



Bosque

ISSN: 0304-8799

revistabosque@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

Rodríguez-Calcerrada, Jesús; Salomón, Roberto; Gil, Luis
Transporte y reciclaje de CO₂ en el interior del árbol: factores que complican la estimación de la
respiración leñosa a través de la emisión radial de CO₂
Bosque, vol. 36, núm. 1, 2015, pp. 5-14
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173136974002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

REVISIONES

Transporte y reciclaje de CO₂ en el interior del árbol: factores que complican la estimación de la respiración leñosa a través de la emisión radial de CO₂

Transport and recycling of CO₂ inside trees – factors complicating the estimation of wood respiration through CO₂ radial efflux

Jesús Rodríguez-Calcerrada^{a*}, Roberto Salomón, Luis Gil^a

*Autor de Correspondencia: ^a Universidad Politécnica de Madrid, GENFOR Grupo de Investigación en Genética y Fisiología Forestal, E.T.S.I. Montes, Ciudad Universitaria S/N, 28040 Madrid, España, tel.: 0034 913367113, jesus.ralcerrada@upm.es

SUMMARY

Tree trunks and roots have a variable and often important proportion of live cells. Respiration provides energy and carbon skeletons required by these living cells for their maintenance and proliferation. In the process of respiration, soluble sugars previously synthesized by leaves and young stems are oxidized and carbon dioxide (CO₂) is produced as a byproduct. For this reason, it has been amply considered that rates of radial CO₂ efflux from trunks and stems are equivalent to rates of respiration. However, it has been observed that the CO₂ produced in respiration does not immediately or fully diffuse out to the atmosphere. Thus, even if in some circumstances radial CO₂ efflux is a good surrogate of wood respiration, we must not consider both variables as equivalent. In 2008, Teskey *et al.* reviewed the main factors affecting the concentration, mobility and emission of CO₂ in tree stems, namely: cortical photosynthesis, resistance of anatomical elements to radial CO₂ diffusion, and solubility and transport of CO₂ in xylem sap. Here we update this topic with recent findings reported in literature and in Spanish language. With this work we intend to engage a broader audience in the investigation of wood CO₂ efflux and respiration, an understudied topic of central importance for modeling the carbon balance of forest ecosystems and the atmospheric CO₂ concentration in the future.

Key words: carbon flux, respiratory metabolism, carbon pool, forest decline, CO₂ internal transport.

RESUMEN

Los troncos y raíces de los árboles tienen una proporción de células vivas variable, que en algunas especies, por ejemplo de angiospermas, puede llegar a ser elevada. El mantenimiento de las células y su proliferación son posibles gracias a la energía procedente de la respiración. En este proceso se consumen azúcares, generándose energía, precursores de numerosos compuestos químicos, y dióxido de carbono (CO₂). Tradicionalmente se ha considerado que la tasa de emisión de CO₂ de los troncos y las raíces era equivalente a su tasa de respiración. Sin embargo, desde hace ya varias décadas, se ha observado que la liberación de CO₂ desde el interior de las células hasta la atmósfera no es completa ni inmediata, por lo que la emisión de CO₂ de un segmento de tronco o raíz no debe considerarse como el reflejo de su tasa de respiración, aunque en determinadas circunstancias pueda ser un indicador muy próximo. En 2008, Teskey *et al.* revisaron los principales factores que afectan la concentración, movilidad y emisión de CO₂ en los troncos; principalmente la fotosíntesis cortical, la resistencia de los tejidos a la difusión de CO₂ y la solubilidad del mismo en la savia. En este trabajo queremos actualizar el conocimiento sobre tales procesos y dar a conocer, en lengua española, la complejidad de un tema, el de la respiración de los órganos leñosos, que tiene una relevancia en la investigación sobre la sanidad de los bosques mayor de la que se le ha dado hasta ahora.

Palabras clave: flujo de carbono, stock de carbono, metabolismo respiratorio, decaimiento del bosque.

INTRODUCCIÓN

La respiración proporciona energía y productos intermedios a otras vías metabólicas esenciales para la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. En el proceso de la respiración los árboles consumen parte de los azúcares asimilados previamente a través de la fotosíntesis, una parte variable según las especies, la edad, las condiciones ambientales y la época del año, que suele oscilar entre

el 40 y el 60 % entre ecosistemas forestales (Rambal *et al.* 2014). En determinadas circunstancias, por ejemplo cuando se suceden periodos desfavorables como heladas, sequías, enfermedades o plagas de insectos, el mantenimiento de la actividad respiratoria puede llegar a desequilibrar las reservas de carbono (azúcares solubles y almidón) del árbol. Es importante conocer cómo las tasas de respiración se ven afectadas por las variaciones ambientales para llegar a modelizar su efecto en los árboles y predecir el estado de los

bosques en el futuro. Sin embargo, en el caso de los órganos leñosos, la cuantificación de la respiración no es una tarea sencilla (Teskey *et al.* 2008, Trumbore *et al.* 2013). Aunque la madera tiene una actividad metabólica relativamente baja, su contribución a la biomasa del bosque es elevada. Por ejemplo, en robledales mediterráneos perennifolios de hoja ancha, la biomasa de ramas y troncos supone aproximadamente 5 kg m⁻² de carbono, algo menos que las raíces (6 kg m⁻²), y en conjunto suponen más del 95 % de la biomasa del árbol (Peñuelas *et al.* 2004). Por este motivo, la imprecisión en la cuantificación de la respiración de los órganos leñosos puede tener repercusiones importantes a la escala del bosque. Es necesario entender mejor la respiración leñosa para ser capaces de modelizar su evolución en el futuro y su impacto en el balance de carbono de los bosques e incluso en la concentración atmosférica de CO₂. El objetivo de este trabajo es hacer una revisión concisa de los procesos físicos y biológicos que modulan los flujos de CO₂ en el árbol; en concreto, se hace hincapié en diversos factores que afectan al flujo radial de CO₂ desde el interior del tronco o la raíz hasta la atmósfera, y que por tanto limitan la utilidad de la emisión de CO₂ como estimador de la respiración de las células vivas del tronco o la raíz. Se considera importante difundir esta información de forma sencilla y en lengua española, de manera que pueda resultar útil a científicos, gestores, y estudiantes que inicien su investigación en el tema.

Entre los trabajos pioneros en el estudio de la respiración leñosa destacan los de Müller (1924) y Johansson (1933). En ellos, y en la literatura precedente, se asumía que la tasa de emisión de CO₂ de los tallos equivalía a su tasa respiratoria. Este fundamento ha sido y es la base para estudiar diversos aspectos ecológicos forestales relacionados con la respiración leñosa, como su importancia en la adaptación del árbol al medio (Ryan *et al.* 1995), la variación con los tratamientos selvícolas (Lavigne 1987), la influencia de factores climáticos (Rodríguez-Calcerrada *et al.* 2014a) y la separación de costes de mantenimiento y crecimiento (Ryan 1990). También a partir de medidas puntuales se llega a modelizar la respiración de troncos y raíces a grandes escalas espaciales, por ejemplo a las escalas de rodal, bosque o región, empleando ecuaciones de extrapolación (*ups-caling*) que incluyen la superficie total o más comúnmente el volumen de albura del árbol por unidad de superficie de terreno (Rodríguez-Calcerrada *et al.* 2014a). El éxito de este enfoque (medir la emisión de CO₂ para estimar la respiración) se basó en tres ventajas que ofrece en comparación con otros métodos: escasa perturbación en el árbol, posibilidad de muestrear zonas amplias simultáneamente, y relativa sencillez en la adquisición de datos. Hoy en día se sigue empleando la emisión de CO₂ para estimar la respiración de troncos y raíces, pero en la mayoría de trabajos se reconocen las limitaciones para considerarlo como un equivalente inequívoco de la tasa de respiración. Estas limitaciones están relacionadas principalmente con tres mecanismos que se detallan en las secciones siguientes: la resistencia al transporte radial del CO₂; el transporte axial del CO₂ disuelto en la sa-

via; y el reciclaje del CO₂ en el interior del tronco a través de la fotosíntesis y otras reacciones químicas (figura 1).

