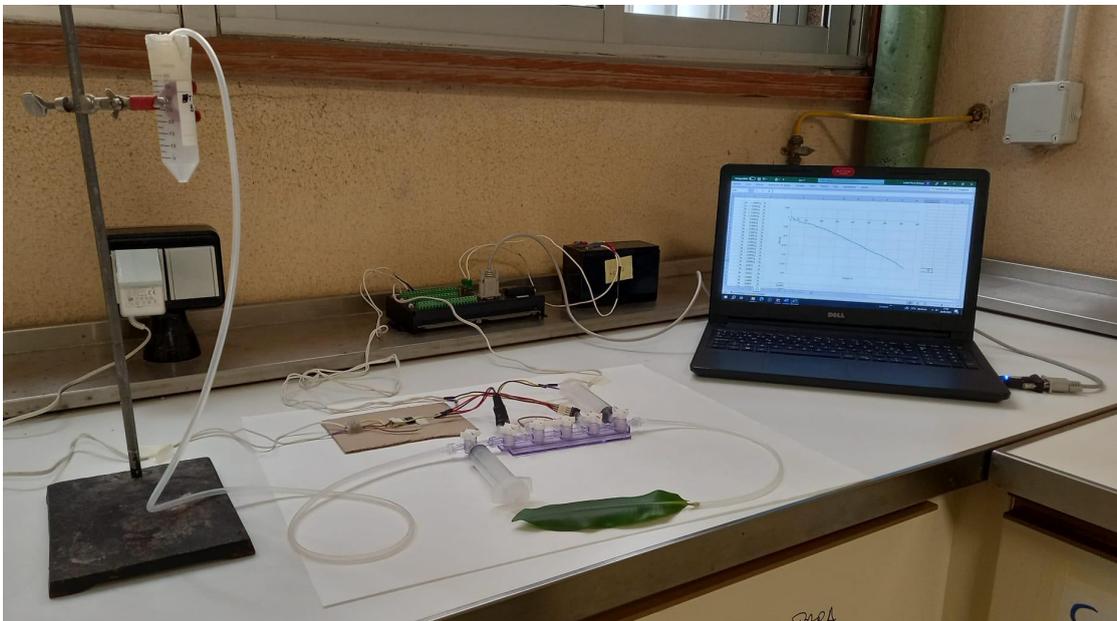


Conductancia hidráulica foliar: sistemas de medida y diferencias entre especies canarias

Leaf Hydraulic conductance: measurement systems and differences between canarian species



Trabajo de Fin de Grado

JUDITH FLORES SANTANA

Tutorizado por Jaime Puértolas Simón y Beatriz Fernández Marín

Grado en Biología. Mayo 2023.

AGRADECIMIENTOS

A Ale y a María, el equipo TFG, por la compañía, el apoyo, las risas, gracias por todo. Ustedes consiguieron subirle la calidad a este trabajo y al curso, y que me fuera más leve al mismo tiempo.

Gracias a Alicia Perera, tutora honorífica de este trabajo, por estar animándonos, ayudándonos y enseñándonos en todo momento. Y simplemente por ser ella.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y MÉTODOS	9
Sistema de caída de presión	9
Sistema gravimétrico	14
Mediciones de Kleaf	16
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	17
Montaje, puesta a punto y calibración de los sistemas	17
Mediciones de Kleaf	19
DISCUSIÓN	21
Sistemas	21
Mediciones de Kleaf	22
CONCLUSIONES	23
CONCLUSIONS	24
BIBLIOGRAFÍA	25

RESUMEN

La conductancia hidráulica foliar es un carácter que aporta información sobre la eficiencia en el transporte hidráulico de la planta. Existen una variedad de métodos y sistemas para medirla, principalmente basados en medición de flujo de agua a la hoja. El primer objetivo de este estudio fue montar, poner a punto y calibrar dos sistemas de medición de flujo para estimación de conductancia foliar, uno por caída de presión y uno por gravimetría. Además, un segundo objetivo era compararlos. Para ello se realizó un experimento de medición de 9 especies canarias de distintos ecosistemas plantadas en *common garden*. Se recogieron también datos de peso foliar por área (LMA) para testar una posible relación entre los dos parámetros, otro objetivo. Se concluyó que el sistema gravimétrico presenta menos inconvenientes, aunque dependiendo de las necesidades del grupo puede ser más adecuado el de caída de presión. También se identificaron los problemas comunes y sus soluciones. Se encontraron diferencias de conductancia hidráulica entre especies, aunque crecieran en el mismo ambiente, pero no entre ecosistemas. No se encontraron relaciones significativas entre LMA y conductancia foliar. En conclusión, se estableció un sistema de medición adecuado y eficiente para la medición de conductancia foliar y, si bien la comparación de especies no arrojó tendencias concluyentes, el desarrollo metodológico futuro permitirá ampliar el rango de estudio para evaluar tendencias de este rasgo funcional relevante.

Palabras clave: rasgos funcionales foliares, sistemas de medición de flujo, peso foliar por área, *common garden*, ecosistemas vegetales, ecofisiología.

ABSTRACT

Leaf hydraulic conductance is a character that provides information about the efficiency of water transport in a plant. There are a variety of measurement methods and systems, the most modern ones measure the flow of water into the leaf. One of the aims of this study was to construct, tune and calibrate two flow meters: a pressure-drop system and a gravimetric system. Another goal of this study was to compare the systems. To do this an experiment was carried out by measuring canarian species grown in common garden. Leaf mass per area (LMA) was also

collected in these species in order to complete another aim: analysis of the relationship between leaf conductance and LMA. It was found that the gravimetric system has fewer issues, though depending on the group's necessities the pressure-drop meter may be more adequate. In addition their common problems and their solutions were identified. The experiment's results show that there are differences in leaf hydraulic conductance between species but not ecosystems, even if they grew in the same conditions. In addition, there was no significant relationship between LMA and leaf hydraulic conductance. In short, an adequate and efficient leaf conductance measuring system was established, and even if the species comparison did not show conclusive relationships, future methodological development will increase the range of possible studies to evaluate the trends of this relevant functional trait.

Keywords: leaf functional traits, flowmeters, leaf mass per area, common garden, plant ecosystems, ecophysiology.

INTRODUCCIÓN

Las últimas proyecciones del cambio climático predicen cambios importantes en el ambiente de las islas oceánicas, siendo una amenaza sustancial para la flora insular, más vulnerable que la continental por tratarse de endemismos relativamente aislados, con poca capacidad de dispersión y tamaños poblacionales pequeños. (Harter *et al.* 2015). En las últimas décadas en Canarias ya se vienen observando cambios, en distinta medida según las características orográficas y geográficas de cada isla. Va aumentando la temperatura y los episodios de calima a la vez que descende la precipitación, creando periodos de sequía estival más largos (Martín-Esquivel y Pérez-González, 2019).

El clima de Canarias se clasifica como mediterráneo al tener inviernos húmedos y veranos secos, pero esta es una clasificación general que abarca toda la variación de ambientes que podemos encontrar en las islas (Harter *et al.* 2015). Está dominado por la influencia de los vientos alisios, que traen aire cargado de humedad desde el noreste, creando un gradiente de humedad enorme en las islas. Chocan

con la ladera sotavento de las islas a una altura media de 1500 m s.n.m. formando una capa de nieblas, el mar de nubes, que humidifica el ambiente, supone una fuente de agua importante y suaviza el gradiente de temperatura. Esto sumado a los efectos insular y altitudinal sobre los procesos evolutivos nos da una gran diversidad de especies e incluso ecotipos en un área limitada, cada una con unas adaptaciones únicas. Es necesario estudiar cada especie para poder comprender las comunidades vegetales canarias, intentar predecir los cambios en ellas ante una alteración y predecir e impulsar su regeneración (del Arco-Aguilar y Rodríguez-Delgado, 2018).

