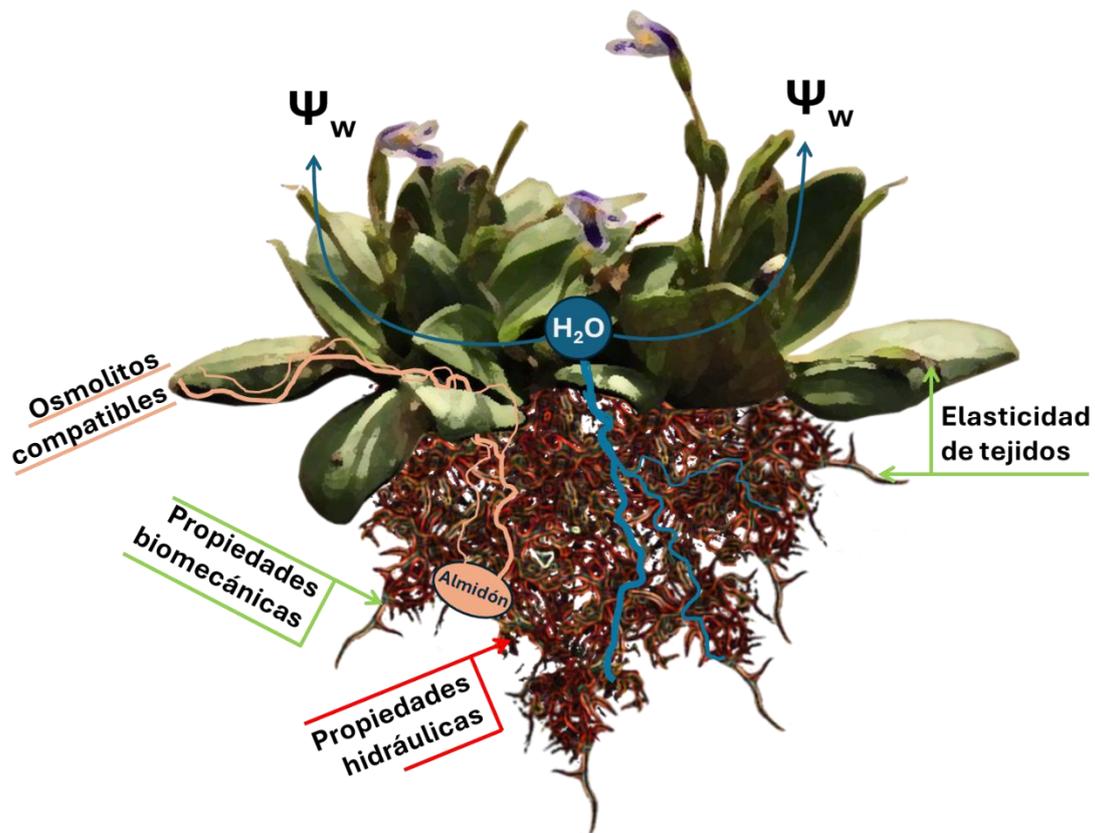


ENSAYOS PARA ESTUDIAR LAS RELACIONES HÍDRICAS EN PLANTAS

Cuaderno de prácticas

Alicia Victoria Perera-Castro, Miquel Nadal Nadal



ÍNDICE

MARCO CONCEPTUAL.....	2
Estatus hídrico: Potencial hídrico y contenido hídrico relativo.....	2
Curvas presión-volumen.....	7
Transporte de agua en la planta: flujos y conductancias.....	8
Conductancia hidráulica (K_{leaf}).....	9
Estatus hídrico del suelo.....	10
FASE EXPERIMENTAL.....	12
Ensayo 1. Contenido hídrico, contenido hídrico relativo y déficit de saturación hídrica.....	12
Ensayo 2. Determinación de potenciales hídricos en la planta, el suelo y la atmósfera.....	13
Ensayo 3. Curvas presión-volumen.....	15
Ensayo 4. Determinación de la tasa de transpiración con el método del potómetro.....	18
Ensayo 5. Determinación de la conductancia hidráulica foliar.....	19
Ensayo 6. Observación y cuantificación de estomas.....	21
Ensayo 7. Tinción de hojas y cálculo de VLA.....	24
REFERENCIAS.....	27