RESISTENCIA AL FLUJO RADIAL DE CO₂

El CO₂ que se produce en el interior de la mitocondria durante la respiración acaba liberándose a la atmósfera tras atravesar múltiples barreras. El CO₂ emitido por una célula de parénquima del xilema de un tronco debe atravesar primero las membranas y la pared celular; y una vez en los espacios intercelulares del tronco, no difunde rápidamente hacia el exterior, sino que se ve ralentizado por los elementos conductores del xilema y por el cambium, el floema y, por último, la corteza externa. En el xilema, la disposición y estructura de los elementos conductores, así como la estructura de las membranas de las punteaduras que conectan los elementos conductores y a estos con el parénquima radialmente influyen en la permeabilidad al paso del CO₂ (Gartner *et al.* 2004, Kitin *et al.* 2009). El cambium, debido a su elevado contenido hídrico (de Schepper *et al.* 2012) y a la elevada resistencia del agua a la difusión del CO₂ (~10⁴ veces mayor que la del aire), ofrece una elevada resistencia al flujo de CO₂ hacia el exterior, siendo su permeabilidad dependiente de los espacios entre las células iniciales de los radios parenquimáticos (Hook and Brown 1972). La corteza externa es el último elemento que ralentiza la difusión de CO₂, siendo su grosor, estructura (*e.g.* presencia de lenticelas) y composición química, los principales factores que afectan a su permeabilidad (Pfanz *et al.* 2002).

Las barreras al flujo radial de CO₂ no son solo físicas. La proporción de aire y savia en el interior del tronco afecta la rapidez con que el CO₂ difunde hacia el exterior. También la propia concentración de CO₂ en el interior del tronco afecta al flujo radial. Cuanto mayor es la concentración interna de CO₂, mayor es la velocidad de emisión al exterior, debido al movimiento del CO₂ por difusión hacia zonas con menor concentración. En este sentido, una manera de cuantificar la resistencia al flujo radial es a través de la relación entre la diferencia de concentración interna y externa de CO₂ y la tasa de emisión. La pendiente de esta relación varía entre árboles, incluso entre clones, e indican una resistencia al flujo radial variable, de modo que cuanto mayor es la pendiente, mayor es la resistencia al flujo de salida (Steppe *et al.* 2007; figura 2).

En cierto modo la resistencia al flujo radial también puede evaluarse comparando el grado de ajuste de la tasa de emisión de CO₂ y la temperatura. Debido al efecto de la temperatura en la velocidad de las reacciones enzimáticas, la temperatura y la emisión de CO₂ están generalmente relacionadas de manera exponencial. En ocasiones, el grado de ajuste entre ambas variables es mayor cuando se considera la temperatura previa a la medida de emisión de CO₂ en lugar de la temperatura simultánea (Ryan *et al.* 1995; figura 3). Este desfase temporal, que depende de la propia evolución de la temperatura del tronco a lo largo del día, podría estar ligado a la resistencia al flujo radial de CO₂. Cuanto ma-

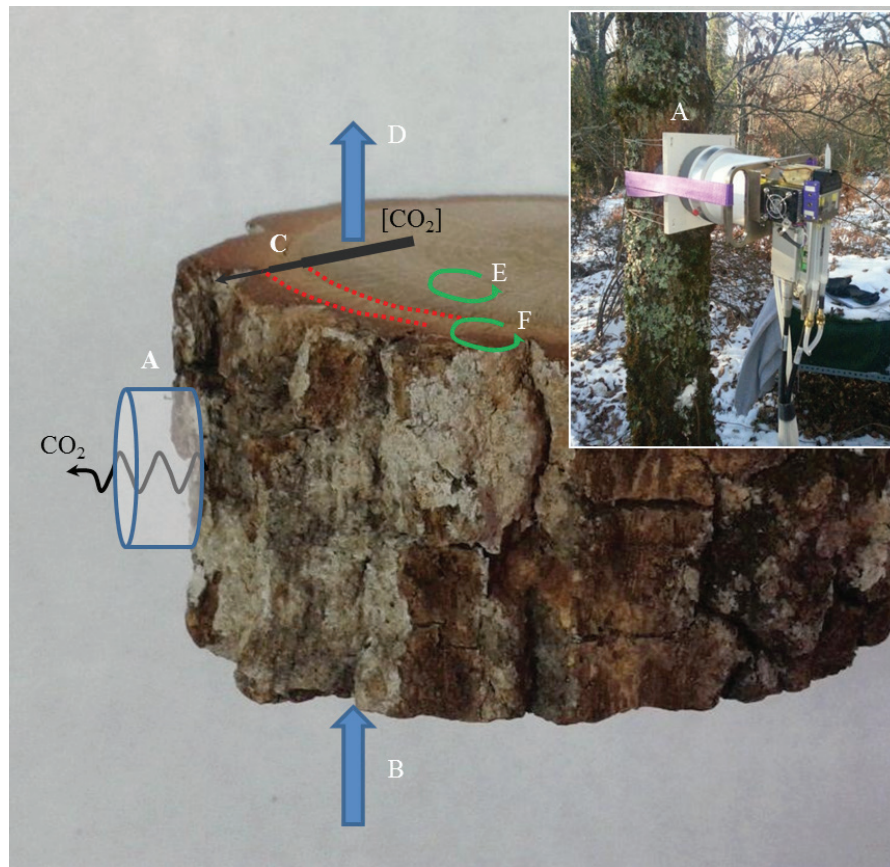


Figura 1. Los troncos de los árboles liberan dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera a través de la corteza. Una parte del CO₂ que se registra en un punto concreto del tronco, por ejemplo, utilizando un equipo de análisis de gases por infrarrojo (A), procede de la respiración de las células vivas subyacentes. Sin embargo, otra parte puede provenir disuelto en la savia de otras zonas del árbol, por ejemplo las raíces, o incluso del suelo (B). Además, el CO₂ que se produce en la respiración de las células locales no difunde instantáneamente ni en su totalidad hacia el exterior. Diversas barreras físico-químicas limitan la difusión hacia la atmósfera, por ejemplo el cambium y la corteza, y hacen que el CO₂ se acumule en el interior del tronco (C), donde puede disolverse en la savia bruta y transportarse hacia la parte superior del árbol (D), o re-asimilarse a través de reacciones químicas en células no fotosintéticas, (E) y de la fotosíntesis cortical (F) en troncos más jóvenes. Figura basada en Teskey *et al.* (2008).