Una herramienta útil en ecofisiología son los caracteres funcionales: propiedades morfológicas, fisiológicas o fenológicas, bien definidas, medibles y comparables entre especies que influyen fuertemente en su rendimiento, como el peso foliar por área (LMA), la capacidad fotosintética máxima o la producción de semillas. Caracterizarlas en un gradiente ambiental o hacer comparaciones entre especies nos aporta información de las respuestas al medio y nos pueden servir para entender la estructura de las comunidades vegetales (Díaz *et al.*, 1998; Dubuis *et al.*, 2013). Estas caracterizaciones pueden ser de gran utilidad en eventos climáticos extremos, ayudando por ejemplo a predecir la mortandad ante un evento de sequía, situaciones que vienen siendo más comunes en los últimos años (Martín-Esquivel *et al.*, 2020). Gran parte de los efectos del cambio climático en la flora se explican porque los cambios en temperatura y precipitación aumentan el déficit de presión de vapor (DPV), empeorando el estrés hídrico, pues esa subida del DPV incrementa la transpiración de los tejidos y la evaporación del agua del suelo, agravando el déficit hídrico (Osca *et al.*, 2013; Grossiord *et al.*, 2020).

Definimos estrés como cualquier cambio en un factor ambiental que provoca una disminución del crecimiento y el desarrollo de la planta con respecto al máximo, lo son el estrés por sequía o por exceso de radiación lumínica. El estrés hídrico hace referencia a condiciones donde hay menos agua de la que idealmente necesita la planta. Ante estas situaciones las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia complejos y variables, pero que se centran principalmente en dos estrategias: evitación y tolerancia (Levitt, 1972). Frente al estrés hídrico son más importantes las estrategias de evitación, aquellas en las que la planta pone en marcha mecanismos que mantienen su estado hídrico fuera de las condiciones de

estrés. Incluyen una serie de respuestas que sirven para ahorrar agua o asegurar el abastecimiento. Se desencadenan cambios que conciernen desde al organismo entero, como un mayor crecimiento en raíces pero menor en la parte aérea, hasta solamente la actividad de algunas proteínas, por ejemplo la sobreexpresión de acuaporinas en las raíces (Lambers y Oliveira, 2019).

El flujo de agua por la planta se produce gracias al gradiente de potencial que se establece desde el suelo hasta la atmósfera y a través de la planta, formando lo que se llama continuo suelo-atmósfera, por el que el agua va ascendiendo a zonas con un potencial hídrico más bajo (más negativo), desde la raíz hasta la hoja. La analogía con la Ley de Ohm lo explica:

$$\Psi_{leaf} = \Psi_{soil} - \rho gh - \frac{E}{K_{plant}}$$

Según esta ley el potencial hídrico de la hoja (Ψ_{leaf}) depende del potencial hídrico del suelo (Ψ_{soil}), la densidad del agua (ρ), el efecto de la gravedad (gh), la tasa de transpiración (E) y la conductancia hidráulica de la planta entera (K_{plant}) (Van den Honert, 1948). Según esta analogía, para un mismo potencial del suelo, el potencial hídrico de la hoja disminuye al aumentar la transpiración, con una sensibilidad que depende de K , si es alta va a ser capaz de amortiguar esos cambios. La conductancia hidráulica resume la eficiencia para conducir el agua, es el inverso de la resistencia. Como las hojas son el componente que ofrece la mayor resistencia al flujo, con una media del 30% de la resistencia total pero llegando al 98% en casos extremos, constituyen un determinante importante de la conductancia total de la planta (Sack y Holbrook, 2006; Flexas *et al.*, 2013).

La conductancia hidráulica foliar (K_{leaf}) es una medida referente al flujo que atraviesa la hoja desde el peciolo hasta que se evapora. Se trata de un sistema complejo con diferentes rutas que se puede dividir en K_x , la conductancia xilemática, y K_{ox} , la conductancia del resto de elementos: vía apoplástica, simplástica y célula a célula. Además, es muy dinámica, varía con muchos factores distintos: edad de la hoja, ritmos circadianos, temperatura, etc. Es un parámetro importante porque limita el intercambio gaseoso en las hojas y como tal se correlaciona fuertemente con la conductancia estomática y del mesófilo, pero además con la tasa fotosintética (Sack y Holbrook, 2006; Flexas *et al.*, 2013). De hecho, presentar hojas con una eficiencia

hidráulica alta permite unas tasas fotosintéticas altas pero también las hace más vulnerables a cavitación, más sensibles a la sequía. En este *trade-off* también están implicados otros parámetros foliares, como la densidad de venación y LMA. Existen resultados contradictorios pero parece que, en general, mientras el LMA no tiene relación con K_{leaf} normalizada al área, sí que se encuentran relaciones con K_{leaf} normalizada al peso (Nardini *et al.*, 2012; Simonin *et al.*, 2012). Por otro lado, también se ha encontrado relación con parámetros climáticos, especialmente con la precipitación media anual, de forma que especies de climas más secos presentan valores de K_{leaf} más bajos, con lo que tienen una hidráulica menos eficiente pero son más resistentes a la sequía. Si a esto le unimos la relación con LMA, los casos en los que se encontró relación indican que es inversa: a menos K_{leaf} mayor LMA. Esto significa que las especies de climas secos no sólo sacrifican su eficiencia a favor de la protección frente al déficit hídrico, sino que además invierten más recursos para cada hoja (Nardini *et al.*, 2012; Simonin *et al.*, 2012; Nardini y Luglio, 2014). Existen estudios previos que han encontrado diferencias entre especies de ecosistemas distintos (Nardini y Luglio, 2014; Hernández-Santana *et al.*, 2016). La vegetación de Tenerife ofrece una oportunidad única de comparar estas tendencias en diferentes especies adaptadas a lo largo de un marcado gradiente de humedad ambiental pero dentro de un área de distribución muy restringida y con una historia natural común (Harter *et al.*, 2015).

Para medir conductancia en cualquier órgano vegetal los enfoques más modernos optan por medir el flujo y el potencial y calcular la conductancia como la razón entre el primero y el segundo. De manera general existen tres tipos de sistemas para medir el flujo: volumétricos, gravimétricos y de caída de presión. Los dos primeros tienen un planteamiento muy parecido, se conectan el material a un sistema de tubos y se hace pasar agua por el material, generalmente impulsada por un gradiente de altura, y se cuantifica cuánta agua está pasando. En los sistemas volumétricos se coloca una pipeta al final o al principio del sistema y se toma nota del movimiento del menisco en un tiempo determinado. En el gravimétrico se coloca una balanza de precisión con un receptáculo de agua y lo que se tiene en cuenta es una diferencia de peso. Son dos técnicas sencillas, fáciles de montar y baratas (si ya se dispone de balanza), pero con sus desventajas. La volumétrica no es muy sensible y requiere de cierta práctica para dominarla, y la gravimétrica no es portátil,

sólo se pueden hacer medidas en el laboratorio. El tercer sistema, de caída de presión, se coloca un capilar y unos sensores de presión y se calcula el flujo a partir de la diferencia de presión antes y después del material. Requiere un montaje más complejo, pero es la técnica más sensible de las tres y la que permite un mayor rango de experimentos. En cualquier caso, a la hora de medir conductancia foliar hay que tener en cuenta unas consideraciones adicionales. Se están intentando medir cantidades de agua muy pequeñas, con lo que se debe elegir un sistema sensible, y se debe modificar el esquema general, pues una vez el agua entra a la hoja su destino final es la transpiración, no se puede volver a encauzar en un tubo. El sistema volumétrico no es adecuado para medir K_{leaf} , resultan mucho mejor las otras dos técnicas (Melcher *et al.*, 2012).

Lo anterior hace referencia al propio equipo con el que se toma la medida, pero aparte de eso existen varios métodos de medición de K_{leaf} que se basan en formas distintas de impulsar el flujo a través de la hoja. Algunos son más realistas, replican en mayor medida las condiciones reales, pero presentan limitaciones de ruido o a la hora de medir el potencial hídrico adecuado y otros no se asemejan tanto a las condiciones de flujo real pero dan medidas mucho más certeras (Flexas *et al.*, 2013). Los más usados en la actualidad son estas cuatro:

- EFM (evaporative flux method) (Sack *et al.*, 2002): método del flujo evaporativo, se conecta la hoja al sistema y se somete a condiciones que hagan comience a transpirar (iluminación), posteriormente se toma la medida del potencial hídrico. Es un método simple, práctico y realista, en el que se pueden controlar las condiciones lumínicas, de temperatura, etc. Sin embargo, al tomar la medida del potencial con la hoja sin transpirar puede que haya una variación con respecto al valor durante la medida.
- RKM (rehydration kinetics method) (Blackman y Brodribb, 2011): cinética de la rehidratación. Se estima K_{leaf} a partir de la absorción de agua de una hoja parcialmente deshidratada durante un tiempo determinado. Se mide el flujo durante la rehidratación, los datos de potencial se toman a partir de hojas adyacentes. Presenta el mismo problema que el anterior, los potenciales se miden en hojas en reposo, que no transpiran, además, al medirse en hojas distintas se añade ruido a la medida, lo que se suma a que los tiempos de

rehidratación no se pueden controlar del todo pues el mesófilo puede continuar hidratándose incluso al sacar el peciolo del agua. Por otro lado, se desconoce si durante la rehidratación el flujo sigue las mismas rutas que durante la transpiración. Su principal ventaja es que es un método muy rápido.