MARCO CONCEPTUAL

El agua es indispensable para la vida, ya que constituye el medio en el cual tienen lugar la mayor parte de las reacciones metabólicas. Además, en las plantas la absorción y el transporte del agua a través del xilema es el principal mecanismo por el cual obtener y distribuir los nutrientes disueltos. Este transporte hídrico está conducido principalmente por la transpiración, es decir, la evaporación del agua del interior de las hojas hacia la atmósfera a través de los estomas, formando un circuito continuo suelo-raíz-xilema-hoja-aire. Paralelamente, la apertura estomática que favorece la transpiración y el transporte de nutrientes también permite la entrada del CO₂, imprescindible para llevar a cabo la fotosíntesis.

Un déficit de agua desencadenaría el cierre estomático con la consecuente disminución de la fotosíntesis y la absorción de nutrientes (Taiz y Zeiger, 2006). Por ello, es de especial interés conocer el estado hídrico de la planta mediante mediciones del potencial hídrico o el contenido hídrico relativo. Otros parámetros como la tasa de transpiración, la conductancia hidráulica y estomática, la capacitancia, el módulo de elasticidad o el potencial osmótico, entre otros, nos permiten describir cómo una especie puede afrontar el déficit hídrico.

Estatus hídrico: Potencial hídrico y contenido hídrico relativo

El potencial hídrico (Ψ_w) es la diferencia de potencial químico entre el agua que alberga un tejido o un suelo y el agua en condiciones de referencia (en este caso, el agua pura). Es decir, es la energía que hay que aplicar a una unidad de masa de agua ligada a un tejido a un suelo para que alcance ese estado de agua pura. A pesar de que el potencial químico se suele expresar en unidades de energía libre por unidad de volumen (J/m³), el potencial hídrico se expresa indirectamente en unidades de presión equivalentes (MPa).

El Ψ_w de referencia – el agua pura – es cero, por lo que el Ψ_w de una muestra con una disponibilidad de agua menor tendrá valores negativos de Ψ_w . El Ψ_w de

una célula vegetal está dado por $\Psi_w = \psi_o + \psi_p + \psi_m + \psi_g$. El potencial osmótico (ψ_o), depende de los solutos disueltos en el agua los cuales disminuyen el potencial hídrico de la hoja porque el número de moléculas de agua libres que no han interactuado con el soluto es menor. Por ello, el ψ_o se da en valores negativos. El potencial de presión (ψ_p) se origina a partir de la presión de turgencia que ejerce el interior de la vacuola, cuando está llena de agua, hacia las paredes celulares, y de éstas hacia la vacuola, aumentando de esa manera el estado energético del agua. Por este motivo, el ψ_p se expresa en valores positivos. El potencial matricial (ψ_m) está dado por las superficies celulares sólidas que atraen moléculas de agua y las “atrapan”, de la misma manera que una capa fina de agua se queda pegada en la superficie de nuestro cuerpo cuando los damos un chapuzón en la playa. Finalmente, el potencial gravitacional (ψ_g) está relacionado con el efecto de la gravedad sobre el agua, “empujándola” hacia abajo, fuera de su estado en equilibrio. A efectos prácticos se asume que los potenciales matriciales y gravitacionales son negligibles; de este modo, el potencial hídrico de la hoja se asume como $\Psi_w = \psi_o + \psi_p$ (Azcón-Bieto y Talón, 2000; Larcher, 2003; Taiz y Zeiger, 2006).

La teoría de la continuidad suelo-planta-atmósfera (también conocida como de tensión-cohesión) en el transporte hídrico implica el mantenimiento de un gradiente de Ψ_w gracias al cual el agua asciende en flujo masivo a través del xilema (los vasos y las traqueidas). Es decir, las hojas, en donde se produce la transpiración, mantienen un Ψ_w menor (más negativos) que el xilema y este a su vez menor que las raíces y que el suelo. En una situación de estrés hídrico, el Ψ_w del suelo baja. En estas condiciones, algunas especies mantienen su potencial hídrico foliar constante durante el periodo de sequía gracias al cierre estomático y se denominan **isohídricas**. Por el contrario, las llamadas especies **anisoídricas** continúan transpirando y perdiendo agua, por lo que su Ψ_w cae (Damour *et al.*, 2010). Se cree que esta dicotomía en la respuesta del estoma al descenso del Ψ_w del suelo es debida a una diferente sensibilidad al ácido abscísico (ABA) (Yancey, 2005; Damour *et al.*, 2010).

