

DIFERENCIAS MORFOLOGICAS EN LAS CERAS EPIESTOMATICAS DE VARIAS POBLACIONES DE *PINUS SYLVESTRIS* L. DE CASTELLON Y TERUEL

M. J. SANZ, V. CALATAYUD y E. CALVO¹

RESUMEN

Se ha estudiado la morfología de las ceras epicuticulares de nueve poblaciones de *Pinus sylvestris* L. en el Este de la Península Ibérica (Comarca de Els Ports y Sierra del Toro en Castellón, Sierras de Albaracín y Javalambre en Teruel). El objetivo de este estudio es cuantificar el grado de fusión de las ceras epicuticulares en el interior y borde de los estomas de la cara abaxial de las acículas de esta especie. Se han encontrado degradaciones anómalas en algunas de las poblaciones estudiadas y se ha constatado que las poblaciones con elevados porcentajes de fusión en las ceras epicuticulares se encuentran en las zonas de influencia de las brisas procedentes del mar portadoras de elevadas concentraciones de ozono. En algunas de las localidades donde se encuentran las poblaciones estudiadas, se ha registrado la presencia de niveles de ozono por encima de la directiva Europea de daños a la vegetación ($65 \mu\text{gr}/\text{m}^3$ de ozono) durante los meses de primavera y verano.

INTRODUCCION

La superficie de la hoja en los vegetales está cubierta por una capa fina, extracelular y predominantemente lipídica denominada genéricamente cutícula, cuya principal función es proteger e impermeabilizar la hoja. Estructuralmente, los lípidos en la cutícula se pueden separar en dos grandes grupos o clases: polímeros de elevado peso molecular (llamados «lípidos») y moléculas solubles de cadena larga (llamadas «ceras epicuticulares»). Estas últimas se encuentran en contacto directo con la atmósfera. En general en las coníferas, las ceras epicuticulares están bien desarrolladas, especialmente las que rodean o se encuentran en el interior de las cámaras estomáticas.

Estas ceras de estructura cristalina tienen vital importancia en algunos procesos fisiológicos (BAKER, 1982), especialmente en los que implican intercambios gaseosos y cualquier tipo de

control hídrico en el que interviene la parte aérea del árbol. La morfología de las ceras epicuticulares varía según las especies, se pueden encontrar desde bastoncillos, placas, filamentos y tubos hasta cordones. Las ceras tubulares son quizás las más comunes en muchas plantas vasculares, siendo dominantes en las Gimnospermas (HUTTUNEN, 1994).

La superficie de la hoja constituye la primera barrera planta-atmósfera, los factores ambientales pueden llegar a condicionar fuertemente las características y el proceso de degradación o senescencia de las ceras epicuticulares, alterando en último término su morfología y composición. Por tanto, se puede concluir que el estado y características morfológicas de las ceras epicuticulares es el resultado de la combinación de los factores ambientales y del continente genético de cada especie (KERFOUR & GARREC, 1992). Por ello, la edad de la acícula es un factor importante a la hora de evaluar los cambios en la estructura de sus ceras.

La temperatura, los agentes patógenos, la contaminación atmosférica (TURUNEN & HUTTUNEN, 1989, TUOMISTO, 1988), la lluvia o el viento (WILSON, 1984) son algunos de los factores más

¹ Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM).
Parque Tecnológico, Sector Oeste, Calle 4.
Paterna. 46000 Valencia.

importantes que determinan los cambios en la morfología de los componentes de la cutícula. El proceso de senescencia natural hace que las acículas más viejas presenten una degradación progresiva de sus ceras. Pero cuando estas mismas u otras alteraciones se observan en las acículas jóvenes deben buscarse causas específicas, como por ejemplo, la contaminación atmosférica. En este sentido se han descrito alteraciones morfológicas de las ceras provocadas por la lluvia ácida (PERCY & BAKER, 1987, 1988), por nieblas ácidas (PERCY, JENSEN & MCQUATTIE, 1992) y por ozono (TURUNEN & HUTTUNEN, 1990) en diversas especies de coníferas. Algunos autores incluso proponen la utilización de las modificaciones del proceso normal de degradación de la estructura y composición química de las ceras en las acículas de las coníferas como un indicador útil de las anomalías ambientales, como complemento de los seguimientos rutinarios del estado de las masas forestales (HANISH & KILZ, 1990).

Una revisión de la problemática medio ambiental en el Maestrazgo y Els Ports de Castellón (MILLÁN y SANZ, 1993) e investigaciones sobre la dinámica de las masas de aire contaminado en las zonas costeras de la Península Ibérica (MILLÁN y col. 1992; MILLÁN y col. en prensa) han puesto de manifiesto la existencia de elevados niveles de fotooxidantes en estas áreas. Por ello, durante el invierno de 1993, se realizó un estudio del estado de las ceras epicuticulares de los estomas de 9 poblaciones de *Pinus sylvestris* L., en Els Ports de Castellón, Sierra del Toro (Castellón), y las sierras de Javalambre y Albarracín (Teruel). El objetivo era detectar anomalías en la morfología de las ceras epicuticulares de *P. sylvestris* en las zonas potencialmente afectadas por estas elevadas concentraciones de fotooxidantes (especialmente ozono), respecto a zonas control fuera de la influencia de las circulaciones costeras o brisas en verano.