- HPFM (high pressure flowmeter method) (Yang y Tyree, 1994): medidor de flujo a alta presión, se fuerza el flujo por la hoja a alta presión hasta que sale agua por los estomas. Es el método más alejado de la realidad porque inunda el mesófilo y los espacios aéreos de la lámina. Sin embargo, es mucho menos ruidoso que los dos anteriores y se pueden controlar las condiciones de luz y temperatura manteniendo la hoja en un baño.
- VPM (vacuum pump method) (Sack *et al.*, 2002): método por vacío, se extrae agua de la hoja sometiénola a presiones subatmosféricas. Es un método poco realista y muy lento, hasta 2 horas por medida, pero poco ruidoso.

Existen también otros métodos donde no se mide el flujo que puede conducir la hoja, sino que se infiere la conductancia a través de otros parámetros, como puede ser la relajación del potencial, donde se deja deshidratar el material y se calcula K_{leaf} a partir del índice entre el potencial hídrico inicial y final y la capacitancia, definida como el volumen de agua que puede almacenar la hoja (Brodribb y Holbrook, 2006). Según las características de cada ensayo es más adecuada una técnica u otra. Así, para experimentos estándar se suelen usar el RKM o el EFM, pues son los más sencillos (Hernández-Santana *et al.*, 2016), pero para casos en los que se dispone de poco material vegetal, porque se está trabajando con una especie en peligro por ejemplo, el método VPM es mejor porque requiere de menos réplicas.

Uno de los objetivos de este trabajo es montar y poner a punto dos sistemas de medición del flujo que permitan medir la conductancia hidráulica foliar con dos métodos, EFM y RKM, y comparar su funcionalidad. Se trata de un sistema de caída de presión como el descrito en Melcher *et al.*, 2012, y un sistema gravimétrico, adaptados los dos a hojas. Se decidió así porque constituye la opción más barata dados los recursos materiales ya disponibles en el laboratorio y porque esas dos técnicas son adecuadas para los experimentos que se pretende realizar. El sistema se pondrá a prueba haciendo un *screening* de especies canarias plantadas en los jardines del Campus Central y del Campus de Anchieta. Los caracteres

morfofisiológicos de las plantas están determinados por la interacción entre genotipo y ambiente, de forma que parte de la variación observable entre organismos se debe a diferencias en el ambiente actual o durante su desarrollo y parte a diferencias genéticas. Haciendo el experimento en *common garden* eliminamos el efecto del ambiente, con lo que en principio las diferencias que encontremos entre especies se corresponden a diferencias genotípicas, a nivel de adaptación evolutiva, y no a otras cuestiones relativas a aclimatación (de Villemeireuil *et al.*, 2016).

Queremos comprobar si se cumple que hay diferencias en la conductancia foliar de especies procedentes de ecosistemas con disponibilidad hídrica distinta. Asimismo, queremos comprobar si existe una relación entre LMA y la conductancia, como ya se dijo antes no existe un consenso claro sobre este tema, con distintos experimentos dando resultados diferentes (Sack y Holbrook, 2006; Nardini *et al.*, 2012; Flexas *et al.*, 2013). Hipotetizamos que vamos a encontrar relación negativa entre LMA y la conductancia normalizada al peso.

OBJETIVOS

El objetivo general de este TFG es desarrollar dos sistemas de medición de flujo de agua alternativos para la medición de conductancia hidráulica foliar, compararlos y ponerlos a prueba realizando un *screening* en especies de los distintos ecosistemas canarios.

Los objetivos específicos son:

- Montaje, puesta a punto y calibración de dos sistemas de medición de flujo: caída de presión y gravimetría.
- Comparación de la versatilidad de ambos sistemas.
- Realización de mediciones de conductancia hidráulica foliar en especies de distintos ecosistemas canarios.
- Análisis de la relación entre conductancia foliar y LMA en ecosistemas canarios

MATERIAL Y MÉTODOS

La primera fase de este TFG se dedicó al montaje, puesta a punto y calibración de los dos sistemas de medición de flujo.

Sistema de caída de presión

Se montó un sistema de medición de flujo de agua por caída de presión similar al descrito en Melcher *et al.* (2012), pero adaptado a hojas. Se siguió el protocolo de Sack *et al.* (2011). Se trata de un sistema hidráulico simple, que empieza en un reservorio de agua y acaba en la hoja, al que se le añaden sensores de presión y una sección de alta resistencia, el capilar.

El fundamento técnico del sistema se basa en dos leyes distintas. Por un lado tenemos el Principio de Bernoulli, que establece que dentro de un flujo horizontal las zonas de mayor velocidad del fluido estarán sometidas a menos presión que las de menor velocidad. Podemos poner un ejemplo que ayuda a entenderlo de manera intuitiva: si apretamos el extremo de una manguera para que el agua salga con más velocidad, notamos más presión en la parte anterior al estrechamiento, donde hemos creado un atasco, que justo después, donde el agua ya se mueve a toda velocidad. Por otro lado volvemos a la Ley de Ohm:

$$V = I \cdot R \rightarrow \Delta P = F \cdot \frac{1}{K}$$

Esta ecuación indica que la diferencia de presión a cada lado del circuito es proporcional al flujo y a la resistencia (o conductancia) del circuito. Para obtener la conductancia (K) primero hay que conocer el flujo (F) y la presión (P). El flujo va a ser constante en todo el sistema y la presión la van a dar los sensores. El flujo se calcula gracias al capilar, del que sí conocemos la conductancia porque se calibró con anterioridad. Con ese dato y la presión que devuelve el sensor P_1 se obtiene el flujo. Ahora ya se puede calcular la conductancia de nuestra hoja, la presión neta en este caso va a ser la diferencia entre P_1 y el potencial hídrico de la hoja (P_2).

Sack y Scoffoni describen un sistema para medir la conductancia en tallos. La parte estrictamente hidráulica del sistema se compone de una placa principal con seis llaves de paso (Cole-Parmer, TW-06464-87+TW-30600-02), a la que se conecta el

reservorio de agua, dos jeringas, dos transductores de presión (PX26-005GV, Omega Engineering, Stamford, CT, USA) y el tubo que irá a la hoja. El primer transductor (P_0) se coloca justo antes del capilar y el segundo (P_1) justo antes de la hoja (Fig. 1). Es un protocolo muy detallado en cuanto a los componentes de la parte hidráulica, pero la parte electrónica no está apenas descrita, además de que usa equipos de los que actualmente no dispone el laboratorio de Fisiología Vegetal de la ULL. La parte electrónica se diseñó con material ya disponible, adquiriendo lo mínimo posible y, además, se realizaron las adaptaciones pertinentes para adecuar el sistema a la medición de hojas. Se estableció un *datalogger* (CR1000, Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA) conectado a un ordenador como aparato de registro de las señales de los transductores, creando el programa correspondiente con el software *Loggernet*.