Tree stems release carbon dioxide (CO₂) through bark. A part of the CO₂ measured in a point of the stem, for example using a portable infra-red gas analyzer system (A), comes from the respiration of the living cells beneath. However, part of the CO₂ which is being recorded in that point can come from the roots or even the soil transported in the sap flow (B). Moreover, the CO₂ respired locally does not fully or immediately diffuse to the atmosphere. Several physicochemical barriers limit CO₂ radial diffusion, such as the cambium, phloem and bark, and make CO₂ accumulates in the xylem, where it can dissolve in the sap and move upwards (D) or be re-assimilated through non-photosynthetic (E) and photosynthetic (F) reactions. Figure based on Teskey *et al.* (2008).

yor es el intervalo temporal para un mejor ajuste entre la emisión de CO₂ y la temperatura, mayor es la resistencia al flujo radial de CO₂. En ocasiones este desfase es de varias horas (Ryan *et al.* 1995, Maier y Clinton 2006), hecho que sugiere que el CO₂ tarda varias horas en atravesar el tronco y liberarse a la atmósfera, y es coherente con los rangos de resistencia a la difusión observados por Steppe *et al.* (2007). No obstante, la anomalía en la relación entre el flujo radial de CO₂ y la temperatura también podría corresponderse con otros fenómenos, como el transporte de CO₂ en el flujo de savia (McGuire y Teskey 2002, 2004, Hölttä y Kolari 2009, Tarvainen *et al.* 2014), descrito en la sección siguiente.

Las limitaciones a la difusión radial de CO₂ tienen como consecuencia que la emisión de CO₂ pueda no ser indicativa de la actividad respiratoria actual, sino de la actividad respiratoria previa.

TRANSPORTE AXIAL DE CO₂

Como consecuencia de la respiración de los tejidos vivos y de las barreras a la difusión del CO₂, este se acumula en el interior del tronco hasta alcanzar, en algunas ocasiones, concentraciones 650 veces superiores a la atmosférica (e.g. 26 % en árboles de *Quercus agrifolia* Nee.,

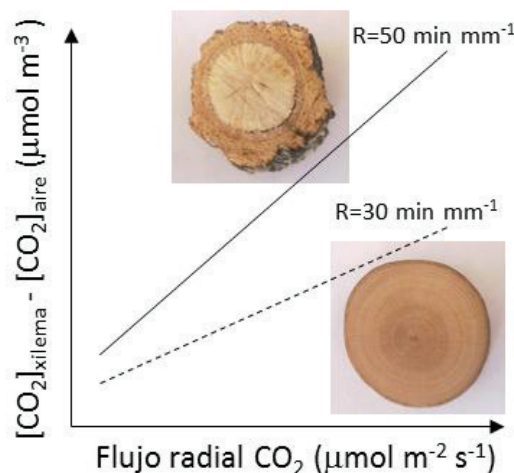


Figura 2. La resistencia al flujo radial de CO₂ desde el xilema hasta la atmósfera se puede estimar como la pendiente entre tal flujo (eje de abscisas) y la diferencia entre la concentración de CO₂ dentro y fuera del árbol (eje de ordenadas). Por ejemplo, un individuo de una especie con un grueso ritidoma (*Quercus suber* L.) podría ofrecer mayor resistencia a la salida del CO₂ que otro perteneciente a una especie con un ritidoma menos grueso (*Fagus sylvatica* L.). Datos teóricos basados en el estudio de Steppe *et al.* (2007).

Resistance to radial CO₂ efflux from the xylem to the atmosphere can be calculated as the slope of the linear relationship between radial CO₂ efflux (X axis) and the difference between the concentration of CO₂ inside and outside of the tree (Y axis). For example, the resistance to radial CO₂ efflux could be higher in an individual with thick bark (*Quercus suber* L.) than in another belonging to a species with thinner bark (*Fagus sylvatica* L.). Theoretical data based on Steppe *et al.* (2007).

Teskey *et al.* 2008). Una parte del CO₂ que se acumula en el tronco se disuelve en la savia y es transportado hacia la parte superior del árbol gracias a la transpiración. Por ello, sería posible que durante el día se infraestimase la tasa de respiración en un punto a partir de la tasa de emisión de CO₂. De igual manera, una parte del CO₂ que se origina en las raíces o incluso en el suelo viaja en la savia hacia el tronco (Teskey y McGuire 2007), y como consecuencia, se podría registrar una emisión de CO₂ en un punto del tronco superior a la tasa de respiración que realmente tienen las células subyacentes. En ambos casos, la “exportación” o la “importación” de CO₂ desde o hacia el punto donde se está midiendo la emisión radial de CO₂ genera incertidumbre en atribuir dicha tasa de emisión a la de la respiración (Trumbore *et al.* 2013). Ya en los años 30 del siglo pasado surgieron las primeras críticas en este sentido (Teskey *et al.* 2008).

El impacto del transporte axial de CO₂ en la fiabilidad de la emisión de CO₂ como indicador de la respiración dependerá de la solubilidad del CO₂ en la savia y de la tasa de transpiración del árbol. Atendiendo a la Ley de Henry, el CO₂ disuelto en la savia se encuentra en equilibrio con

el CO₂ en fase gaseosa – medible con microelectrodos o sensores no dispersivos de infrarrojo (NDIR) – y puede ser estimado una vez conocido el pH y la temperatura de la savia, aplicando las ecuaciones expuestas en McGuire y Teskey (2002). En especies con flujos de savia elevados, por ejemplo especies riparias, el impacto podría ser mayor que en aquellas con menores flujos de savia, por ejemplo, especies Mediterráneas adaptadas a la sequía como *Quercus ilex* L. (Rodríguez-Calcerrada *et al.* 2014a). Es posible estimar la magnitud del flujo axial de CO₂ a partir de la concentración de CO₂ interna y el flujo, temperatura y pH de la savia. Si además se mide la emisión (radial) de CO₂ y las variaciones de la concentración de CO₂ internas, se puede llegar a estimar la respiración como la suma de los tres componentes (McGuire y Teskey 2004; figura 4). En el trabajo de McGuire y Teskey (2004) el flujo axial registrado en un periodo de 24 h variaba entre 0.6 y 3.2 mol CO₂ m⁻³ albura en *Liquidambar styraciflua* L. y *Platanus occidentalis* L., respectivamente, lo que suponía un 14 y un 55 % de la respiración.