MATERIAL Y METODOS

Material y área de estudio

Los ejemplares de *P. sylvestris* que se pueden encontrar en las masas forestales del Este peninsular, y en general las poblaciones del Sur de Europa, tienen acículas con una edad media de 3

a 4 años (HANISH & KILZ, 1990; HUTTUNEN, 1994). La Península Ibérica se encuentra en el límite sur del área de distribución de esta especie (JALAS & SUOMINEN, 1973), ello puede dar lugar a que la especie presente ciertas peculiaridades en la ecología de sus poblaciones ibéricas, como parece desprenderse de los trabajos de PAUSAS (1994).

Se seleccionaron nueve poblaciones de pino albar, distribuidas en las provincias de Castellón y Teruel (Figura 1). Todas las poblaciones de la provincia de Castellón se encuentran bajo el área de influencia potencial de las brisas procedentes de la costa, que en verano introducen elevadas concentraciones de fotooxidantes por los valles litorales hacia el interior. Este comportamiento de las masas de aire ha sido documentado recientemente (MILLÁN y col. 1992; MILLÁN y col. en prensa), y queda confirmado por los elevados valores de ozono observados en puntos como Morella (MILLÁN y SANZ, 1993, Figura 2a), estación perteneciente a la Red de Control de la Calidad del Aire de la Consellería de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana, o el Tossal Gros, estación automática de calidad del aire gestionada por el ICONA (Figura 2b). En ambas estaciones se han registrado concentraciones de ozono cuya media mensual supera la Directiva Europea para daños a la vegetación de $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante la primavera y el verano. Además, algunas de las poblaciones se encuentran dentro del área de influencia potencial de la C.T. de Andorra (Teruel).

Las poblaciones de las Sierras del Toro (Castellón), Albarracín y Javalambre (Teruel), se seleccionaron como áreas control fuera del alcance de las brisas y dentro de la zona de subsidencia de aire limpio (MILLÁN com. pers.). Aunque no se dispone de datos sobre la calidad del aire de todos los emplazamientos, los datos de la Campaña de julio de 1989 del proyecto MECAPIP (MILLÁN y col. 1992) permitían suponer que este área estaba en la zona de bajas a muy bajas concentraciones de fotooxidantes.

La localización exacta de las poblaciones (Figura 1) se relaciona a continuación:

1. Tossal Gros, Morella (Castellón), 1250 m s.n.m., UTM 30T BE0097.

2. Mas del Gao, Vallibona (Castellón), 700 m s.n.m., UTM 30T BF5099.
3. Les Morrades, Coratxar (Castellón), 1240 m s.n.m., UTM 30T BF5108.
4. Mitjavila, Coratxar (Castellón), 1350 m s.n.m., UTM 30T BE5310.
5. Pinar Pla, Fredes (Castellón), 1200 m s.n.m., UTM 31T BF6109.
6. El Toro (Castellón), 1500 m s.n.m., UTM 30T XK8522.
7. Masía de los Enebrales (Javalambre a), La

- Puebla de Valverde (Teruel), 1300 m s.n.m., UTM 30T XK7051.
8. Corral del Royo (Javalambre b), La Puebla de Valverde (Teruel), 1800 m s.n.m., UTM 30T XK7044.
9. Orihuela del Tremedal, Sierra de Albarracín (Teruel), 1500 m s.n.m., UTM 30T XK1189.

Metodología

Los muestreos se realizaron en noviembre de 1993, durante el paro vegetativo de la especie. En cada una de las poblaciones se seleccionaron

