accrescimenti dell'anno successivo.



## 4. Bibliografia

- Abe H, Funada R, Ohtani J, Fukazawa (1997). Changes in the arrangement of cellulose microfibrils associated with the cessation of cell expansion in tracheids. *Trees* 11: 328-332
- Abe H, Nakai T (1999). Effects of the water status within a tree on tracheid morphogenesis in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Trees* 14: 124-129
- Abe H, Nakai T, Utsumi Y, Kagawa A (2003). Temporal water deficit and wood formation in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiology* 23: 859-863
- Anderson G, Bancroft J (2002) Tissue processing and microtomy including frozen. In: Theory and practice of histological techniques (Bancroft JD, Gamble M eds). Churchill Livingstone, London, pp 85-107
- Antonova GF, Cherkashin VP, Stasova VV, Varaksina TN (1995) Daily dynamics in xylem cell radial growth of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Trees* 10:24-30
- Antonova GF, Shebeko VV (1981) Applying cresyl violet in studying wood formation. *Khimiya Drevesiny*, 4: 102-105
- Antonova GF, Stasova VV (1993). Effects of environmental factors on wood formation in Scots pine stems. *Trees* 7: 214-219
- Antonova GF, Stasova VV (1997) Effects of environmental factors on wood formation in larch (*Larix sibirica* Ldb.) stems. *Trees* 11:462-468
- Bannan MW (1962) The vascular cambium and tree ring development. In: *Tree growth* (Kozlowski TT ed), Ronald Press, New York, pp 442
- Barber A, Juday GP, Finney BP (2000). Reduced growth of Alaskan white spruce in the twentieth century from temperature-induced drought stress. *Nature* 405: 668-673
- Belyea RM, Fraser DA, Rose AH (1951). Seasonal growth of some trees in Ontario. *Forestry Chronicle* 27: 300-305
- Bergeron Y, Denneler B, Charron D, Girardin MP (2002). Using dendrochronology to reconstruct disturbance and forest dynamics around Lake Duparquet, northwestern Quebec. *Dendrochronologia* 20 (1/2): 175-189
- Bormann FH, Kozlowski TT (1962). Measurements of tree growth with dial gage dendrometers and vernier tree ringbands. *Ecology* 43: 289-294
- Briffa KR, Jones PD, Schweingruber, FH, Shiyatov SG, Cook ER (1995). Unusual twentieth-century summer warmth in a 1000-year temperature record from Siberia. *Nature* 376: 156-159

Cairns DM, Malanson GP (1998) Environmental variables influencing the carbon balance at the alpine treeline: a modeling approach. *Journal of Vegetation Science* 9: 679-692

Camarero JJ, Guerrero-Campo J, Gutiérrez E (1998) Tree-ring growth and structure of *Pinus uncinata* and *Pinus sylvestris* in the Central Spanish Pyrenees. *Arctic and Alpine Research* 30:1-10

Cherubini P, Gartner BL, Tognetti R, Braker OU, Schoch W, Innes JL (2003) Identification, measurement and interpretation of tree rings in woody species from mediterranean climates. *Biological reviews* 78: 119-148

Corcuera L, Camarero JJ, Gil-Pelegrin E (2004). Effects of a severe drought on growth and wood anatomical properties of *Quercus faginea*. *IAWA* 25 (2): 185-204

Deslauriers A, Morin H (2005). Intra-annual tracheid production in balsam fir stems and the effect of meteorological variables. *Trees* 19: 402-408

Deslauriers A, Morin H, Begin Y (2003a) Cellular phenology of annual ring formation of *Abies balsamea* in the Quebec boreal forest (Canada). *Canadian journal of forestry Research* 33:190-200

Deslauriers A, Morin H, Urbinati C, Carrer M (2003b) Daily weather response of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) stem radius increment from dendrometer analysis in the boreal forests of Québec (Canada). *Trees* 17: 477-484

Donaldson LA (1991) Seasonal changes in lignin distribution . *Wood science and technology* 25:15-24

Downes G, Worledge D, Schimleck D, Harwood C, French J, Beadle C (2006) The effect of growth rate and irrigation on the basic density and kraft pulp yield of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *New Zealand journal of forestry* 51(3): 13-22.