También la velocidad de savia o la solubilidad del CO₂, y por tanto el flujo axial de CO₂, pueden variar a lo largo del tiempo, por ejemplo a lo largo del día y el año. Se ha visto que en algunas especies el pH de la savia, y por tanto la solubilidad del CO₂, varían estacionalmente de manera marcada, aunque no en otras, probablemente debido al efecto variable del flujo de savia en la concentración de cationes y aniones de la savia (Aubrey *et al.* 2011, Erda *et al.* 2014). A lo largo del día, la contribución del flujo axial de CO₂ a la respiración obviamente también cambia, siendo menor durante la noche, cuando el flujo de savia es prácticamente nulo. Por ejemplo, en el trabajo de McGuire y Teskey (2004), la albura de *Platanus occidentalis* exhibía un flujo axial en las horas centrales del día en que la transpiración era máxima muy superior al registrado durante 24 h (103 mmol CO₂ m⁻³ s⁻¹), es decir un 71 % de la respiración estimada a partir del balance de masa entre el flujo axial, radial y de almacenamiento del CO₂. Igualmente, Saveyn *et al.* (2008) observaron que el flujo axial en *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. variaba entre 1,3 y 4,8 mol CO₂ m⁻³ albura día⁻¹ (es decir 3 y 18 % del total de la respiración) en días nublados y soleados, respectivamente. Fue precisamente el hecho de que la emisión de CO₂ fuese menor a lo largo del día que la noche, a una temperatura comparable (figura 4), lo que indujo a pensar que, durante el día, la savia transportaba CO₂. Varios autores han observado una relación negativa entre el flujo de savia y la emisión de CO₂, y han discutido esta relación como el resultado del transporte de CO₂ en la savia a otras zonas del árbol (Negisi *et al.* 1979, McGuire *et al.* 2007). De modo parecido, se podría interpretar la relación positiva entre el flujo de savia y la emisión de CO₂ en el tronco como el resultado de la “importación” de CO₂ desde las raíces o el suelo hasta el punto donde se mide la emisión de CO₂ (Zach *et al.* 2010, Bužková *et al.* 2014). En otras ocasiones, se ha observado que a elevadas tasas de transpiración aumenta la depresión diurna de emisión de

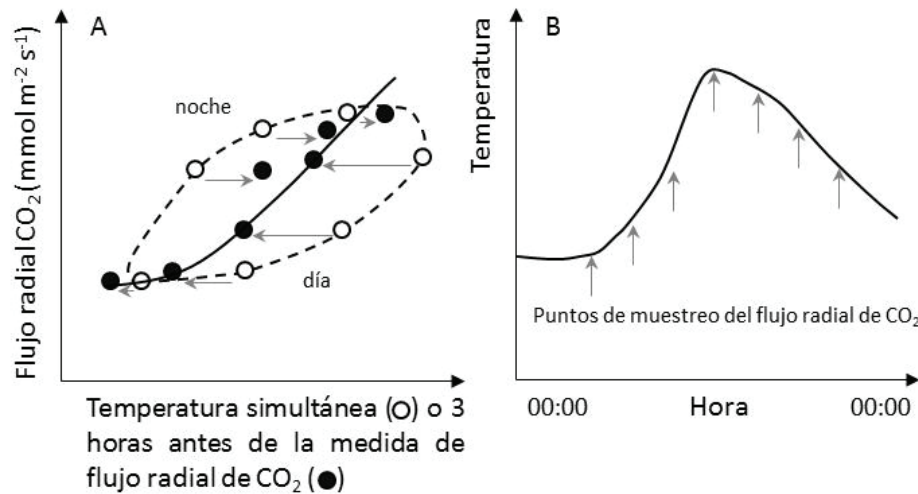


Figura 3. A) El flujo radial de CO₂ a menudo muestra una relación de histéresis con la temperatura del tronco a la que se realiza la medida, es decir, a una misma temperatura, los valores de flujo son más bajos por el día que por la noche. En ocasiones, si se relaciona el flujo radial de CO₂ con la temperatura que se registraba varias horas antes de la medida, la histéresis desaparece y la relación se ajusta mejor a una curva exponencial. Una posible explicación de este fenómeno es que, debido a la resistencia que ofrece el tronco a la difusión de CO₂, el flujo que se registra en un momento dado se corresponde mejor con la temperatura que se registraba horas antes que con la temperatura simultánea. B) En relación con esto, a menudo el incremento de la temperatura durante el día es más rápido que el descenso vespertino, de modo que, por el día, la diferencia entre la temperatura registrada en el momento de medir el flujo radial de CO₂ y, por ejemplo, la que se registraba 3 horas antes, es mayor que por la noche. Datos teóricos basados en trabajos previos observando tendencias similares en *Pinus taeda* L. (Maier y Clinton 2006) y *Quercus ilex* (Rodríguez-Calcerrada *et al.* 2014a).

A) Radial CO₂ efflux often shows a hysteretic relationship with concomitant temperature; that is, at a given temperature, values of radial CO₂ efflux are lower during the day than at night. Sometimes the hysteresis disappears when radial CO₂ efflux is related to the temperature recorded several hours before instead of the concomitant temperature. A possible explanation of this phenomenon is that, because of stem resistance to CO₂ radial diffusion, CO₂ efflux at a given time is actually reflecting the respiratory activity of living cells at previous temperatures. B) The rise of temperature during the day is higher than the decrease during the evening; thus, during the day, the difference between the temperature recorded at the time of measuring radial CO₂ efflux and that recorded, for example, 3 hours before, is higher than during the night. Theoretical data based on previous works reporting similar trends in *Pinus taeda* L. (Maier and Clinton 2006) and *Quercus ilex* (Rodríguez-Calcerrada *et al.* 2014a).

CO₂ (medida como la diferencia entre la emisión diurna de CO₂ observada y estimada a partir de los valores de temperatura y emisión de CO₂ nocturnos; Maier y Clinton 2006, Hölttä y Kolari 2009, Etzold *et al.* 2013, figura 5). La prueba definitiva del transporte axial de CO₂ la han proporcionado los estudios con marcadores isotópicos de carbono, que han mostrado como CO₂ marcado incorporado a la planta por las raíces llega hasta las hojas donde se asimila a través de la fotosíntesis (Bloemen *et al.* 2013).

A pesar de las evidencias irrefutables de la existencia de un transporte de CO₂ a lo largo del árbol, es muy probable que la histéresis en la relación entre la temperatura y la emisión de CO₂ no se deba única y exclusivamente al flujo de savia. Esta afirmación se debe a la existencia de trabajos en los que se aprecia que la variación del flujo de savia no se corresponde con la variación en la emisión de CO₂ (Edwards y Wullschlegler 2000), o se discute que el estatus hídrico de la planta, relacionado con los procesos metabólicos de crecimiento y mantenimiento celular, ejerce un papel importante en las emisiones de CO₂ (Saveyn *et al.* 2007). Nuestros datos en árboles de *Quercus pyrenaica* Willd. y *Populus canadensis* también muestran una buena

correlación entre flujo de savia y depresión diurna de CO₂ en momentos de alta transpiración; sin embargo, en ausencia de flujo de savia, la depresión en la emisión de CO₂ muestra mejores correlaciones con potenciales hídricos o potenciales de turgencia, sugiriendo que el estatus hídrico de la planta subyacente a los flujos de savia es el causante principal de estas depresiones en la emisión de CO₂ (Salomón *et al.* datos sin publicar). La fotosíntesis en las células de clorénquima situadas bajo la peridermis de los tallos – proceso descrito en la siguiente sección – también podría hacer que la emisión de CO₂ diurna fuese menor que la nocturna a una temperatura dada (Pfanz *et al.* 2002).

La temperatura y la sequía en climas estacionales pueden variar a lo largo del año y afectar el flujo de savia, el flujo axial de CO₂, y por tanto, la precisión con que la emisión de CO₂ refleja la respiración. Sin embargo, existen aún muy pocos trabajos que hayan explorado este aspecto a lo largo de periodos de tiempo prolongados. A fecha actual, solo Etzold *et al.* (2013) han evaluado las variaciones estacionales de la concentración de CO₂ en el interior de troncos, de *Picea abies* (L.) Karst., y su relación con factores físicos y biológicos.