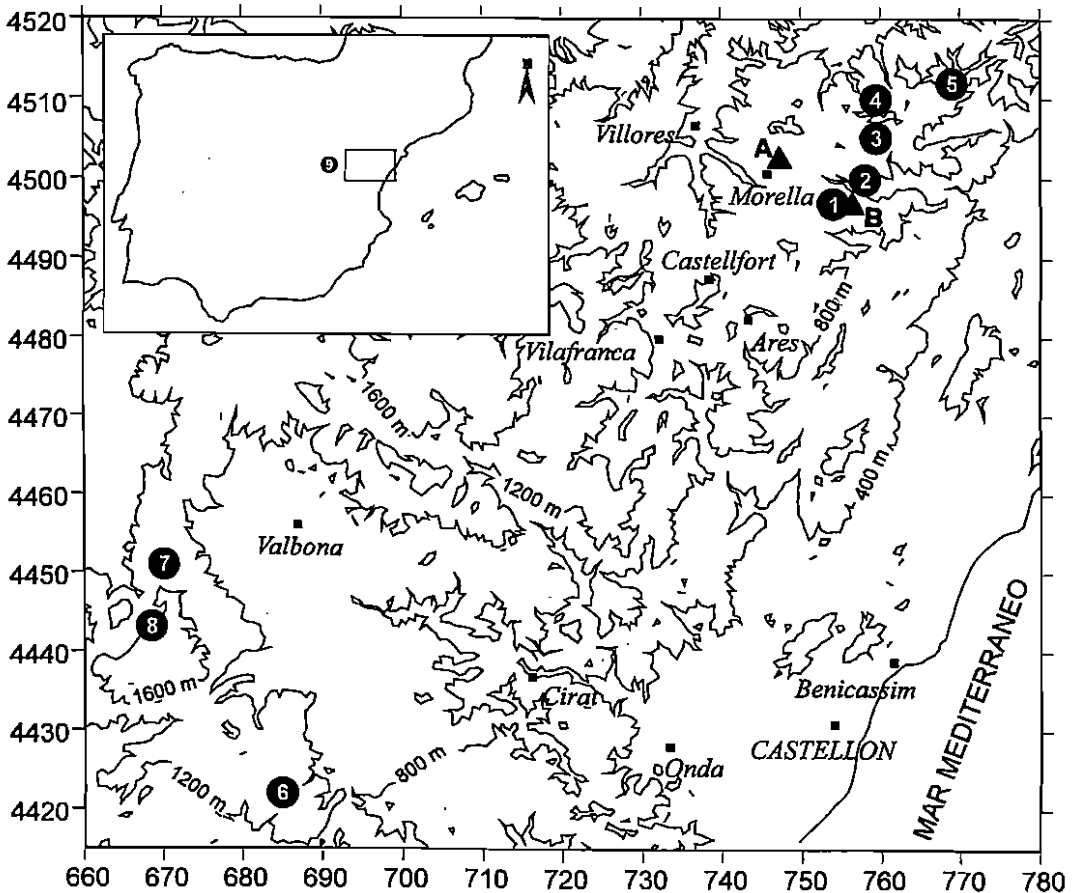
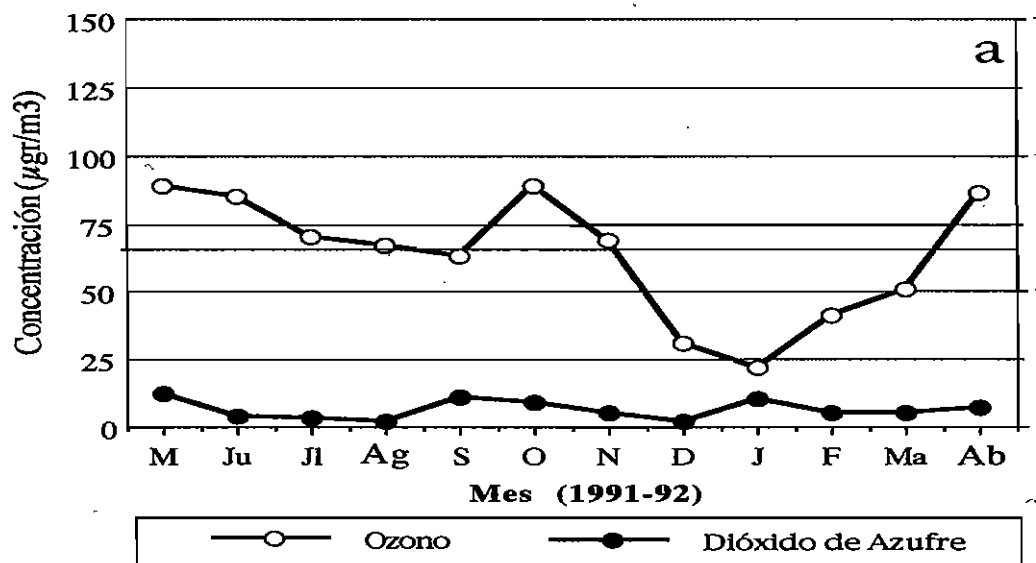


Fig. 1. Localización geográfica de las poblaciones de *Pinus sylvestris* muestreadas. Los ejes indican las coordenadas U.T.M. referidas al uso 30T. La numeración corresponde a la que aparece en el apartado de Material y Métodos. A. Estación de calidad del aire de Morella. B. Estación de calidad del aire del Tossal Gross.

Estación de Calidad del Aire de Morella Generalitat Valenciana



Estación de Calidad del Aire del Tossal Gros ICONA

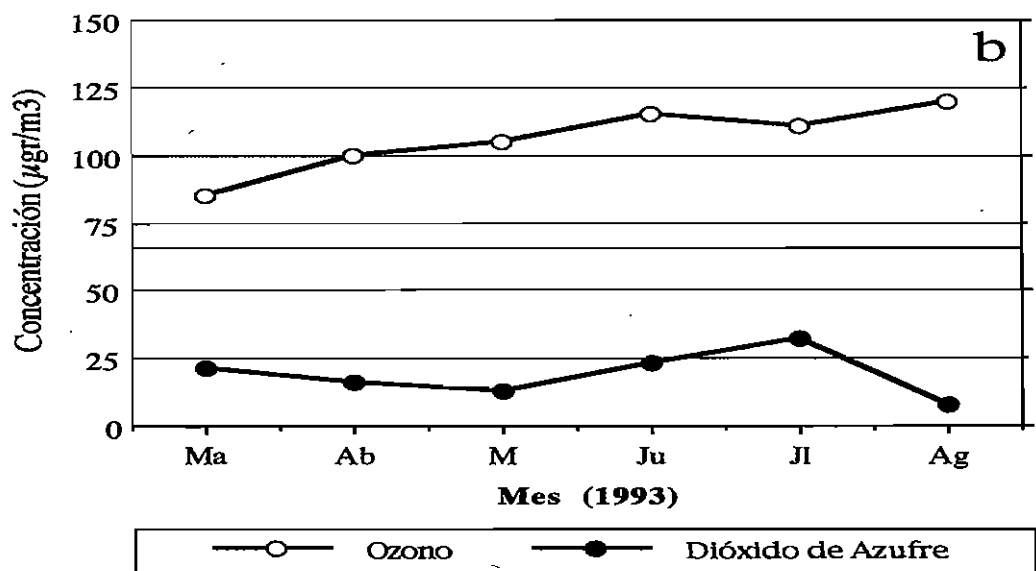


Fig. 2. Medias mensuales de las concentraciones de ozono y dióxido de azufre registradas: a. en la estación sita en Morella perteneciente a la Red de Calidad del Aire de la Generalitat Valenciana; b. en la estación sita en el Tossal Gros perteneciente al ICONA. La línea horizontal continua corresponde a $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

tres pies representativos de la masa, sin deformaciones o daños mecánicos, entre 9 y 15 m de altura, y 70-110 cm de perímetro medido a la altura de 1,5 m.