A la hora de determinar qué tipo de control estomático presenta una especie, es indispensable conocer su estado hídrico a medida que se van incrementando las condiciones de sequía. Los parámetros más utilizados son mediciones del propio Ψ_w de la hoja (Jones, 2007; Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013) y mediciones del contenido hídrico relativo (CHR o RWC, de sus siglas en inglés *Relative Water Content*).

El método más común para medir el Ψ_w es el que se realiza mediante la **cámara de presión** o **cámara de Scholander** (Tardieu *et al.*, 2010). En esta cámara se coloca una hoja o un tallo cortado lo más limpio y perpendicularmente posible, de modo que la zona del corte sobresalga de la cámara, tal y como se ilustra en la Figura 1. La cámara está acoplada a una fuente de presión, que generalmente es un cilindro de gas comprimido (N_2 o aire sintético). Al ejercer presión, el agua del xilema que perdió tensión debido al corte es empujada a la superficie. La presión ejercida en el momento en el que se observe la aparición de una gota de agua en la zona de escisión es equivalente al Ψ_w de la hoja expresado en MPa (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

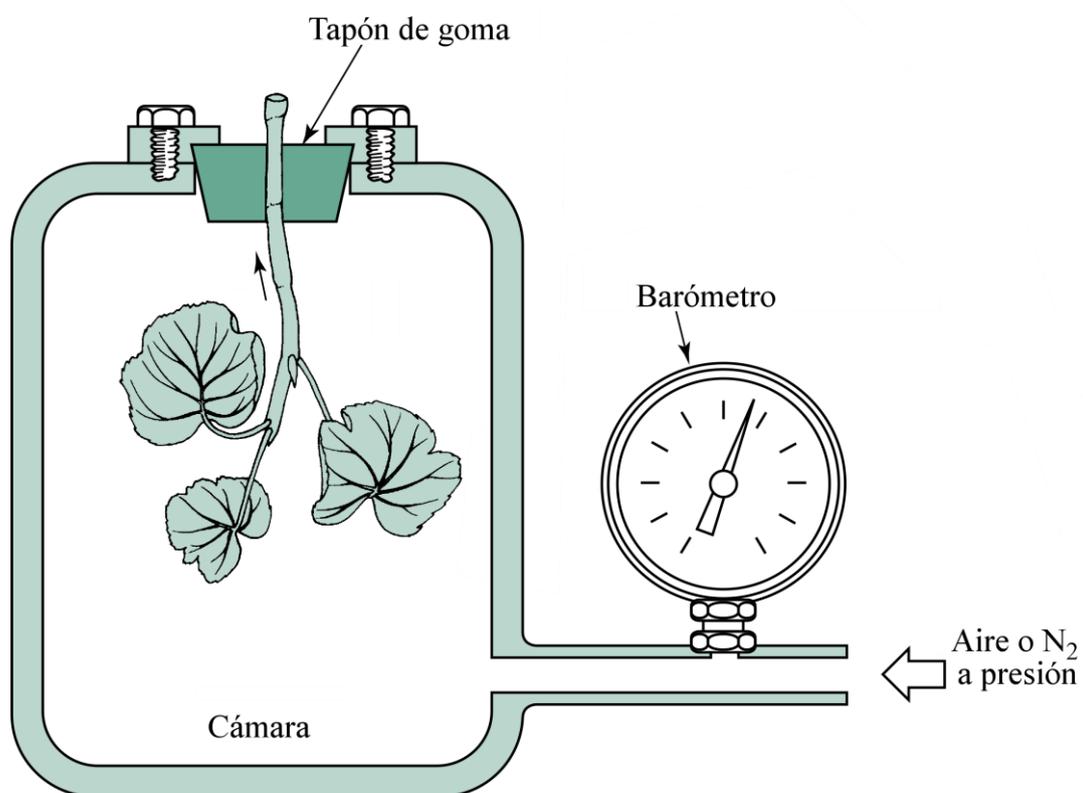


Figura 1. Diagrama de una cámara de presión. La hoja o el extremo de la rama se coloca en el interior de la cámara con el extremo del tallo o peciolo cortado sobresaliendo por el tapón de goma. La presión de la cámara se va incrementando gradualmente mediante la inyección de aire o N_2 a presión. En el momento en el que se observa el exudado del líquido xilemático en el área en donde se realizó el corte, la presión del aire de la cámara (medida por un barómetro) se considera equivalente a la presión con la que el xilema retiene el agua y, por lo tanto, al Ψ_w . Adaptado de Nobel (2009).