Downes GM, Wimmer R, Evans R (2002). Understanding wood formation: gains to commercial forestry through tree-ring research. *Dendrochronologia* 20: 37-51

Eilmann B, Weber P, Rigling A, Eckstein D (2006). Growth reactions of *Pinus sylvestris* L. and *Quercus pubescens* Wild. to drought years at xeric site in Valais, Switzerland. *Dendrochronologia* 23: 121-132

Ford ED, Robards AW, Piney MD (1978) Influence of environmental factors on cell production and differentiation in the earlywood of *Picea sitchensis*. *Annals of botany* 42: 683-692

Forster T, Schweingruber FH, Denneler B (2000). Increment puncher: a toll for extracting small cores of wood and bark from living trees. *IAWA* 21: 169-180.

Fraser DA (1952). Initiation of cambial activity in some forest trees in Ontario. *Ecology* 33: 259-273

Fujii T, Tukai Salang A, Fujiwara T (1999) Growth periodicity in relation to the xylem development in three *Shorea* spp. (*Dipterocarpaceae*) growing in Sarawak. In: Tree-

- ring analysis (Wimmer R, Vetter RE eds), CAB international, Wallingford, pp 131-137
- Gamache I, Payette S (2004). Height growth response of tree line black spruce to recent climate warming across the forest-tundra of eastern Canada. *Journal of ecology* 92: 835-845
- Gindl W, Grabner M, Wimmer R (2000) The influence of temperature in latewood lignin content in treeline Norway spruce with maximum density and ring width. *Trees* 14:409-414
- Graumlich LJ, Brubaker LB (1986) Reconstruction of annual temperature (1590-1979) for Longmire, Washington, derived from tree-rings. *Quaternary research* 25: 223-234
- Gričar J, Čufar K, Oven P, Schmitt U (2005). Differentiation of the terminal latewood tracheids in Silver fir trees during autumn. *Annals of botany* 95: 959-965
- Gričar J, Zupančič M, Čufar K, Koch G, Schmitt U, Oven P (2006). Effect of local heating and cooling on cambial activity and cell differentiation in the stem of Norway spruce (*Picea abies*). *Annals of botany* 97: 943-951
- Hansen-Bristow K (1986) Influence of increasing elevation on growth characteristics at timberline. *Canadian journal of botany* 64: 2517-2523
- Heikkinen O (1985) Relationships between tree growth and climate in the subalpine Cascade Range of Washington, USA. *Annales botanici fennici* 22: 1-14
- Hogg EH, Hurdle PA, (1995). The aspen parkland in western Canada: a dry-climate analogue for the future boreal forest? *Water, air and soil pollution* 82 (1/2): 391-400
- Hsiao TC (1973). Plant responses to water stress. *Annual review of plant physiology* 24: 519-570
- Hsiao TC, Awecedo E (1974), Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. *Agricultural meteorology*. 14: 59-84
- Irvine J, Grace J (1997). Continuous measurements of water tensions in the xylem of trees based on the elastic properties of wood. *Planta* 202: 455-461
- Keeland BD, Sharitz RR (1993). Accuracy of tree growth measurements using dendrometers bands. *Canadian journal of forestry research* 23 (11): 2454-2457
- Kirdyanov AV, Hughes M, Vaganov E, Schweingruber F, Silkin P (2003) The importance of early summer temperature and date of snow melt for tree growth in the Siberian Subarctic. *Trees* 17:61-69
- Körner C (1998). A re-assessment of high elevation treeline positions and their explanation. *Oecologia* 115 (4): 445-459
- Körner C, Paulsen J (2004) A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of biogeography* 31:713-732
- Kozłowski TT (1971) Growth and development of trees: cambial growth, root growth

and reproductive growth. Vol.2, Academic Press, New York, pp 514

Kozlowski TT, Winget CH (1964). Diurnal and seasonal variation in radii of tree stems. *Ecology* 45(1): 149-155

Kramer PJ (1964) The Role of Water in Wood Formation. In: The formation of wood in forest trees (Zimmermann MH ed) Academic Press, New York, pp 519-532