En cada uno de los pies seleccionados, se cortaron tres ramas de la parte exterior media de la copa en diferentes orientaciones, con la ayuda de unas podadoras acopladas a una pértiga telescópica de 5 m. De cada rama se separaron cinco acículas del penúltimo verticilo, sin daños mecánicos aparentes, con la ayuda de unas pinzas. Posteriormente se montaron en el interior de tubos de plástico para evitar que se produjeran rozamientos entre ellas. Las acículas fueron transportadas al laboratorio en frío (4°C) en 24 h. En el laboratorio se dejaron secar durante 1 día al aire en una habitación con temperatura y humedad constantes, y se almacenaron hasta su observación en recipientes herméticos a -18°C para evitar la re-hidratación (TURUNEN & HUTTUNEN, 1991; KERFOUR & GARREC, 1992). Se optó por este método en lugar de la deshidratación rápida con nitrógeno líquido debido a la posibilidad de fusión de las ceras que por este último método han observado algunos autores (TURUNEN & HUTTUNEN, 1990).

Antes de su observación se montaron en un soporte de aluminio y se sombrearon con oropaladio en un Sputter-Coated BIO-RAD SC500. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Hitachi 4100 de Emisión de Campo.

Con el microscopio electrónico de barrido, se cuantificó la fracción de superficie (en porcentaje) con fusión completa de las ceras en el interior y área periférica de los estomas de cada una de las cinco acículas de cada rama. Para ello se seleccionan aleatoriamente diez estomas de la cara abaxial en la fracción de acícula comprendida entre 5 y 20 mm (comenzando desde el ápice).

Los valores de fusión se han tratado estadísticamente aplicando una ANOVA de una vía, previa transformación de los datos mediante la raíz cuadrada. Para ello se ha utilizado el paquete estadístico SPSS+.

RESULTADOS

En las micrografías (Figura 3) se aprecian grados progresivos de fusión de las ceras epicuticulares

en el interior y periferia de los estomas de *P. sylvestris*. La Figura 3a representa un estoma en perfecto estado, sin fusión aparente de las ceras. Un detalle de la formación progresiva de la «placa» en el reborde anular del estoma se puede apreciar en la Figura 3h, esta es la modificación más común observada en este trabajo. También se han podido observar otras modificaciones, como son la fusión o anastomosis de la parte apical de los tubos (Figura 3f y g).

Se ha optado por dos tipos de representación de los resultados, (a) la utilización del porcentaje medio de fusión de las ceras en cada una de las localidades, y (b) la construcción de cinco intervalos o clases de fusión (Clases de I-V), con objeto de facilitar el estudio de los valores obtenidos. Las clases de fusión consideradas han sido las siguientes: Clase I, 100%; Clase II, 75-99%; Clase III, 50-74%; Clase IV, 25-49% y Clase V, 24-0% de ceras cristalinas sin fusionar. La utilización de clases de fusión es bastante común en trabajos similares al realizado (HUTTUNEN & col., 1992, BACIC & col. 1992), aunque los intervalos utilizados pueden variar según los autores.

En la Figura 4 se representan el porcentaje de estomas perteneciente a cada una de las clases, para cada una de las nueve poblaciones prospectadas. Este tipo de representación permite una percepción más rápida del estado de cada población. Las poblaciones se han dispuesto en el gráfico ordenadas en función de la degradación observada (media de fusión de las ceras para cada una). Se aprecia que en todas las localidades están representadas todas las clases consideradas, en mayor o en menor cuantía, excepto en el Mas del Grao donde no se encontraron estomas en perfecto estado. En las poblaciones en las que los estomas de la clase V son abundantes, las clases I y II están poco representadas.

Los valores brutos de fusión de las ceras (el porcentaje de fusión en cada estoma observado) han sido sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA, $F = 82.07$, $p < 0.001$), después de su transformación mediante la raíz cuadrada, debido a una inicial heterogeneidad de las varianzas.

Ha sido necesaria la eliminación del tratamiento estadístico de la población del Mas del Grao, debido a su pequeña varianza respecto a las demás.