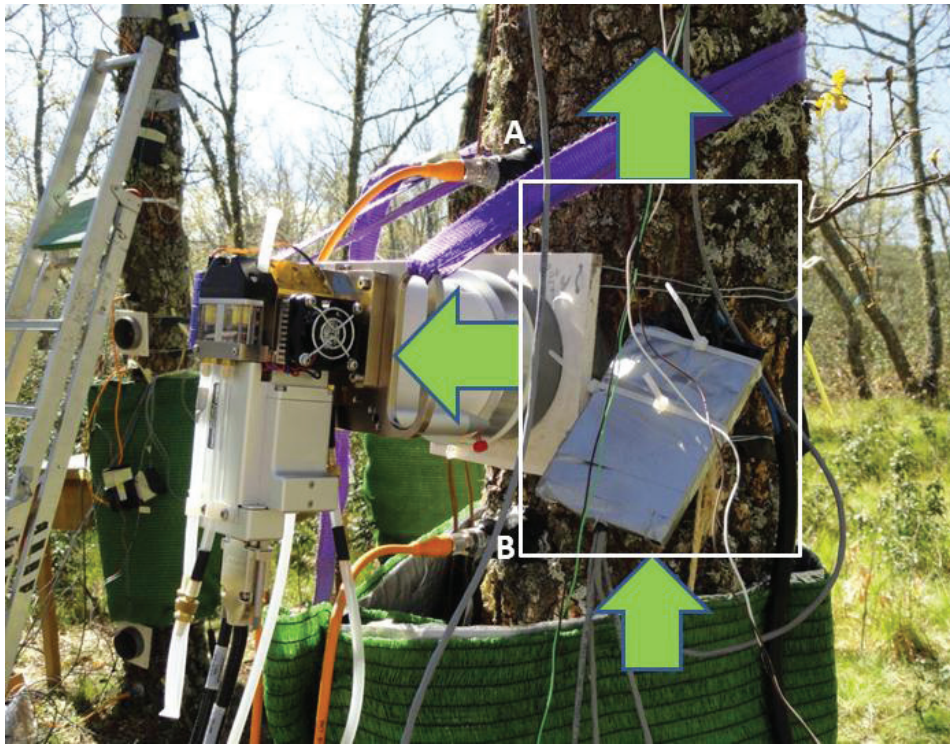


Figura 4. La respiración de un volumen de tronco se puede estimar como la suma del CO₂ producido y disuelto en savia que se transporta hacia la copa del árbol (calculado a su vez como la diferencia entre el flujo axial registrado en la parte superior (A) e inferior (B) del segmento del tronco estudiado; flechas verticales), el CO₂ que difunde radialmente (flecha horizontal), y las variaciones internas de CO₂ que suceden en ese volumen de tronco (cuadro blanco). Para calcular el flujo axial de CO₂ se necesita saber la concentración interna de CO₂ (puntos A y B), la velocidad del flujo de savia, y su pH y temperatura. Este método fue propuesto por McGuire y Teskey (2004).

The rate of respiration of a stem volume can be estimated as the CO₂ produced on it and dissolved in sap moving upwards (which in turn is calculated as the difference between axial CO₂ flux in A and B; vertical arrows), the CO₂ diffusing radially (horizontal arrow), and the internal variation of CO₂ occurring in the considered volume (white square). To calculate axial CO₂ flux several variables need to be measured: internal CO₂ concentration (in A and B), and velocity, pH and temperature of xylem sap. This method was proposed by McGuire and Teskey (2004).

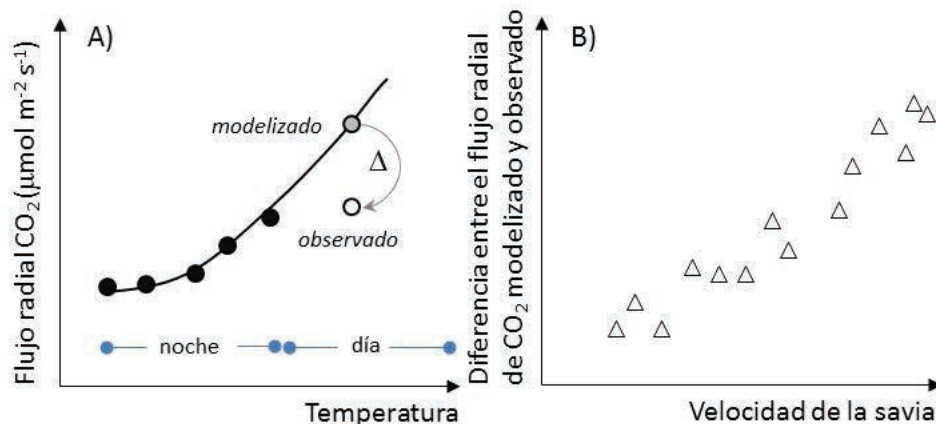


Figura 5. El transporte de CO₂ en la savia puede ocasionar: A) que a una cierta temperatura, el valor de flujo radial de CO₂ por el día sea menor que el modelizado a partir de la relación entre la temperatura y el flujo radial de CO₂ por la noche, cuando no existe flujo de savia; y B) que a medida que la velocidad de savia sea mayor, la diferencia entre el valor de flujo radial de CO₂ modelizado y observado también lo sea. Datos teóricos basados en observaciones de Maier y Clinton (2006) y Hölttä y Kolari (2009), entre otros estudios.

Diurnal transport of CO₂ in sap flow can cause: A) that at a given temperature, radial CO₂ efflux at daytime is lower than the one modeled from the relationship of temperature and radial CO₂ efflux over the night, when sap flow is negligible; and B), that as sap velocity increases, the difference between the modeled and observed value of radial CO₂ efflux also increases. Theoretical data based on observation in Maier and Clinton (2006) and Hölttä and Kolari (2009), among others.

RECICLAJE DE CO₂

Otra parte del CO₂ que producen las células vivas del tronco se re-asimila y, por tanto, no llega a emitirse a la atmósfera. La infraestimación de la respiración a partir de la emisión de CO₂ por este motivo puede llegar a ser importante ya que el reciclaje químico del CO₂ alcanza en algunos árboles más del 97 % del CO₂ respirado (Wittmann *et al.* 2006). El principal proceso de reciclaje de CO₂, local o a larga distancia tras el transporte axial, es la fotosíntesis cortical. Las células de parénquima situadas por debajo de la peridermis, sobre todo en individuos jóvenes de especies con ritidomas de escasa entidad, contienen clorofila y a través de la fotosíntesis asimilan parte del CO₂ procedente de otras células del tronco sin capacidad de re-asimilación de CO₂ (figura 6). En troncos jóvenes, la concentración de clorofila por unidad de área es parecida a la que se puede encontrar en hojas; además, la proporción de clorofila *b*, con un máximo de absorción distinto al de la clorofila *a*, es alta y les confiere una elevada eficiencia en la captación de luz. Al igual que sucede en las hojas, la concentración de clorofila y la eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II de las membranas de los cloroplastos influyen en la tasa de fotosíntesis del tronco y sus variaciones entre especies (Berveiller *et al.* 2007), condiciones abióticas (Wittmann y Pfanz 2008a), o la edad (Wittmann y Pfanz 2008b). Por ejemplo, con la edad de los tallos la fotosíntesis disminuye, en parte debido a la disminución de la luz que penetra la corteza (Pfanz *et al.* 2002), pero también lo hace la respiración (Wittmann y Pfanz 2008b), de manera que, aunque la eficiencia en la re-asimilación de CO₂ disminuya con la edad, esta disminución no es brusca o lineal. Incluso, en algunas especies, árboles de más de 60 años pueden mostrar valores considerables de fotosíntesis cortical (Pfanz *et al.* 2002).