Kramer PJ, Kozlowski TT (1979). Physiology of woody plants. Academic Press, New York, pp 787

Krause C (2006). Growth development of a balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) originating from layering. *Dendrochronologia* 23: 139-143

Krause C, Gionest F, Morin U, MacLean DA (2003). Temporal relations between defoliation caused by spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clem.) and growth of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.). *Dendrochronologia* 21 (1): 23-31

Kuroda K, Kiyono Y (1997). Seasonal rhythms of xylem growth measured by the wounding method and with a band-dendrometer: an instance of *Chamaecyparis obtusa*. *IAWA* 18(3): 291-299

Kutscha NP, Hyland F, Schwarzmann JM (1975) Certain seasonal changes in Balsam fir cambium and its derivatives. *Wood science and technology* 9: 175-188

Lauvergeat V, Lacomme C, Lacombe E, Lasserre E, Roby D, Grima-Pettenati J (2001) Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* 57: 1187-1195

Lloyd AH, Fastie CL (2002). Spatial and temporal variability in the growth and climate response of treeline trees in Alaska. *Climate change* 52: 481-509

Mahmood A (1971) Number of initial-cell divisions as a measure of activity in the yearly cambial growth pattern in *Pinus*. *The Pakistan journal of forestry* 21: 27-42

Mäkinen H, Nöjd P, Saranpää P (2003) Seasonal changes in stem radius and production of new tracheids in Norway spruce. *Tree physiology* 23:959-968

Motulsky H, Christopoulos A (2003). Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression, a practical guide to curve fitting. GraphPad software Inc., San Diego CA

Murmanis L (1971) Structural changes in the vascular cambium of *Pinus strobus* L. during an annual cycle. *Annals of botany* 35: 133-141

Offenthaler I, Hitz P, Richter H (2001). Wood diameter indicates diurnal and long-term patterns of xylem water potential in Norway spruce. *Trees* 15: 215-221

Ohashi Y, Sahri MH, Yoshizawa N, Itoh T (2001). Annual rhythm of xylem growth in rubberwood (*Hevea brasiliensis*) trees grown in Malaysia. *Holzforschung* 55(2): 151-154

- Oribe Y, Funada R, Kubo T (2003). Relationships between cambial activity, cell differentiation and the localization of starch in storage tissue around the cambium in locally heated stems of *Abies sachalinensis* (Schmidt) Master. *Trees* 17: 185-192
- Oribe Y (2006) Studies on the reactivation of the cambium and xylem differentiation in conifers. *Bulletin of the forest tree breeding center*, 22: 61-146
- Panterne P, Burger J, Cruiziat P (1998). A model of the variation of water potential and diameter within a woody axis cross-section under transpiration conditions. *Trees* 12: 293-301
- Parr A, Cameron AD (2004). Effects of tree selection on strength properties and distribution of structural roots of clonal Sitka spruce. *Forest ecology and management* 195: 97-106
- Plomion C, Leprévost G, Stokes A (2001) Wood formation in trees. *Plant physiology* 127:1513-1523
- Proseus TE, Boyer JS (2005). Turgor pressure moves polysaccharides into growing cell walls of *Chara corallina*. *Annals of botany* 95: 967-979
- Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T (2006a) Assessment of cambial activity and xylogenesis by microsampling tree species: an example at the Alpine timberline. *IAWA* 27 (4): 383-394
- Rossi S, Anfodillo T, Menardi R (2006b) Trephor: a new tool for sampling microcores from trees stems. *IAWA* 27 (1): 89-97
- Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T, Carraro V (2007) Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. *Oecologia* 152 (1): 1-12
- Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T, Morin H, Saracino A, Motta R, Borghetti M (2006c) Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. *New phytologist* 170 (2): 301-310
- Rossi S, Deslauriers A, Morin H (2003) Application of the Gompertz equation for the study of xylem cell development. *Dendrochronologia* 21:33-39
- Savidge RA (2000). Intrinsic regulation of cambial growth. *Journal of plant growth Regulation* 20 (1): 52-77
- Schmitt U, Jalkanen R, Eckstein D (2004) Cambium dynamics of *Pinus sylvestris* and *Betula* spp. in the Northern Boreal forest in Finland. *Silva fennica* 38:167-178
- Schweingruber FH (1996) Tree rings and environment. *Dendroecology*. Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research, Birmensdorf, Switzerland: pp 609
- Sevanto S, Mikkelsen TN, Pilegaard K, Vesala T (2003). Comparison of tree stem diameter variations in beech (*Fagus sylvatica* L.) in Soro Denmark and in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Hyytiälä, Finland. *Boreal environment research* 8: 457-464