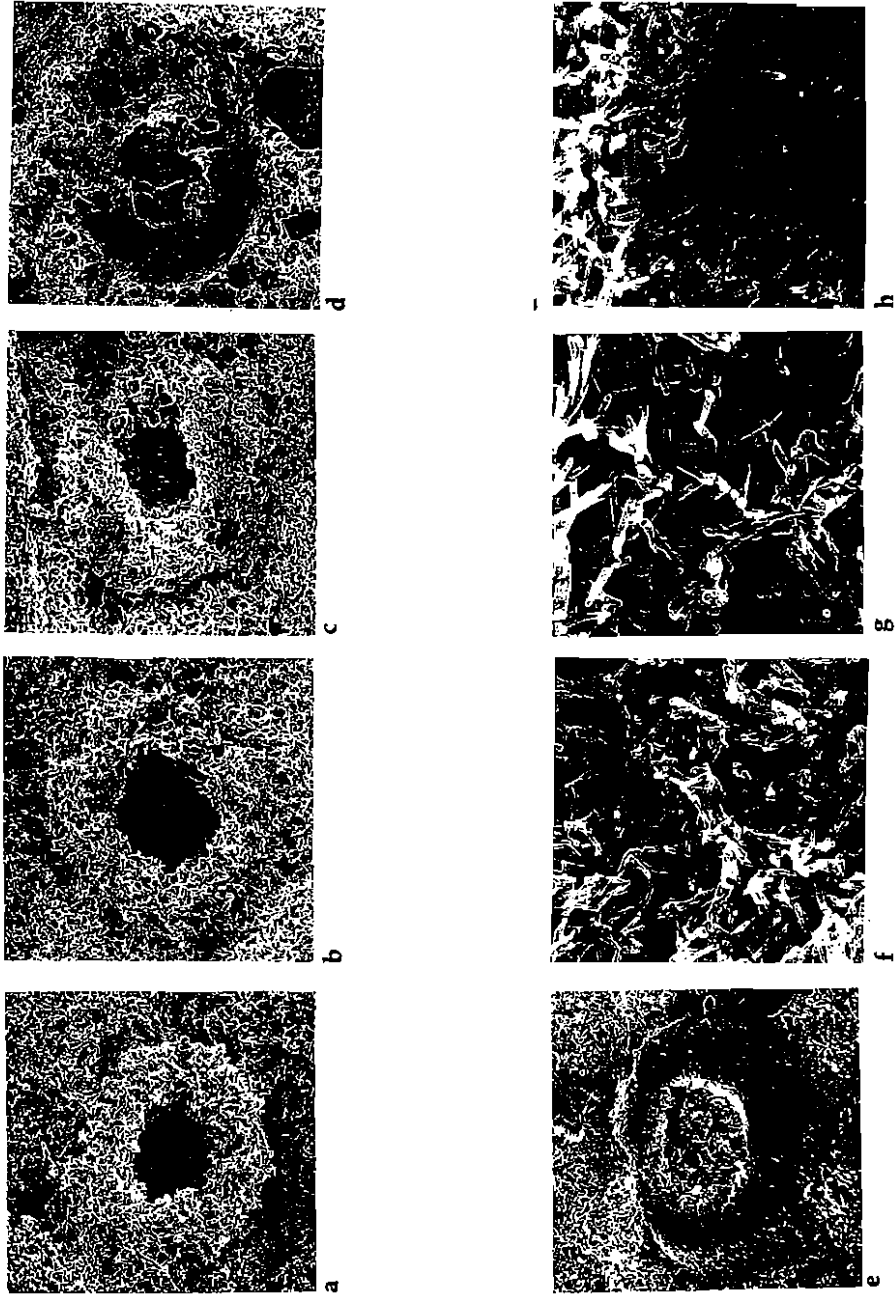


Fig. 3. Micrografías de estados progresivos de degradación de las ceras epicuticulares realizadas con el SEM. Las micrografías a-e representan estados progresivos de degradación de las ceras epicuticulares de los estomas del pino albar. En las micrografías f y g se aprecia el inicio de la fusión de las ceras cristalininas tubulares del borde del estoma del pino albar, en la micrografía h se aprecia un derralle de la incipiente formación de la placa o costra.

Pinus sylvestris

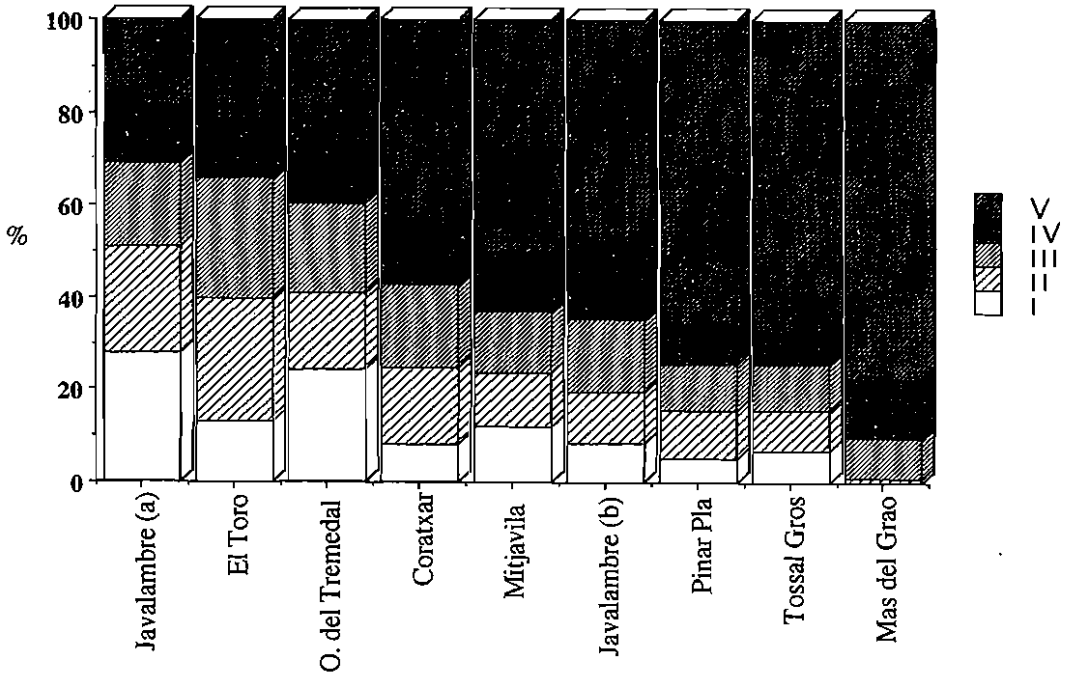


Fig. 4. Porcentaje de cada uno de los intervalos o clases de fusión considerados en el estudio. Las clases de fusión consideradas han sido las siguientes: Clase I, 100%; Clase II, 75-99%; Clase III, 50-74%; Clase IV, 25-49% y V, 24-0% de ceras cristalinas sin fundir.