La re-asimilación de CO₂ respirado en el tronco o las raíces puede ocurrir incluso en las hojas. Utilizando marcadores isotópicos se ha puesto de manifiesto recientemente que hasta un total del 17 % del isótopo de carbono ¹³C proporcionado a las raíces de árboles jóvenes de *Populus deltoides* se asimilaba, sobre todo en las ramas más jóvenes (12 %), pero también en las hojas (3 %; Bloemen *et al.* 2013). Del mismo modo, se observó que el 35 % del carbono marcado y transportado en la savia era re-asimilado en ramillos y hojas de *Platanus occidentalis*, suponiendo esta cantidad el 6% de la asimilación de CO₂ atmosférico por parte de las hojas (McGuire *et al.* 2009). Este hecho, cuya generalización está aún por examinar, podría revolucionar la forma de interpretar respuestas ecofisiológicas de adaptación o aclimatación a factores abióticos, por ejemplo, la eficiencia del árbol en el uso del agua en relación a la sequía (Ávila *et al.* 2014). Por otro lado, un estudio reciente sugiere que, de manera recíproca a como el CO₂ respirado favorece la fotosíntesis cortical, la liberación de oxígeno en la fotosíntesis favorece la respiración en los tallos (Wittmann y Pfanz 2014).

En las raíces y troncos el CO₂ participa en otras reacciones químicas que reducen su emisión a la atmósfera. Además



Figura 6. Tallo de 5 años de *Pinus canariensis* Chr. Sm. Ex DC seccionado en el que resulta visible una capa verde de tejido parénquimático fotosintético bajo la corteza. Dicha capa de células re-asimila parte del CO₂ producido por las células vivas del xilema (visible aquí tras la eliminación de la corteza) y del floema.

Five-year-old stem of *Pinus canariensis* Chr. Sm. Ex DC cut open longitudinally where a layer of parenchyma containing chlorophyll is visible beneath the bark. These cells re-assimilate part of the CO₂ respired by these and other cells lacking chlorophyll in the xylem and phloem.

de fijarse a través de la fotosíntesis cortical, el CO₂ también puede fijarse en el interior del tronco o las raíces en condiciones de oscuridad a través de la reacción del bicarbonato con el fosfoenolpiruvato (PEP; Pfanz *et al.* 2002, Bloemen *et al.* 2013). Además, Hibberd y Quick (2002) sugirieron que el malato que se produce al reaccionar el CO₂ con la enzima PEP-carboxilasa, al igual que el CO₂, puede viajar en el xilema hasta los cloroplastos de células fotosintéticas de la parte superior del tallo, donde se cataboliza de nuevo hasta CO₂, y es finalmente asimilado a través de la fotosíntesis. En resumen, existen diferentes mecanismos a través de los cuales el CO₂ se recicla en el árbol y reducen la fiabilidad de la emisión de CO₂ como indicador de la actividad respiratoria de un segmento o incluso del árbol en su conjunto.

MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA RESPIRACIÓN DEL TRONCO

Los factores descritos previamente demuestran que la emisión de CO₂ debe considerarse solo como un indicador de la respiración de los tejidos vivos subyacentes. Midiendo

do la emisión de CO₂ en troncos, se podría subestimar su respiración y contribución a la respiración total del ecosistema debido al reciclaje de CO₂ y al transporte de CO₂ hacia la parte superior del árbol; pero también se podría sobrestimar la respiración de los troncos y su contribución a la respiración total del ecosistema debido al transporte interno de CO₂ desde las raíces hacia arriba. Teskey y McGuire (2007) observaron que el flujo radial de CO₂ y la respiración en un segmento del tronco no estaban ni siquiera correlacionados. La desviación entre la emisión de CO₂ y la respiración real dependerá de la resistencia al flujo radial, de la solubilidad en la savia, del transporte axial, y del reciclaje de CO₂ en los tejidos leñosos. Así, las medidas de emisión de CO₂ pueden ser un indicador bastante realista de la respiración cuando la luz que penetra hasta el interior de los troncos es baja (árboles adultos con gruesos ritidomas o en bosques cerrados) y el flujo axial de CO₂ es insignificante (especies o periodos de tiempo con bajas tasas de transpiración; véase por ejemplo Rodríguez-Calcerrada *et al.* 2014b). Xu *et al.* (2000) propusieron un sencillo método para estimar la respiración del tronco a partir de la emisión de CO₂, utilizando un equipo portátil de intercambio gaseoso y una cámara para medir flujos de CO₂ en suelos ajustada horizontalmente a un acoplador en el tronco (figura 4). Esta metodología resulta particularmente útil para medir árboles separados por distancias considerables, sin embargo, es laboriosa y poco exhaustiva cuando lo que se pretende es examinar las variaciones de respiración a lo lar-

go del día. Para este fin, es más adecuado medir la emisión de CO₂ de forma automática con analizadores de gases no portátiles (Kuptz *et al.* 2011).

Existen métodos alternativos y más avanzados para estimar la respiración. La estimación propuesta por McGuire y Teskey (2004) basada en la medida simultánea de los flujos axiales, radiales y de almacenamiento de CO₂ supone un paso para cuantificar la respiración leñosa con mayor precisión, sobre todo a una escala temporal corta, de horas, en la que los procesos de resistencia radial, reciclaje y transporte axial de CO₂ son más evidentes. Sin embargo, esta estimación implica una metodología compleja, cara e invasiva. Es posible que la herida que se hace al introducir los sensores de CO₂ en los árboles genere un aumento inicial del CO₂ a causa de la activación de distintos mecanismos de reparación de los tejidos (Etzold *et al.* 2013). Más invasivas aún son las técnicas destructivas en las que se muestrea una porción de tronco o raíz para cuantificar su respiración – o más precisamente su potencial respiratorio – en el laboratorio (Pruyn *et al.* 2003). En estos casos, además del efecto de la herida, las condiciones de medida – humedad, proporción de gases, etc. – son diferentes de las que los órganos tienen en condiciones naturales. Sin embargo, la principal ventaja de esta técnica es precisamente el control minucioso de las condiciones de medida, que permite una comparación fiable entre muestras.

Por último, además de las técnicas basadas en la medición de la liberación de CO₂, merecen destacarse las téc-

Cuadro 1. Comparación de algunas técnicas utilizadas para estimar la respiración leñosa basadas en la medición de la emisión de CO₂ de manera continua (*e.g.* Kuptz *et al.* 2011) o puntual (*e.g.* Xu *et al.* 2000), el balance de masa de flujos internos y externos de CO₂ (McGuire y Teskey 2004), la producción de gas de fragmentos de tronco o raíz en viales (Pruyn *et al.* 2003) o el consumo de O₂ (Angert *et al.* 2012a).