Otro aparato utilizado para medir el Ψ_w es el **psicrómetro**, un tipo de higrómetro. La ventaja es que puede usarse tanto para material vegetal como muestras de suelo. Inmediatamente después de colocar la muestra en el interior

de la cámara del psicrómetro, el agua que contiene comienza a evaporarse (y la humedad de la cámara a aumentar) hasta que la humedad se estabiliza debido a que la tasa de evaporación es la misma que la de condensación de agua. Si la muestra es agua pura, la humedad relativa que se alcanza en equilibrio es del 100% (o la presión de vapor equivalente a la temperatura del agua es saturante, e_o). Pero si la muestra contiene solutos, la humedad alcanzada en equilibrio es menor (al igual que su presión de vapor, e_w), ya que el número de moléculas de agua en contacto con el aire es menor (son desplazadas por el soluto o retenidas por un tejido vegetal o por las partículas de un suelo). Este ligero descenso de la presión de vapor de equilibrio indica un descenso de la energía libre de las moléculas de agua. La relación entre la presión de vapor de una muestra y su Ψ_w se puede expresar como:

$$\Psi_w = \frac{RT}{M} \cdot \ln \frac{e_w}{e_o}$$

donde R es la constante de gases (8.31 J/mol), T es la temperatura de la muestra en grados Kelvin y M es la masa molecular del agua (18.01 g/mol). Conociendo la temperatura de la muestra, es fácil calcular e_o utilizando la relación representada en la Figura 2.

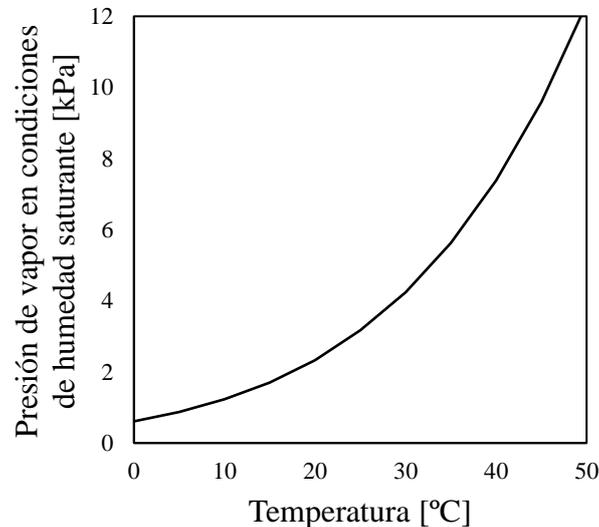


Figura 2. Relación entre la temperatura del aire y la presión de vapor máxima (con el 100% de humedad) que puede albergar.

El modo en el que se mide la presión de vapor de la muestra (e_w) puede variar dependiendo del tipo de psicrómetro. Por ejemplo, los denominados **psicrómetros isobáricos** (Figura 3A) se basan en la determinación de la diferencia de temperatura registrada por un termómetro de bulbo seco y por un

termómetro de bulbo húmedo, el cual alberga una solución de presión de vapor conocida. Si la presión de vapor de esta solución conocida es mayor que la presión de vapor de la muestra, el agua se evapora de la solución conocida, enfriándola. Si, por el contrario, la presión de vapor de la solución conocida es menor que la de la muestra, se condensará agua en esta solución conocida, calentándola. La diferencia entre las temperaturas registradas por ambos termómetros permitirá el cálculo de la presión de vapor de la muestra. Los **psicrómetros basados en la medición del punto de rocío** (Figura 3B) utilizan un espejo refrigerado que detecta el punto de temperatura a la que se produce la condensación de la humedad de la cámara en el espejo, detectando un cambio de reflectancia de un rayo de luz incidente en el espejo. Utilizando la relación entre temperatura y presión de vapor máxima (Figura 2), se calcula e_w a la temperatura del espejo y, finalmente, el Ψ_w equivalente.