Se ha atribuido esta pequeña varianza al extremo grado de degradación que sufrían en general prácticamente todos los estomas observados. Mas del Grao es la población que, con diferencia, presenta una mayor fusión en las ceras epicuticulares. Además, se trata de una población situada a 700 m s.n.m., elevación anormalmente baja para esta especie.

El resto de poblaciones forman cuatro grupos significativamente diferentes, de menor a mayor fusión de las ceras (Figura 5).

Grupo a.

La población de Javalambre (a), que se encuentra dentro de la zona de subsidencia de aire con bajas concentraciones de contaminantes entre la celda de brisa costera y la celda de la meseta (MILLÁN y col. 1992). En esta localidad, por su altura y exposición, se registran vientos de cierta intensi-

dad y temperaturas más bajas que en áreas próximas. Las bajas temperaturas y el viento pueden provocar fusión de las ceras (WILSON, 1984), sin embargo, la fusión media registrada es inferior al 40%. Ello indica que la temperatura y el viento no son los que provocan la fusión de las ceras.

Grupo b.

Poblaciones de Orihuela del Tremedal y El Toro. Estas poblaciones durante la mayor parte de la primavera y el verano probablemente se encuentran dentro del área de subsidencia de aire limpio con bajas concentraciones de ozono. Aunque esporádicamente con condiciones de baja térmica Ibérica excepcionalmente fuertes pueden quedar dentro de la influencia de las brisas con elevadas concentraciones de ozono, pero no es probable que esto ocurra de forma habitual (MILLÁN com. pers.).

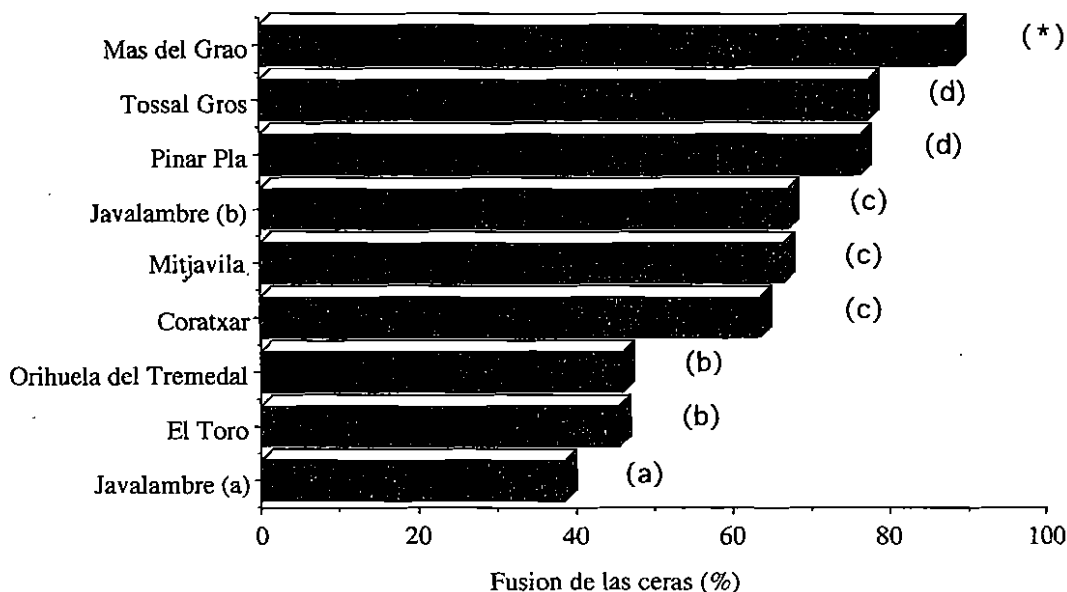
Pinus sylvestris

Fig. 5. Porcentaje medio de fusión de las ceras en cada una de las localidades. Los valores brutos de fusión de las ceras (el porcentaje de fusión en cada estoma observado) han sido sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA, $F = 82.07$, $p < 0.001$), las letras indican los grupos de localidades significativamente diferentes. El asterisco indica que la población del Mas del Grao se ha excluido del análisis de varianza.

Grupo c.

Poblaciones de Javalambre (b), Mitjavila y Coratxar. Estas poblaciones tan aparentemente dispares desde el punto de vista de su situación geográfica tienen un punto en común, las tres se sitúan a bastante altura pero en el borde de un valle por el que se ha documentado la entrada de elevadas concentraciones de fotooxidantes (MILLÁN y col. 1992); el valle del Mijares (Javalambre b) y el Valle del Ebro (Coratxar y Mitjavila).

Grupo d.

Poblaciones del Tossal Gros y Pinar Pla. Ambas son pinares algo más cercanos a la costa. Por su situación no se descarta la presencia de concentraciones elevadas de fotooxidantes. Esta suposición se confirma con los datos de ozono registrados por la estación automática situada en el Tossal Gros, cedidos por el ICONA a la Conselleria de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana (Figura 2). En revisiones recientes de los datos de ozono de esta estación automática y de la de

Morella, se ha constatado que las pautas seguidas por las concentraciones son muy parecidas en ambos casos (datos no publicados).

DISCUSION

El envejecimiento o degradación de las ceras epicuticulares en el pino albar en áreas con y sin contaminación atmosférica, ha sido estudiada por varios autores (HUTTUNEN & LAINE, 1983; CROSSELEY & FOWLER, 1986; BACIC & col. 1992, TURUNEN & col., 1992 y HUTTUNEN, 1994), en general, se produce un aceleramiento del proceso de envejecimiento en las áreas más contaminadas. Este envejecimiento consiste generalmente en un acortamiento, engrosamiento y fusión de los tubos de las ceras que acaban por formar una placa o costra (HUTTUNEN, 1994).