Comparison of some techniques used to estimate woody respiration using CO₂ efflux automatic (*e.g.* Kuptz *et al.* 2011) or manual (*e.g.* Xu *et al.* 2000) measurements, mass balance of internal and external CO₂ fluxes (McGuire y Teskey 2004), *in vitro* CO₂ production from stem or root fragments (Pruyn *et al.* 2003) or gas influx (Angert *et al.* 2012a).

Técnica de medición	Fiabilidad ¹	Perturbación del árbol	Complejidad técnica	Coste económico	Resolución temporal	Tamaño muestral
Registro continuo de CO ₂ emitido	media-alta	baja	media	medio	alta	bajo
Registro puntual de CO ₂ emitido	media-alta	baja	baja	medio-bajo	baja	alto
Balance de masa de CO ₂	media-alta	alta	alta	alto	alta	bajo
Producción de CO ₂ <i>in vitro</i>	media-baja	alta	alta	alto	media	alto
Consumo de O ₂	alta	baja	alta	alto	media	medio

¹La fiabilidad de la estimación de la respiración depende de la alteración de las condiciones naturales durante la medida, de los factores no relacionados con procesos respiratorios que alteran la concentración y flujos de gas, y de las asunciones en los métodos analíticos posteriores a la medida.

Note: Reliability of respiration estimations depends on the degree of alteration of natural conditions during measurements, the occurrence of factors not related with respiratory processes altering gas concentration and fluxes, and the assumptions needed for data analyses.

nicas basadas en el consumo de oxígeno (O₂) para estimar la respiración (Angert *et al.* 2012ab). Angert *et al.* (2012b) estimaron que la liberación de CO₂ equivalía a 2/3 del consumo de oxígeno, debido al reciclaje y transporte axial del CO₂ respirado. Aunque más precisa, esta técnica es también más exigente técnicamente.

Se ha de ser consciente de que todas las técnicas empleadas para estimar la respiración leñosa tienen ventajas e inconvenientes (cuadro 1). No se trata aquí de rechazar o proponer una determinada metodología, sino de incidir en la necesidad de adecuar la técnica y la metodología de medida a las condiciones experimentales y los objetivos del estudio. Solo así se podrá seguir proporcionando información que resulte útil en la investigación de la respiración de los órganos leñosos; un tema del que se conoce muy poco, y en el que es necesario profundizar mucho más para llegar a conocer su regulación metabólica, modulación ambiental e implicaciones ecológicas. La cuantificación de la composición isotópica del carbono respirado (Ubierna *et al.* 2009, Kuptz *et al.* 2011, Maunoury-Danger *et al.* 2013, Mildner *et al.* 2014) o del oxígeno consumido (Angert *et al.* 2012b) por el tronco o por sus componentes con tejidos vivos – cambium, floema y albura –, constituye otro paso más hacia la comprensión del proceso de la respiración leñosa.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a Víctor Chano y Álvaro Soto por la fotografía de la figura 6. Jesús Rodríguez-Calcerrada. Agradece la financiación del Ministerio de Ciencia y Competitividad a través de un contrato post-doctoral “Juan de la Cierva”.

REFERENCIAS

- Angert A, J Muhr, R Negrón Juárez, W Alegría Muñoz, G Kraemer, J Ramírez Santillan, JQ Chambers, SE Trumbore. 2012a. The contribution of respiration in tree stems to the Dole Effect. *Biogeosciences* 9: 4037-4044.
- Angert A, J Muhr, R Negrón Juárez, W Alegría Muñoz, G Kraemer, J Ramírez Santillan, E Barkan, S Mazeh, JQ Chambers, SE Trumbore. 2012b. Internal respiration of Amazon tree stems greatly exceeds external CO₂ efflux. *Biogeosciences* 9: 4979-4991.
- Aubrey DP, JG Boyles, LS Krysinsky, RO Teskey. 2011. Spatial and temporal patterns of xylem sap pH derived from stems and twigs of *Populus deltoides* L. *Environmental and Experimental Botany* 71: 376-381.
- Ávila E, A Herrera, W Tezara. 2014. Contribution of stem CO₂ fixation to whole-plant carbon balance in nonsucculent species. *Photosynthetica* 52: 3-15.
- Berveiller D, D Kierzkowski, C Damesin. 2007. Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species. *Tree Physiology* 27: 53-61.
- Bloemen J, MA McGuire, DP Aubrey, RO Teskey, K Steppe. 2013. Transport of root-respired CO₂ via the transpiration stream affects aboveground carbon assimilation and CO₂ efflux in trees. *New Phytologist* 197: 555-565.
- Bužková R, M Acosta, E Dařenová, R Pokorný, M Pavelka. 2014. Environmental factors influencing the relationship between stem CO₂ efflux and sap flow. *Trees* DOI: 10.1007/s00468-014-1113-z
- De Schepper V, B van Dusschoten, P Copini, S Jahnke, K Steppe. 2012. MRI links stem water content to stem diameter variations in transpiring trees. *Journal of Experimental Botany* 63: 2645-2653.
- Edwards NT, SD Wullschlegel. 2000. Carbon dioxide efflux rates from stems of mature *Quercus prinus* L. and *Acer rubrum* L. trees do not appear to be affected by sapflow rates. *Journal of Sustainable Forestry* 10: 125-131.
- Erda FG, J Bloemen, K Steppe. 2014. Quantifying the impact of daily and seasonal variation in sap pH on xylem dissolved inorganic carbon estimates in plum trees. *Plant Biology* 16: 43-48.
- Etzold S, R Zweifel, NK Ruehr, W Eugster, N Buchmann. 2013. Long-term stem CO₂ concentration measurements in Norway spruce in relation to biotic and abiotic factors. *New Phytologist* 197: 1173-1184.
- Gartner BL, JR Moore, BA Gardiner. 2004. Gas in stems: abundance and potential consequences for tree biomechanics. *Tree Physiology* 24: 1239-1250.
- Hibberd JM, WP Quick. 2002. Characteristics of C4 photosynthesis in stems and petioles of C3 flowering plants. *Nature* 415: 451-454.
- Hölttä T, P Kolari. 2009. Interpretation of stem CO₂ efflux measurements. *Tree Physiology* 29: 1447-1456.
- Hook DD, CL Brown. 1972. Permeability of the cambium to air in trees adapted to wet habitats. *Botanical Gazette* 133: 304-310.
- Johansson N. 1933. Sambandet mellan vedstammens andning och dess tillvaxt. *Svenska Skogsvårdsforeningens Tidskrift* 31: 57-134.
- Kitin P, T Fujii, H Abe, K Takata. 2009. Anatomical features that facilitate radial flow across growth rings and from xylem to cambium in *Cryptomeria japonica*. *Annals of Botany* 103: 1145-1157.
- Kuptz D, R Matyssek, TEE Grams. 2011. Seasonal dynamics in the stable carbon isotope composition (δ¹³C) from non-leafy branch, trunk and coarse root CO₂ efflux of adult deciduous (*Fagus sylvatica*) and evergreen (*Picea abies*) trees. *Plant, Cell & Environment* 34: 363-373.
- Lavigne MB. 1987. Differences in stem respiration responses to temperature between balsam fir trees in thinned and unthinned stands. *Tree Physiology* 3: 225-233.
- Maier CA, BD Clinton. 2006. Relationship between stem CO₂ efflux, stem sap velocity and xylem CO₂ concentration in young loblolly pines trees. *Plant, Cell & Environment* 29: 1471-1483.
- Maunoury-Danger F, NC Prevost-Boure, J Ngao, D Berveiller, C Brechet, E Dufrene, D Epron, J-C Lata, B Longdoz, C Lelarge-Trouverie, J-Y Pontailier, K Soudani, C Damesin. 2013. Carbon isotopic signature of CO₂ emitted by plant compartments and soil in two temperate deciduous forests. *Annals of Forest Science* 70: 173-183.
- Mildner M, MK Bader, S Leuzinger, RT Siegwolf, C Körner. 2014. Long-term ¹³C provides evidence for temporal and spatial carbon allocation patterns in mature *Picea abies*. *Oecologia* 175: 747-762.