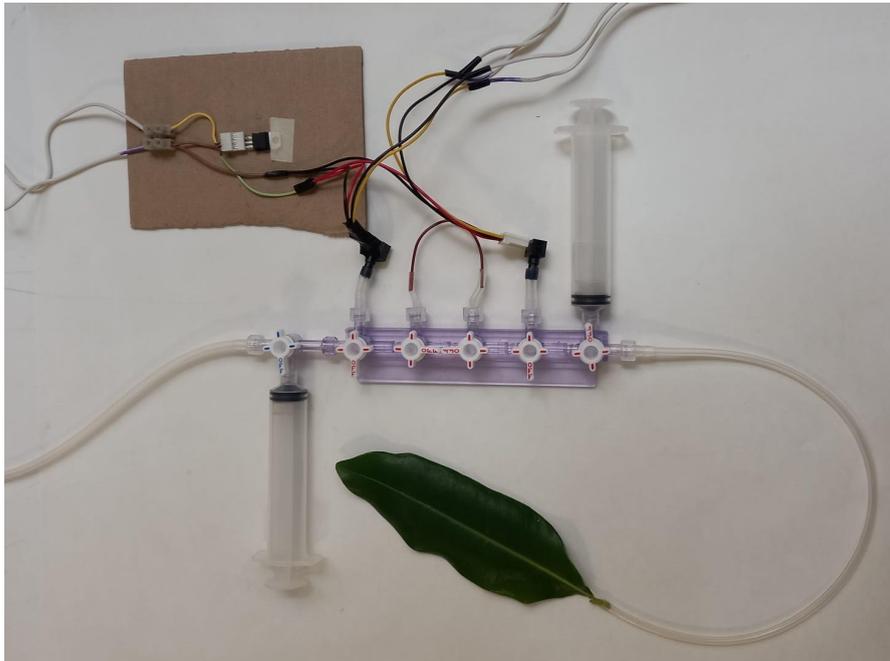


Figura 1: Placa principal del sistema de caída de presión y sus conexiones. A la izquierda se sitúan el reservorio de agua y la fuente de alimentación, a la derecha el *datalogger*. El primer sensor está impermeabilizado y el segundo con las conexiones vistas.

Se tomaron una serie de consideraciones a la hora de concebir el esquema eléctrico del sistema. Se decidió colocar una regleta que permite cambiar la fuente de alimentación fácil y rápidamente, para cambiar entre conexión a toma de corriente o a batería a conveniencia según el experimento. Tras las pruebas pertinentes, quedó claro que era estrictamente necesario un regulador de voltaje para minimizar el ruido de las medidas. En un principio los cables se empataron con cinta de electricista,

pero una vez definida su conformación final se soldaron todas las conexiones (excepto las del datalogger), para afianzarlas y prevenir problemas futuros. Asimismo, los transductores se forraron con cinta impermeabilizante para protegerlos del agua. El esquema de los circuitos final se muestra en la Figura 2.

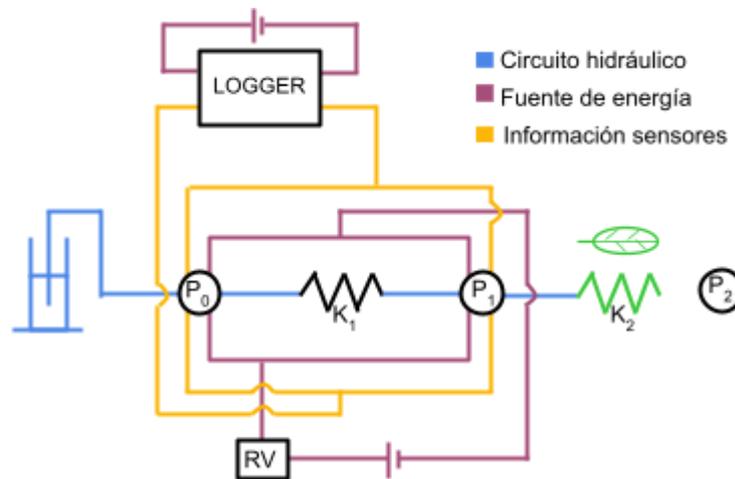


Figura 2: Esquema de las conexiones del sistema de caída de presión, donde P_0 y P_1 = transductores, K_1 = capilar, K_2 = hoja, P_2 = potencial de la hoja, RV= regulador de voltaje, LOGGER= datalogger. En azul se representan el reservorio de agua y el circuito hidráulico, en amarillo el circuito que lleva la información de los sensores al *datalogger*, en lila los circuitos de alimentación y en verde el material vegetal.

La puesta a punto del sistema conlleva más procedimientos aparte del ensamblaje antes de que esté preparado para comenzar a medir. Se deben calibrar los capilares, es decir, calcular su conductancia. Para ello tomamos varios datos de flujo a presiones distintas y los representamos en una recta, la conductancia es la pendiente de esa recta. Son necesarios un pie graduado y una balanza. Se colocó un reservorio de agua en el pie, del que sale un tubo al interior de la balanza, unido al fragmento de capilar, que debe estar en otro recipiente de agua, con el extremo sumergido y sin tocar las paredes (Fig 3). La fuerza que impulsa el flujo será equivalente a la presión de la columna de agua, que se obtiene multiplicando la diferencia de altura de las láminas de agua (no de los recipientes) en centímetros por $9,8 \times 10^{-5}$ para pasar a MPa. Graduar el pie y los recipientes respecto al poyo facilita el procedimiento. En cada punto, correspondiente a una diferencia de altura distinta, se midió la diferencia de peso en un tiempo dado, en este caso un minuto. Una buena calibración debe tener al menos 8 puntos, alguno con diferencia de altura negativa y repetidos tres veces. Después estos puntos se graficaron y se calculó la

recta de calibración, que presentó un grado alto de ajuste ($r^2 > 0,9$; Fig.3). La conductancia de ese capilar será igual al inverso de la pendiente de esa recta.

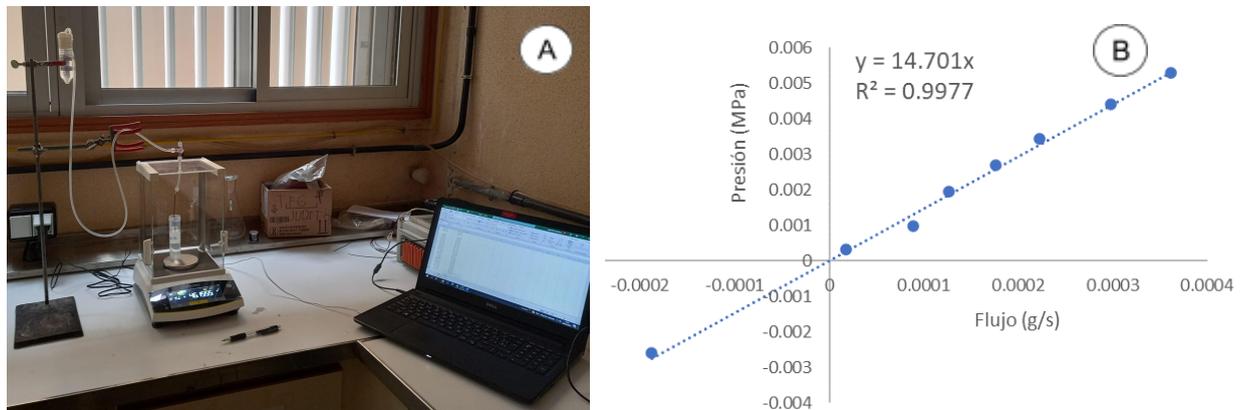


Figura 3: Calibración de los capilares. A: sistema de calibración: un reservorio de agua con la altura regulable, conectado a otro recipiente dentro de una balanza a su vez conectada a un ordenador. B: recta de calibración obtenida con los datos del sistema. Cada punto representa la media del flujo a distinta presión. La pendiente de la recta ($14,701 \text{ MPa} \cdot \text{s} \cdot \text{g}^{-1}$) equivale a la resistencia del capilar

Para minimizar el ruido en la medida se debe elegir un capilar que tenga una conductancia lo más parecida posible a la de la hoja, lo que requiere práctica, estar familiarizado con el sistema y una variedad de capilares con conductancias distintas. Se consiguieron resistencias distintas jugando no sólo con el diámetro del capilar, sino también con la longitud, cuanto más largo más resistencia ejercerá, obteniendo así un juego de capilares de distintas longitudes y diámetros para abarcar un espectro de conductancia amplio.

Una vez montadas todas las conexiones se lavó el sistema con una solución de lejía comercial al 10% y se enjuagó varias veces con agua. Para mantener el sistema limpio, libre de partículas que puedan taponar algún conducto, se repitió el lavado con lejía una vez a la semana, eliminando cualquier crecimiento de microorganismos que pudiera haber en el interior. El siguiente paso es llenarlo de agua y asegurarse de que no queden burbujas de aire. El agua debe ser destilada y desgasificada para evitar la formación de burbujas tanto en el interior de los tubos como en los conductos xilemáticos. La desgasificación se realizó manteniendo el agua en un matraz Kitasato con agitación y conectado a una bomba de vacío durante un mínimo de una hora. Este matraz se mantuvo cerrado con un tapón de goma al que se le insertó un tubo con una llave de paso de forma que permitía sacar el agua evitando que se regasificara. El llenado de agua del sistema se realizó con jeringas,

modificando el recorrido del flujo para completar todas las secciones. Los puntos problemáticos con las burbujas eran las resistencias y los sensores. Al forzar el agua por las resistencias hay que ejercer algo de fuerza pero es muy importante que no quede ninguna burbuja de aire. Los sensores son más complicados de llenar porque tienen la dificultad añadida de que son frágiles, la membrana se rompe fácilmente. Se hizo fuera del sistema, con ayuda de una jeringa con aguja, teniendo mucho cuidado de no perforar la membrana interior, hasta que paró de salir aire. Para volver a conectarlos se dejó el puerto con agua sobresaliendo de la boca del tubo y del sensor también, de forma que al hacer contacto se unieron y no quedó una burbuja de aire en medio. Para asegurarnos de que no tenemos aire en el sistema se puede inclinar para detectar cualquier movimiento de aire o cerrar las válvulas al exterior y hacer vacío con una de las jeringas. Este procedimiento se realizó todos los días, pues de un día a otro aparecían burbujas en el sistema.