La formación progresiva de una «placa» en el reborde anular del estoma que se aprecia en la Figura 3, es la modificación que se ha cuantificado en este trabajo. La aparición de esta placa

parece estar precedida o acompañada de una fusión o anastomosis de los tubos de cera en su zona apical, como se puede apreciar en la Figura 3f. Esta anastomosis podría constituir una etapa preliminar a la formación de la placa o ser una manifestación independiente, aunque no se ha encontrado información concluyente a este respecto en la bibliografía. Algunos autores describen estos cambios como una secuencia en el tiempo, primero fusión de los tubos y posteriormente formación de una placa o «costra» (HUTTUNEN, 1994), mientras que otros las consideran como modificaciones independientes y debidas a alteración de procesos diferentes (PERCY, KRAUSE & JENSEN, 1990).

La formación de la placa ha sido observada en acículas viejas como resultado del proceso de senescencia normal (BACIC & col. 1992), e inducida en acículas jóvenes por lluvia ácida simulada (TURUNEN & HUTTUNEN, 1990; TURUNEN & col. 1994), por elevadas concentraciones de SO₂ (STASZEWSKI & col., 1994), y ocasionalmente por fumigantes con ozono (RIDING & PERCY, 1985; PERCY & col., 1990; BYNEROWICZ & TURUNEN, 1994). En pino albar se ha constatado la formación de una placa similar a la descrita en los trabajos mencionados. Por otra parte, estas alteraciones se han observado en acículas del segundo verticilo en las que no deberían aparecer síntomas de senescencia todavía; en principio, las ceras deberían estar como las de las poblaciones control. La variabilidad observada entre estaciones parece corresponderse con la información disponible sobre la incidencia de ciertos agentes contaminantes y los conocimientos sobre su dinámica en el área de estudio (MILLÁN y col. 1993). De las cuatro poblaciones inicialmente consideradas como control, sólo la población Javalambre (b) no parece cumplir este supuesto quizás por su situación geográfica. Son, en general, las poblaciones más próximas al mar y a altitudes más bajas las que parecen estar más afectadas. Todo ello induce al planteamiento de la hipótesis de una relación entre la anormalmente

elevada erosión de las ceras epicuticulares en algunas de las poblaciones estudiadas y las relativamente constantes y elevadas concentraciones de fotooxidantes (especialmente ozono) durante la primavera y el verano, aunque esta hipótesis debe ser confirmada en futuros estudios. Además, en estudios anteriores llevados a cabo en la Comarca de Els Ports, se observó también fusión anormal de las ceras epicuticulares en *Pinus nigra* (PICAZO y SANZ, 1990) que fue atribuida a la contaminación atmosférica.

Del estudio realizado se derivan nuevas preguntas, como por ejemplo, ¿se pueden caracterizar por separado diferentes tipos de alteraciones?, esta cuestión ha sido abordada ya por TUOMISTO & NEUVONEN (1993) que han caracterizado cuatro tipos de alteraciones en *Picea abies*. Otro aspecto a considerar en futuros estudios es el cambio en la composición química de las ceras que parece ser la responsable del cambio en la morfología de los tubos (PERCY, JENSEN & MCQUATTIE, C. J., 1992).

El presente estudio plantea una aproximación metodológica, aunque todavía poco elaborada, para la caracterización del estado de las ceras epicuticulares de las coníferas que puede aportar información complementaria a estudios más amplios que valoren el estado de las masas forestales en nuestros bloques.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Consellería de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana por la cesión de los datos de la Red de Calidad del Aire de su estación de Morella. Al Servicio de Protección Contra Agentes Nocivos del ICONA por la autorización para utilizar sus datos de la Estación Automática del Tossal Gros (Morella). Al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valencia, por su ayuda en la obtención de las fotografías que aparecen en este trabajo. A la Dra. Felisa Puche, por su ayuda durante la primera fase de este trabajo.

SUMMARY

The morphology of epicuticular needle wax of nine populations of *Pinus sylvestris* L. from Eastern Spain (Els Ports region and El Toro mountains in Castellón province, and Albarracín and Javalambre mountains in Teruel province) was studied with a scanning electron microscope (SEM) techniques. The aim of the present study was to quantify the degree of fusion of epicuticular waxes from stomata placed in the abaxial side of the needles. The results show that those populations with higher percentages of fusion were from zones influenced by the seabreeze, which is associated with high ozone concentrations. In some of the localities studied, ozone levels during spring and summer were higher than the value proposed by the European directive about vegetation damage ($65 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 24 h. mean).