- McGuire MA, RO Teskey. 2002. Microelectrode technique for in situ measurement of carbon dioxide concentrations in xylem sap of trees. *Tree Physiology* 22: 807-811.
- McGuire MA, RO Teskey. 2004. Estimating stem respiration in trees by a mass balance approach that accounts for internal and external fluxes of CO₂. *Tree Physiology* 24: 571-578.
- McGuire MA, S Cerasoli, RO Teskey. 2007. CO₂ fluxes and respiration of branch segments of sycamore (*Platanus occidentalis* L.) examined at different sap velocities, branch diameters, and temperatures. *Journal of Experimental Botany* 58: 2159-2168.
- McGuire MA, JD Marshall, RO Teskey. 2009. Assimilation of xylem-transported ¹³C-labelled CO₂ in leaves and branches of sycamore (*Platanus occidentalis* L.). *Journal of Experimental Botany* 60: 3809-3817.
- Müller D. 1924. Studies on traumatic stimulus and loss of dry matter by respiration in branches of Danish forest-trees. *Dansk Botanisk Arkiv* 4: 1-33.
- Negisi K. 1979. Bark respiration rate in stem segments detached from young *Pinus densiflora* trees in relation to velocity of artificial sap flow. *Journal of the Japanese Forestry Society* 61: 88-93.
- Peñuelas J, S Sabaté, I Filella, C Gracia. 2004. Efectos del cambio climático sobre los ecosistemas terrestres: observación, experimentación y simulación. In Valladares F ed. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Madrid, España. Ministerio de Medio Ambiente. p. 425-460.
- Pfanz H, G Aschan, R Langenfeld-Heyser, C Wittmann, M Loose. 2002. Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* 89: 147-162.
- Pruyn ML, ME Harmon, BL Gartner. 2003. Stem respiratory potential in six softwood and four hardwood tree species in the central cascades of Oregon. *Oecologia* 137: 10-21.
- Rambal S, M Lempereur, JM Limousin, NK Martin-StPaul, JM Ourcival, J Rodríguez-Calcerrada. 2014. How drought severity constrains GPP and its partitioning among carbon pools in a *Quercus ilex* coppice? *Biogeosciences Discussions* 11: 8673-8711.
- Rodríguez-Calcerrada J, NK Martin-StPaul, M Lempereur, J-M Ourcival, MC del Rey, R Joffre, S Rambal. 2014a. Stem CO₂ efflux and its contribution to ecosystem CO₂ efflux decrease with drought in a Mediterranean forest stand. *Agricultural and Forest Meteorology* 195-196: 61-72.
- Rodríguez-Calcerrada J, R López, R Salomón, GG Gordaliza, M Valbuena-Carabaña, J Oleksyn, L Gil. 2014b. Stem CO₂ efflux in six co-occurring tree species: underlying factors and ecological implications. *Plant, Cell & Environment* DOI: 10.1111/pce.12463.
- Ryan MG. 1990. Growth and maintenance respiration in stems of *Pinus contorta* and *Picea engelmannii*. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 48-57.
- Ryan MG, ST Gower, RM Hubbard, RH Waring, HL Gholz, WP Jr Cropper, SW Running. 1995. Woody tissue maintenance respiration of four conifers in contrasting climate. *Oecologia* 101: 133-140.
- Saveyn A, K Steppe, R Lemeur. 2007. Daytime depression in tree stem CO₂ efflux rates: is it caused by low stem turgor pressure? *Annals of Botany* 99: 477-485.
- Saveyn A, K Steppe, MA McGuire, R Lemeur, RO Teskey. 2008. Stem respiration and carbon dioxide efflux of young *Populus deltoides* trees in relation to temperature and xylem carbon dioxide concentration. *Oecologia* 154: 637-649.
- Steppe K, A Saveyn, MA McGuire, R Lemeur, RO Teskey. 2007. Resistance to radial CO₂ diffusion contributes to between-tree variation in CO₂ efflux rates of *Populus deltoides* stems. *Functional Plant Biology* 34: 785-792.
- Tarvainen L, M Rantfors, G Wallin. 2014. Vertical gradients and seasonal variation in stem CO₂ efflux within a Norway spruce stand. *Tree Physiology* 34: 488-502.
- Teskey RO, MA McGuire. 2007. Measurement of stem respiration of sycamore (*Platanus occidentalis* L.) trees involves internal and external fluxes of CO₂ and possible transport of CO₂ from roots. *Plant, Cell & Environment* 30: 570-579.
- Teskey RO, A Saveyn, K Steppe, MA McGuire. 2008. Origin, fate and significance of CO₂ in tree stems. *New Phytologist* 177: 17-32.
- Trumbore SE, A Angert, N Kunert, J Muhr, JQ Chambers. 2013. What's the flux? Unraveling how CO₂ fluxes from trees reflect underlying physiological processes. *New Phytologist* 197: 353-355.
- Ubierna N, AS Kumar, LA Cernusak, RE Pangle, PJ Gag, JD Marshall. 2009. Storage and transpiration have negligible effects on δ¹³C of stem CO₂ efflux in large conifer trees. *Tree Physiology* 29: 1563-1574.
- Wittmann C, H Pfanz, F Loreto, M Centritto, F Pietrini, G Alesio. 2006. Stem CO₂ release under illumination: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell & Environment* 29: 1149-1158.
- Wittmann C, H Pfanz. 2008a. Antitranspirant functions of stem periderms and their influence on cortical photosynthesis under drought stress. *Trees* 22: 187-196.
- Wittmann C, H Pfanz. 2008b. General trait relationships in stems: a study on the performance and interrelationships of several functional and structural parameters involved in cortical photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 134: 636-648.
- Wittmann C, H Pfanz. 2014. Bark and woody tissue photosynthesis: a means to avoid hypoxia or anoxia in developing stem tissues. *Functional Plant Biology* 41: 940-953.
- Xu M, TA DeBiase, Y Qi. 2000. A simple technique to measure stem respiration using a horizontally oriented soil chamber. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1555-1560.
- Zach A, V Homa, C Leuschner. 2010. Diverging temperature response of tree stem CO₂ release under dry and wet season conditions in a tropical montane moist forest. *Trees – Structure and Function* 24: 285-296.

Recibido: 27.08.14
Aceptado: 16.12.14