A diferencia de lo que ocurre con las resistencias, sí es necesario calibrar los sensores cada vez que se va a medir, todos los días. Se siguió un procedimiento idéntico al de las resistencias, pero en vez de obtenerse una recta de presión frente a flujo, se obtuvo una recta de presión frente a voltaje.

Una vez se ensamblaron y calibraron los componentes el sistema estaba listo para comenzar a probarlo. El procedimiento para tomar medidas varía según el método que se elija pero a grandes rasgos es idéntico: se conecta la hoja al sistema y se registran los valores de voltaje que devuelven los transductores. Es importante que no le entre aire a los conductos y se embolicen. El protocolo es el siguiente:

1. Cierre del paso del agua hacia el tubo de la muestra, dejándolo abierto al reservorio, a los sensores y al capilar.
2. Separación de la hoja de la rama debajo del agua con una hojilla de afeitador.
3. Conexión de la hoja con el tubo, manteniéndolos sumergidos.
4. Apertura del paso hacia la hoja, con lo que los transductores empiezan a medir.
5. Toma de la respuesta de voltaje: si se usa el método evaporativo (EFM) hay que esperar a que se estabilice la respuesta para tomar el dato. En el caso del de rehidratación (RKM), nada más conectarlo habrá un pico, correspondiente a la succión de la hoja, que es el dato a anotar.

6. Medida del potencial hídrico de una hoja adyacente en cámara de Scholander.

Con esto se obtienen todos los datos necesarios para realizar los cálculos descritos anteriormente para obtener la conductancia. La transformación de voltaje a presión se hace con la ecuación de la recta de calibración.

Sistema gravimétrico

El montaje del sistema por gravimetría se realizó de acuerdo con Scoffoni *et al.* (2012). Realmente se trata de un potómetro muy sensible, se conecta la hoja a un reservorio de agua dentro de balanza de precisión, de forma que según la hoja vaya transpirando va disminuyendo el peso que registra la balanza (Entris II Essential Line Modelo BCE224I-1S, de Sartorius, de 0,1 mg de precisión). La base es muy sencilla pero hay que tener una serie de consideraciones en cuenta para evitar errores. Las mayores fuentes de errores en este sistema son la evaporación de agua y las fugas. Para asegurar que las pérdidas de agua sólo corresponden a la transpiración de la hoja la atmósfera de la balanza debe estar saturada en todo momento, debe estar sellada completamente. Con este objetivo se reemplazó la plancha de metacrilato superior con otra, cortada y lijada a la misma medida y taladrada a la medida del tubo que irá dentro de la balanza, de forma que tiene el diámetro justo para que entre el tubo y sea estanco. Después se sellaron con cinta aislante las juntas de una de las puertas, dejando la otra operativa. Se colocaron 4 tubos Falcon con esponjas saturadas de agua en las esquinas de la pesa para humidificar la atmósfera. Comprobamos si estaba sellada correctamente una vez montada, cerrando las llaves de paso para que el flujo sea cero y revisando que el peso que registra la pesa se mantiene estable.

El resto del montaje del sistema fue más sencillo. El tubo que va a la muestra debe entrar a la jaula de la balanza e introducirse dentro del agua del reservorio situado en ella, pero sin entrar en contacto con las paredes, se usó un pie de laboratorio para facilitar la colocación. En el sistema estándar en el otro extremo lleva una llave al final que permite regular el paso y conectar tubos de distinto diámetro según haga falta. Esta configuración tiene un gran inconveniente, se ralentiza mucho la medida porque hay que esperar a que la hoja se aclimate, lo que puede llevar hasta media hora. Se decidió modificar el sistema añadiendo una sección en paralelo con la que

se pueden tener hasta 5 hojas aclimatándose a la vez. Se trata de un cuadro de llaves (Fig. 4) con el que se puede controlar si la hoja está conectada al reservorio de la balanza o al alternativo, reduciendo el tiempo necesario por muestra.



Figura 4: Sistema de medición de flujo por gravimetría. Consta de un cuadro de llaves de paso al que se conectan hasta 5 hojas o ramitos a la vez, y que permite regular el flujo de agua de cada muestra independientemente para que vaya al depósito de la balanza o al auxiliar. En la imagen están conectados ramitos de *Lavandula canariensis* colocados para que la luz les llegue a todas las hojas por la cara adaxial.

A la hora de medir se conecta la balanza a un ordenador y se configura para registrar el peso en intervalos de tiempo determinados, en este caso son adecuados lapsos de 5 segundos. Después estos datos se grafican, se comprueba que el flujo estaba estabilizado y se transforman a flujo en mmol/s. Una vez medido el flujo se toma el dato de potencial hídrico con cámara de Scholander. La conductancia se obtiene como el cociente entre flujo y potencial.

El protocolo de medida es similar al del otro sistema. También resulta problemática la exposición de la muestra al aire y la formación de burbujas en el circuito. El procedimiento es el siguiente:

1. Cierre del paso del agua hacia el tubo de la muestra, dejándolo abierto al reservorio auxiliar.
2. Separación de la hoja de la rama debajo del agua con una hojilla de afeitar.
3. Conexión de la hoja con el tubo, manteniéndolos sumergidos.
4. Apertura del paso hacia la hoja desde el reservorio auxiliar.
5. Aclimatación de la hoja.

6. Cierre del paso hacia el reservorio auxiliar y apertura de la vía hacia la pesa.
7. Medida del flujo. Se deja que la balanza vaya registrando las variaciones de peso durante unos minutos (mínimo 5, idealmente alrededor de 10).
8. Medida del potencial hídrico en cámara de Scholander.

Mediciones de K_{leaf}

Como se detalla en los resultados, tras una serie de problemas, se decidió decantarse por el sistema gravimétrico para realizar medidas de K_{leaf} . Se realizó un *screening* de especies de distintos pisos de vegetación canarios que se encuentran plantadas en los jardines del Campus Central y del Campus de Anchieta. Se midieron nueve hojas adultas y de sol elegidas al azar de cada especie y se obtuvieron los valores de K_{leaf} y LMA correspondientes. El material se recolectó en distintos individuos de los jardines, cogiendo varias ramas para asegurar que hubiera material suficiente para medir 9 hojas y tener un par más de repuesto, y se llevó al laboratorio. Una vez en el laboratorio las ramas se recortaban bajo agua, a una longitud suficiente para garantizar que no quedaban embolismos. Se dejaban rehidratándose con agua destilada toda la noche en oscuridad y al día siguiente se escogían nueve hojas de ese material y se medían. Una de las ventajas del método es que se pueden regular las condiciones a las que están sometidas las hojas. Nosotros queríamos medir hojas que tuvieran una tasa de transpiración alta, por lo que les aplicamos una luz con un PAR de aproximadamente $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, con un ventilador que mejore la transpiración. En casos en los que la morfología foliar no permite medir hojas aisladas, como en *Lavandula canariensis*, se miden ramitos enteros y se colocan de forma que todas las hojas queden con la cara adaxial orientada hacia la luz (Fig. 4). Para el cálculo de LMA se fotografiaron las hojas justo después de las medidas y posteriormente se usó el programa ImageJ en su versión 1.54 d (Rasband, 2018) para calcular el área foliar. Se secó el material vegetal en estufa $60-70^\circ\text{C}$ durante un tiempo mínimo de 48h y se registró el peso seco.