Smith WK, Germino MJ, Hancock TE, Johnson DM (2003). Another perspective on altitudinal limits of alpine timberlines. *Tree physiology* 23 (16): 1101-1112

Steppe K, De Pauw DJW, Lemeur R, Vanrolleghem A (2005). A mathematical model linking tree sap flow dynamics to daily stem diameter fluctuations and radial stem growth. *Tree physiology* 26: 257-273

Stevens GC, Fox JF (1991) The causes of treeline. *Annual review of ecology and systematics* 22:177-191

Sveinbjörnsson B (2000) North American and European treelines: external forces and internal processes controlling position. *Ambio* 29:388-395

Tardif J, Flannigan M, Bergeron Y (2001). An analysis of the daily radial activity of boreal tree species, northwestern Quebec . *Environmental monitoring assessment* 67: 141-160

Timell TE (1980) Organization and Ultrastructure of the Dormant Cambial Zone in Compression Wood of *Picea abies*. *Wood science and technology* 14: 161-179

Uggla C, Magel E, Moritz T, Sundberg B (2001) Function and Dynamics of Auxin and Carbohydrates during Earlywood/Latewood Transition in Scots Pine. *Plant physiology* 125: 2029-2039

Vaganov EA (1990). The tracheidogram method in tree-ring analysis and its application. In: *Methods of dendrochronology: application in the environmental sciences* (Cook E, Kairiuktis A Eds). Kluwer, Academic Publisher, Dordrecht, pp 63-76

Vaganov EA, Hughes MK, Kirilyanov AV, Schweingruber FH, Silkin PP (1999) Influence of snowfall and melt timing on tree growth in subarctic Eurasia. *Nature* 400: 149-151

Von Wilpert K (1991). Intraannual variation of radial tracheid diameters as monitor of site specific water stress. *Dendrochronologia* 9: 95-113

Wardle P (1968) Englemann spruce (*Picea engelmannii* Engel.) at its upper limits on the front range, Colorado. *Ecology* 49: 483-495

Whitmore FW, Zahner R (1967). Development of the xylem ring in stems of young red pine trees. *Forest science* 12: 198-210

Wilson BF (1964) A model for cell production by the cambium of conifers. In: *The formation of wood in forest trees* (Zimmermann MH ed.), Academic Press, London, pp 19-36

Wimmer R, Downes GM, Evans R (2002). Temporal variation of microfibril angle in *Eucalyptus nitens* grown in different irrigation regimes. *Tree physiology* 22: 449-457

Winsor CP (1932). The Gompertz curve as a growth curve. *Proceedings of the national academy of sciences* 18: 1-7

- Zahner R (1968). Water deficits and growth of tree. In: Water deficits and plant growth. (Kozlowski TT ed.), Academic Press, New York, pp. 191-254
- Zar JH (1999). Biostatistical analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
- Zhang L (1997). Cross-validation of non-linear growth functions for modelling tree height-diameter relationships. *Annals of botany* 79: 251-257
- Zhong R, Taylor JJ, Zheng-Hua Y (1997) Disruption of interfascicular fiber differentiation in an arabidopsis mutant. *The plant cell* 9: 2159-2170
- Zweifel R, Häsler R (2000). Frost-induced reversible shrinkage of bark of mature subalpine conifers. *Agricultural and forest meteorology* 102: 213-222
- Zweifel R, Item H, Häsler R (2000). Stem radius changes and their relation to stored water in stems of young Norway spruce trees. *Trees* 15: 50-57
- Zweifel R, Zimmermann L, Zeugin F, Newbery DM (2006). Intra-annual radial growth and water relations of trees: implications towards a growth mechanism. *Journal of Experimental botany* 57: 1445-1459