BIBLIOGRAFIA

- BACIC T.; BAAS P. & VAN DER EERDEN L. J. M. 1992: «Needle wax structure of *Pinus sylvestris* as affected by ammonia». *Acta Bot. Neerl.* 42(2): 167-181.
- BAKER E. A. 1982: «Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes». In: CUTLER D. F., ALVIN K. L., PRICE C. E. (eds.), *The plant cuticle*. Academic Press, London, pp. 139-165.
- BYZNEROWICZ A. & TURUNEN M. 1994: «Effects of ozone exposures on epicuticular wax of ponderosa pine needles». NATO ASI Series, vol. G 36. (*Air Pollutants and Leaf Cuticle*. Ed. PERCY & al.). Springer Verlag Berlin, pp. 305-314.
- CROSSLEY A. & FOWLER D. 1986: «The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clean air». *New Phytol.*, 103: 207-218.
- HANISH B. & KILZ E. 1990: *Monitoring of Forest Damage. Spruce and Pine*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. London.
- HUTTUNEN S. & LAINE K. 1983: «Effects of air borne pollutants on the surface wax structure of *Pinus sylvestris* needles». *Ann. Bot. Fennici.*, 20: 79-86.
- HUTTUNEN S. 1994: «Effects of Air Pollutants on Epicuticular Wax Structure». NATO ASI Series, vol. G 36. (*Air Pollutants and Leaf Cuticle*. Ed. PERCY & al.). Springer Verlag Berlin, pp. 81-96.
- JALAS J. & SUOMINEN J. (eds.), 1973: *Atlas Florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe, vol. 2. Gymnospermae*. The Committee for Mapping The Flora of Europe, Helsinki.
- KERFOUR C. & GAREC J. P. 1992: «Modifications in the alkane composition of cuticular waxes from Spruce needles (*Picea abies*) and ivy leaves (*Hedera helix*) exposed to ozone fumigation and acid fog: comparison with needles from declining spruce trees. *Can. J. of Botany*, 70: 861-869.
- MILLÁN M. y SANZ M. J. 1993: *La contaminación Atmosférica en la Comunidad Valenciana: Estado de Conocimientos sobre los Problemas en el Maestrazgo y Els Ports de Castellón*. Informes CEAM 93-1. 2nd Edición.
- MILLÁN M.; ARTIÑANO B.; ALONSO L.; CASTRO M.; FERNÁNDEZ-PATIER R. & GOBERNA J. 1992: *Meso-meteorological Cycles of Air Pollution in the Iberian Peninsula*. Contract EV4V-0097-E. CE. Air Pollution Research Report 44. Brussels. 219 pp.
- MILLÁN M.; SALVADOR R. y MANTILLA E. En prensa: «Meteorology and photochemical air pollution in southern Europe: Experimental results from EC research projects». *Atmospheric Environ.*, 30.
- PAUSAS J. G.; CARCELLER F. y VALLEJO V. R. 1994: «El desfonde en bosques de *Pinus sylvestris* L. en relación con las características climáticas». *Ecología*, 8: 167-176.
- PERCY K. y BAKER E. A. 1987: «Effects of simulated acid rain on production, morphology and composition of epicuticular wax and on cuticular membrane development». *New Phytol.* 107: 577-589.
- PERCY K. y BAKER E. A. 1988: «Effects of simulated acid rain leaf wettability, rain retention and uptake of some inorganic ions». *New Phytol.* 108: 75-82.
- PERCY K.; JENSEN K. F. & MCQUATTIE C. J. 1992: «Effects of ozone and acidic fog on red spruce needle epicuticular wax production, chemical composition, cuticular membrane ultrastructure and needle wettability». *New Phytol.* 122: 71-80.

- PERCY K.; KRAUSE C. R. & JENSEN K. F. 1990: «Effects of ozone and acidic fog on red spruce needle epicuticular wax ultrastructure». *Can. J. For. Res.* 20: 117-120.
- PICAZO I. y SANZ A. 1990: «Efecto de la contaminación ambiental sobre las superficies foliares de *Pinus nigra* de Els Ports (Castellón)». *Medi Natural*, 2: 57-66.
- RIDING R. T. & PERCY K. 1985: «Effects of SO₂ and other air pollutants on the morphology of epicuticular waxes of needles of *Pinus strobus* and *Pinus banksiana*». *New Phytol.*, 99: 555-563.
- STASZEWSKI T.; GODZIK S. & POBORSKI P. 1994: «Physico-chemical characteristics of pine needle surface exposed to different air pollution sources». NATO ASI Series, vol. G 36. (*Air Pollutants and Leaf Cuticule*. Ed. PERCY & al.). Springer Verlag Berlin, pp. 341-350.
- TUOMISTO H. 1988: «Use of *Picea abies* needles as indicators of air pollution: epicuticular wax morphology». *Ann. Bot. Fennici.*, 25: 351-364.
- TUOMISTO H. & NEUVONEN S. 1993: «How to quantify differences in epicuticular wax morphology of *Picea abies* (L.) Karst. needles». *New Phytol.*, 123: 787-799.
- TURUNEN M. & HUTTUNEN S. 1990: «A review of the response of epicuticular wax of conifer needles to air pollution». *J. of Environ. Qual.*, 19(1): 35-45.
- TURUNEN M. & HUTTUNEN S. 1991: «Effect of simulated acid rain on epicuticular wax of Scots pine needles under northerly conditions». *Can. J. of Bot.*, 69: 412-419.
- TURUNEN M.; HUTTUNEN S.; STASZEWSKI T. & POBORSKI P. 1992: «Influence of the climate and air pollution on needle surface characteristics in the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)». In: *Responses of Forest Ecosystems to Environmental Changes* (TELLER, MATHY & JEFFERS eds.), 643-644. Elsevier Applied Science.
- TURUNEN M.; HUTTUNEN S. & BACK J. 1994^o: «Observations on the effect of acid rain treatment on needle surface of Scots Pine and Norway Spruce Seedlings». NATO ASI Series, vol G 36 (*Air Pollutants and Leaf Cuticule*. Ed. PERCY et al.). Springer Verlag Berlin, pp. 315-319.
- WILSON J. 1984: «Microscopic features of wind damage to leaves of *Acer pseudoplatanus* L.». *Ann. of Bot.*, 53: 73-82.