Las especies se seleccionaron con intención no sólo de tener un amplio espectro de ambientes, sino también maximizar la diversidad foliar y de biotipos. Se escogieron un total de 12 especies de 3 ambientes distintos. De bosque termófilo se eligieron *Convolvulus floridus*, *Lavandula canariensis*, *Marcetella moquiniana* y *Olea cerasiformis*; de pinar, *Bituminaria bituminosa*, *Cistus monspeliensis* y *Jasminum*

odoratissimum; y de monteverde, *Arbutus canariensis*, *Crambe strigosa*, *Laurus novocanariensis* y *Picconia excelsa*.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la realización de las gráficas se empleó el programa R en su versión 4.2.2 (R Core Team, 2023). Se usaron los paquetes: *plyr* (Wickham, 2011), *ggplot* (Wickham, 2016), *car* (Fox y Weisberg, 2019), *agricolae* (de Mendiburu, 2021) y *stats* (R Core Team, 2023). Se comprobaron los supuestos de homocedasticidad y normalidad para todas las variables con las pruebas de Levene y de Shapiro-Wilk respectivamente, a un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Se realizó el test de Welch, un tipo de test paramétrico corregido para muestras heterocedásticas que compara medias y se realizó el test *post-hoc* correspondiente, un t'-test, una adaptación del test de t-student para grupos heterocedásticos (West, 2021). Además, se estudió la relación entre variables con regresiones lineales. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

La puesta a punto de los sistemas se desarrolló como queda detallado en Material y Métodos, y supuso el enfrentamiento a una serie de dificultades técnicas y problemáticas, algunas insalvables. A pesar de ello, se pudieron medir 9 especies con el método gravimétrico.

Montaje, puesta a punto y calibración de los sistemas

A lo largo de la puesta en marcha y las pruebas de los sistemas fueron siendo evidentes las deficiencias y los problemas de cada uno.

El ensamblaje del sistema de caída de presión fue sin duda donde más dificultades se encontraron. Se pudieron ir solventando hasta el final, hasta que una avería del datalogger impidió comenzar las medidas. Los problemas técnicos incluyen rotura de los transductores o fallos de conexión del *datalogger*. También se tuvo que lidiar con una serie de problemas recurrentes:

- Burbujas de aire: si la medida da resultados que se salen de lo esperable puede que haya aire en los sensores o en el capilar que estén modificando la lectura de presión. Se debe comprobar si hay burbujas o no, haciendo vacío con la jeringa.
- Fallo eléctrico: de nuevo, si la lectura es nula o se sale de lo normal puede ser que haya algún problema en alguna parte del circuito eléctrico. Conviene revisar que todo está bien enchufado, que la batería tiene carga y que los empates y conexiones no se han deteriorado.
- Rotura de los sensores: durante el desarrollo de las pruebas se rompieron tres sensores. La membrana que tienen en su interior es delicada y se rompe si sufre un cambio de presión brusco. Para evitarlo se debe tener cuidado de no ejercer demasiada presión con las jeringas y, si se acumula presión en la zona, no liberarla de golpe.

Son casos en los que es evidente que la respuesta no está reflejando la realidad porque refleja valores de flujo superiores a cuando no hay hojas conectadas, o una presión muy grande, más que al poner el reservorio en alto y cerrar la llave de paso. Incluso en ocasiones la respuesta de los sensores es opuesta, se puede comprobar revisando cómo cambian los valores de voltaje al ejercer presión o tracción con la jeringa.

El sistema gravimétrico se pudo montar sin dificultades irremediables y se testó a fondo. En este caso la mayor dificultad fue adquirir destreza con la medida, teniendo que desechar las primeras mediciones porque no eran fiables. La mayor ventaja es que permite medir todo tipo de hojas, desde las hojas grandes y pelosas de *C. strigosa* hasta las hojas compuestas de *M. moquiniana* y *L. canariensis*.

La cuestión más problemática en la toma de medidas son las fugas, especialmente en especies con los peciolos de forma irregular o poco redondeada, para solucionarlo se envuelven en parafilm o cinta de teflón. También hubo casos de embolismo o taponamiento de las muestras, en los que el problema es la propia hoja y lo más adecuado es desecharla.

Mediciones de K_{leaf}

Finalmente se midió la conductancia foliar de 9 especies. Se tuvo que eliminar *J. odoratissimum* del estudio porque no se consiguió conectar hojas sin tener fugas. Esta especie tiene el peciolo escotado, lo que dificulta que la cinta de teflón se adapte a la forma y deja huecos. También hubo que descartar otra especie, *L. novocanariensis* porque no se rehidrató, sino al contrario, perdió la turgencia. De todas las especies se obtuvieron los datos de transpiración (E), potencial hídrico (Ψ), área foliar y peso seco, que se usaron para calcular la conductancia foliar normalizada por área (K_a) y por peso (K_p) y el peso foliar por área (LMA). Se desecharon los datos de *Picconia excelsa* porque presentaban demasiada variabilidad. Se encontraron diferencias significativas entre especies (p -valor < 0.05) para todas las variables.

El valor de la media más bajo (más negativo) de potencial hídrico se registró en *O. cerasiformis*, que también presentó la mayor variabilidad. La especie que presentó el mayor valor es *L. canariensis* (Fig. 5A). En transpiración el valor más alto se presentó en *C. monspeliensis*, que además tenía mucha variabilidad. *C. strigosa* se encontraba en el otro extremo (Fig. 5B). Los datos de conductancia normalizada al área concuerdan con los de transpiración: de nuevo *C. monspeliensis* fue la especie con mayor media y *C. strigosa* la menor (Fig. 5C). Sin embargo, para la conductancia normalizada al peso sí que varió, en este caso *M. moquiniana* presentó el mayor valor, y *C. strigosa* se mantuvo como especie con el menor valor (Fig. 5D). Para LMA, de nuevo fue *C. strigosa* la especie de menor media, pero por el contrario la de mayor fue *O. cerasiformis* (Fig. 5E). En general las especies presentan bastante variabilidad, tienen un error estándar alto.

En las regresiones lineales no se encontró correlación entre ninguna de las variables (p -valor $> 0,05$). Sin embargo, al graficar los datos (Fig. 6), sí que se apreciaron tendencias. No aparecen valores altos de K_p para valores altos de conductancia de LMA (Fig. 6A). Además, los datos de *C. strigosa* son anómalos con respecto al del resto de especies. La relación de conductancia según área y LMA muestra una tendencia opuesta: no existen valores bajos de conductancia para valores altos de LMA (Fig. 6B).

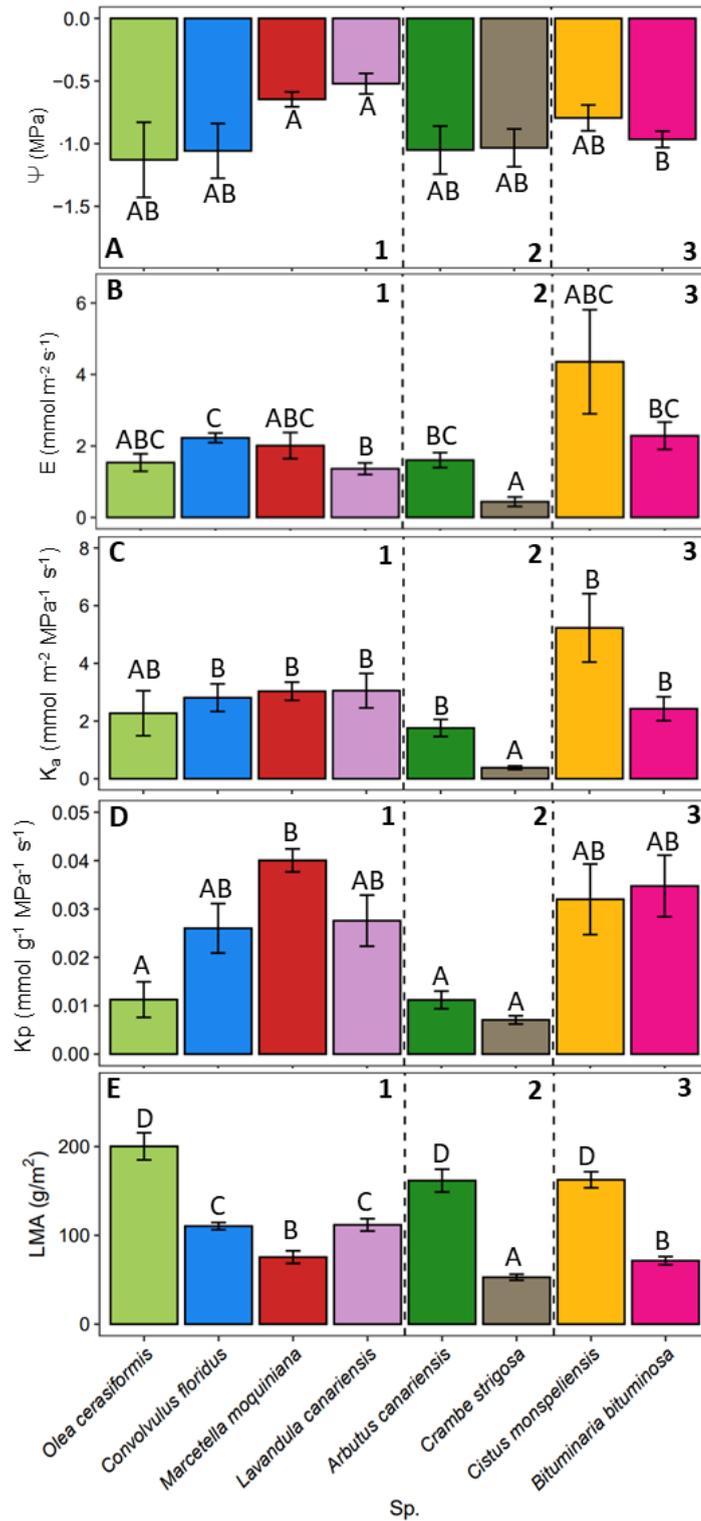


Figura 5: Valores medios de cada variable por especie y su error estándar. A: potencial hídrico (Ψ), B: transpiración (E), C: conductancia foliar normalizada por peso (K_p), D: conductancia foliar normalizada por área (K_a) y E: peso foliar por área (LMA). Separadas por ecosistema: 1= bosque termófilo, 2= monteverde, 3= pinar. Las letras asignadas a cada barra denotan diferencias significativas entre las 8 especies obtenidas a partir de un t'-test de Welch ($p < 0,05$; $n = 9$ por sp). Las barras de error muestran el error estándar.

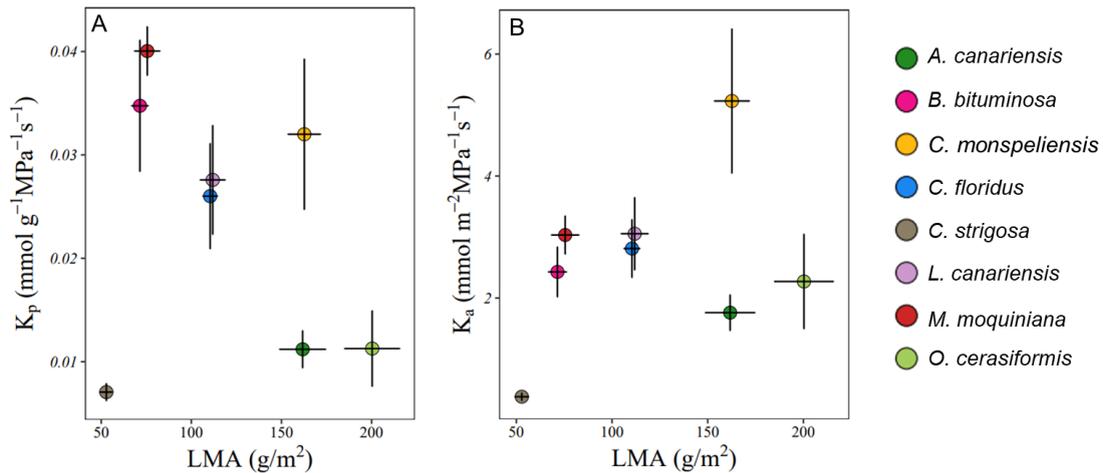


Figura 6: Peso foliar por área (LMA) frente a: A, conductancia foliar normalizada por peso (K_p) y B, conductancia foliar normalizada por área (K_a). Cada punto representa el valor medio por especie (n=9 por sp) y las barras de error corresponden al error estándar.

DISCUSIÓN

Sistemas

Ambos sistemas tienen sus ventajas y desventajas. La problemática del sistema por caída de presión radica en sus componentes electrónicos, presentando varias fuentes de averías (los sensores, el *datalogger*, las conexiones, la fuente de alimentación). Además, requiere conocimientos básicos de electrónica, algo que no todos los fisiólogos vegetales poseen. A la vez, este mismo aspecto resulta una ventaja porque la flexibilidad con el montaje del sistema permite adaptarlo a las necesidades del grupo. Así, se usó un *datalogger* porque estaba disponible en el departamento, pero se puede usar otro tipo de aparato para registrar los datos, como una placa de adquisición de datos (*DAQ board* en inglés), mucho más barata.

El sistema gravimétrico es más fácil de montar y más barato siempre y cuando ya se disponga de balanza en el laboratorio. Otro aspecto a tener en cuenta es que este sistema es poco adecuado para el método de cinética de la rehidratación (RKM), pues no es lo suficientemente sensible.

El método EFM presentó el problema de la dependencia de las tasas de transpiración de las condiciones experimentales. Lo que es una ventaja porque abre

la posibilidad a un amplio rango de experimentos. También implica que se deben controlar perfectamente las condiciones lumínicas, de humedad y temperatura a las que se encuentra la hoja y homogeneizar mucho el protocolo para que todas las hojas estén en las mismas condiciones. Otros experimentos han encontrado esta misma problemática (Brodribb y Holbrook, 2006).

Otro aspecto a tener en cuenta del sistema de caída de presión es que su sensibilidad lo hace adecuado para mediciones con el método de rehidratación (RKM), con lo que si se planea realizar experimentos con este método es mejor optar por este sistema. Este método permite experimentos que el otro no, sobre todo aquellos relacionados con la deshidratación de las hojas. Sin embargo, a la hora de caracterizar una especie, los dos métodos dan los mismos resultados (Hernández-Santana *et al.*, 2016)

Mediciones de K_{leaf}

Las diferencias significativas en los valores de conductancia entre plantas de *common garden* indican que el factor genético es determinante para este carácter. No se encontraron diferencias significativas entre ecosistemas. Las agrupaciones del t'-test no se ajustan tampoco a los biotipos. Otros estudios que comparaban especies de ecosistemas con distinto régimen hídrico tuvieron resultados contrarios a los de este experimento, encontraron que especies de climas más secos tienen una conductancia menor (Nardini y Luglio, 2014). En este caso el dato más bajo corresponde al ecosistema más húmedo, el monteverde. Puede que no se esté reflejando la realidad, ya que sólo se midieron dos especies, una de ellas es la única herbácea del experimento y la otra crece también en otros ecosistemas (del Arco-Aguilar y Rodríguez-Delgado, 2018), y la conductancia de especies coexistentes puede variar hasta un orden de magnitud (Sack y Holbrook, 2006). Probablemente los datos no sean una representación fiable de la comunidad vegetal.

Otra posible fuente de error al comparar las especies es que se asume que al realizarse en *common garden* se eliminó el factor aclimatación y las diferencias observadas se deben sólo a adaptaciones, pero quizás no sea así. Puede que haya especies menos plásticas, que no se aclimaten a las condiciones de la zona y se creen artefactos en la comparación. Existen trabajos previos que comparan otros

caracteres relacionados con la eficiencia hídrica de plantas crecidas en la naturaleza con plantas de *common garden* y encuentran diferencias de aclimatación. Es el caso de la estructura xilemática de las ramas entre especies (Medeiros y Pockman, 2014), e incluso entre poblaciones de la misma especie dentro de un gradiente altitudinal insular (Fisher *et al.*, 2007).

Por otro lado, los resultados de K_{leaf} dieron valores bajos en relación a otros estudios, la media para todas las plantas vasculares supera los $10 \text{ mmol m}^{-2}\text{MPa}^{-1}\text{s}^{-1}$, (Sack y Holbrook, 2006), y ninguna especie del experimento se acerca a ese valor. Esto puede deberse a un fallo en el diseño del experimento, quizás las hojas a una irradiancia demasiado baja para que la apertura estomática fuese completa. El PAR lumínico no era muy grande, pero sí suficiente para que haya fotosíntesis (Lambers y Oliveira, 2019). Esto podría explicar también la alta tasa de desviación de nuestros datos. Cuanto más bajos son los valores de transpiración que se recogen más se amplifica el error de la medida.

La relación entre variables que encontramos, esas tendencias entre conductancia y LMA, apoyan unos estudios (Nardini *et al.*, 2012; Simonin *et al.*, 2012) y contradicen otros (Ye *et al.*, 2021). En cualquier caso, es una relación bastante dudosa y controvertida (Lloyd *et al.*, 2007), pues realmente es una redundancia matemática. Al ser dos parámetros basados en la masa o el área de la hoja puede aparecer una correlación por simple imperativo matemático. De hecho $K_p = K_a/LMA$ (Osnas *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

- El sistema de medición de flujo por caída de presión es complejo de montar y se daña fácilmente.
- El sistema de medición de flujo por gravimetría es barato, de fácil montaje y versátil pero ruidoso. Presenta menos inconvenientes que el anterior.
- Se observaron diferencias entre los valores de conductancia de especies de los distintos ecosistemas canarios aún habiendo crecido en *common garden*.

- Dentro de un mismo ecosistema las distintas especies presentan valores variables de conductancia.
- Se observó una tendencia no significativa en la que no existen valores altos de LMA para valores altos de K_p .
- Se observó una tendencia no significativa en la que no existen valores altos de LMA para valores bajos de K_a .

CONCLUSIONS

- The pressure-drop flow meter is hard to assemble and easy to break.
- The gravimetric flow meter is cheap, easy to assemble and versatile but noisy. It has less issues than the other one.
- There were differences between the conductance values of the species from different canary ecosystems, even though they grew in the same location.
- The conductance values within the same ecosystem vary considerably.
- There was a non-significant tendency in which there are no high LMA values for high K_p values.
- There was a non-significant tendency in which there are no high LMA values for low K_a values.

BIBLIOGRAFÍA

- Blackman CJ, Brodribb TJ. 2011. Two measures of leaf capacitance: insights into the water transport pathway and hydraulic conductance in leaves. *Functional Plant Biology* 38: 118-126.
- Brodribb TJ, Holbrook NM. 2006. Declining hydraulic efficiency as transpiring leaves desiccate: two types of response. *Plant, Cell & Environment* 29: 2205-2215.
- del Arco-Aguilar MJ, Rodríguez-Delgado O. 2018. *Vegetation of the Canary Islands*. Springer International Publishing. Cham SW.
- de Mendiburu F. 2021. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package v. 1.3-5.
- de Villemereuil P, Gaggiotti OE, Mouterde M, Till-Bottraud I. 2016. Common garden experiments in the genomic era: new perspectives and opportunities. *Heredity* 116: 249-254.
- Díaz S, Cabido M, Casanoves F. 1998. Plant Functional Traits and Environmental Filters at a Regional Scale. *Journal of Vegetation Science* 9: 113–122.
- Dubuis A, Rossier L, Pottier J, Pellissier L, Vittoz P, Guisan A. 2013. Predicting current and future spatial community patterns of plant functional traits. *Ecography* 36: 1158-1168.
- Fisher JB, Goldstein G, Jones TJ, Cordell S. 2007. Wood vessel diameter is related to elevation and genotype in the Hawaiian tree *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *American journal of botany* 94: 709-715
- Flexas J, Scoffoni C, Gago J, Sack L. 2013. Leaf mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance: an introduction to their measurement and coordination. *Journal of Experimental Botany* 64: 3965-3981.
- Fox J, Weisberg S. 2019. *An R Companion to Applied Regression*. 3ª Edición. California
- Grossiord C, Buckley TN, Cernusak LA, Novick KA, Poulter B, Siegwolf RTW, Sperry JS, McDowell NG. 2020. Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New Phytologist* 226: 1550-1156.
- Harter DE, Irl SD, Seo B, Steinbauer MJ, Gillespie R, Triantis KA, Fernández-Palacios JM, Beierkuhnlein C. 2015. Impacts of global climate change on the floras of oceanic islands—Projections, implications and current knowledge. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17: 160-183.
- Hernández-Santana V, Rodríguez-Domínguez CM, Fernández JE, Díaz-Espejo A. 2016. Role of leaf hydraulic conductance in the regulation of stomatal conductance in almond and olive in response to water stress. *Tree Physiology* 36: 725–735
- Lambers H, Oliveira R. 2019. *Plant Physiological Ecology*. 3ª Edición. Springer Nature. Switzerland.
- Levitt J. 1972. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press. New York.
- Lloyd J Bloomfield K Domingues TF Farquhar GD. 2013. Photosynthetically relevant foliar traits correlating better on a mass vs an area basis: of ecophysiological relevance or just a case of mathematical imperatives and statistical quicksand?. *New Phytologist* 199: 311–321.
- Martín-Esquivel JL, Marrero-Gómez M, Cubas J, González-Mancebo JM, Olano JM, del Arco-Aguilar M. 2020. Climate warming and introduced herbivores disrupt alpine plant community of an oceanic island (Tenerife, Canary Islands). *Plant Ecology* 221: 1117-1131.
- Martín-Esquivel JL, Pérez-González M. 2019. *Cambio climático en Canarias*. Publicaciones Turquesa. Gobierno de Canarias.
- McGill BJ, Enquist BJ, Weiher E, Westoby M. 2006. Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in ecology & evolution* 21: 178-185.

- Medeiros JS, Pockman WT. 2014. Freezing regime and trade-offs with water transport efficiency generate variation in xylem structure across diploid populations of *Larrea* sp. (Zygophyllaceae). *American journal of botany* 101: 598–607.
- Melcher PJ, Holbrook NM, Burns MJ, Zwieniecki MA, Cobb AR, Brodribb TJ, Choat B, Sack L. 2012. Measurements of stem xylem hydraulic conductivity in the laboratory and field. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 685-694.
- Nardini A, Luglio J. 2014. Leaf hydraulic capacity and drought vulnerability: possible trade-offs and correlations with climate across three major biomes. *Functional Ecology* 28: 810-818.
- Nardini A, Pedà G, La Rocca N. 2012. Trade-offs between leaf hydraulic capacity and drought vulnerability: morpho-anatomical bases, carbon costs and ecological consequences. *New Phytologist* 196: 788-798.
- Oscá J, Romero R, Alonso S. 2013. Precipitation projections for Spain by means of a weather typing statistical method. *Global and Planetary Change* 109: 46-63.
- Osnas JL, Lichstein, JW, Reich PB, Pacala SW. (2013). Global leaf trait relationships: mass, area, and the leaf economics spectrum. *Science* 340: 741-744.
- Rasband WS. 2018. *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health. Maryland, USA. imagej.org,
- R Core Team. 2023. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria.
- Sack L, Bartlett M, Creese C, Guyot G, Scoffoni C., 2011. Constructing and operating a hydraulics flow meter. *PrometheusWiki*.
prometheusprotocols.net/function/water-relations/hydraulic-conductance-and-conductivity/constructing-and-operating-a-hydraulics-flow-meter (Último acceso abril 2023).
- Sack L, Holbrook NM. 2006. Leaf hydraulics. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 361-381.
- Sack L, Melcher PJ, Zwieniecki MA, Holbrook NM. 2002. The hydraulic conductance of the angiosperm leaf lamina: a comparison of three measurement methods. *Journal of experimental botany* 53: 2177-2184.
- Scoffoni C, McKown AD, Rawls M, Sack L. 2012. Dynamics of leaf hydraulic conductance with water status: quantification and analysis of species differences under steady state. *Journal of Experimental Botany* 63: 643-658.
- Simonin KA, Limm EB, Dawson TE. 2012. Hydraulic conductance of leaves correlates with leaf lifespan: implications for lifetime carbon gain. *New Phytologist* 193: 939-947.
- Van den Honert TH. 1948. Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Society* 3: 146-153.
- West RM. 2021. Best practice in statistics: Use the Welch t-test when testing the difference between two groups. *Annals of Clinical Biochemistry* 58:267-269.
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag. New York.
- Wickham H. 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software* 40: 1-29.
- Yang S, Tyree MT. 1994. Hydraulic architecture of *Acer saccharum* and *A. rubrum*: comparison of branches to whole trees and the contribution of leaves to hydraulic resistance. *Journal of Experimental Botany* 45: 179-186.
- Ye M, Wu M, Zhang H, Zhang Z, Zhang Z. 2021. High Leaf Vein Density Promotes Leaf Gas Exchange by Enhancing Leaf Hydraulic Conductance in *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science* 12: 1-10.