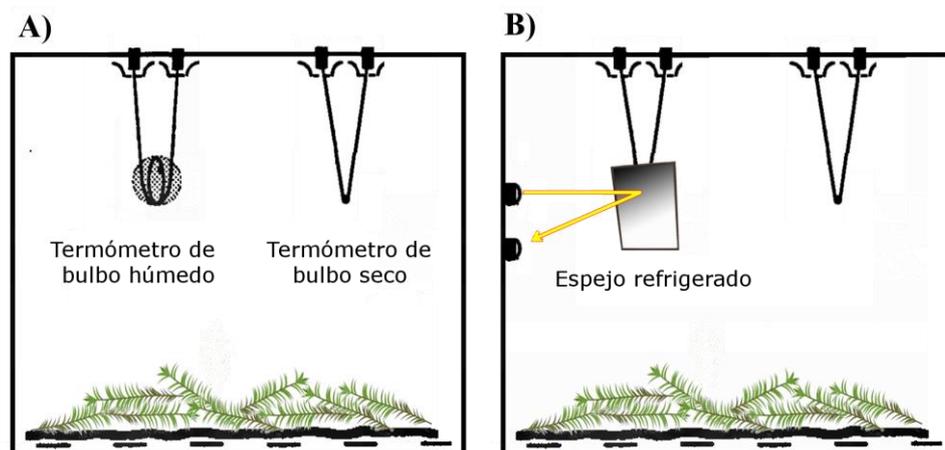


Figura 3. A) Psicrómetro isobárico. B) Psicrómetro medidor del punto de rocío.

Otra medida del estado hídrico de la planta se realiza por medio del contenido hídrico relativo (CHR), el cual expresa el porcentaje de contenido de agua en un momento y tejido dado relativo a la turgencia o saturación total. Está dado por la ecuación (Slatyer, 1967):

$$CHR (\%) = \frac{MF - MS}{MT - MS} \times 100$$

donde MF es la masa fresca de la hoja o disco foliar, MS es la masa seca y MT la masa a plena turgencia. MT se puede calcular mediante la incubación de la hoja en una cámara con humedad saturante. Por ejemplo, una placa de Petri o un bote hermético con el material vegetal envuelto en papel de filtro humedecido suele

ser el método más utilizado. Un máximo de 24 h de incubación suele ser suficiente para alcanzar la saturación de los tejidos. Sin embargo, un tiempo excesivo puede afectar a las paredes celulares y desestimar la medida del peso turgente, por lo que se recomienda determinar para cada muestra cuál es el tiempo estandarizado para obtener el MT (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

Conocer cómo determinar correctamente ambos parámetros, Ψ_w y CHR, es el primer paso para entender cómo las plantas responden al déficit hídrico. Nos entrenaremos en cómo realizar medidas de ambos parámetros en los Ensayos 1 y 2.

Curvas presión-volumen

Las dos medidas del estado hídrico de la planta descritas anteriormente, Ψ_w y CHR, no correlacionan linealmente a medida que se va desecando una muestra. Esto se debe a que, mientras que el descenso del Ψ_o de una célula permanece constante durante una deshidratación relativamente rápida del tejido (asumiendo la imposibilidad de síntesis de nuevos osmolitos) el Ψ_p solo decrece en una fase inicial, hasta que se anula por la pérdida total del turgor. A partir de este punto de pérdida de turgor (TLP, de sus siglas en inglés “*Turgor Loss Point*”), la relación entre el CHR y el Ψ_w se debe únicamente al Ψ_o . La determinación del TLP permite conocer parámetros de gran interés, los cuales se calculan a partir de las denominadas curvas presión-volumen (Ensayo 3).

Para construir una curva presión-volumen se debe representar gráficamente para una misma hoja el inverso negativo del potencial hídrico ($-1/\Psi_w$) frente al porcentaje de agua perdido ($100-\text{CHR}$) (Figura 4). En la curva obtenida se pueden diferenciar dos fases: 1) decrecimiento rápido y curvilíneo del potencial hídrico al inicio de la deshidratación y 2) decrecimiento lento y constante. Ambas fases están separadas por el TLP. Definir correctamente el TLP es fundamental, con lo que al inicio de la deshidratación es conveniente realizar tantas medidas como sea posible.

A partir de las curvas presión-volumen se pueden calcular numerosos parámetros de interés: potencial hídrico y CHR en el que se produce el TLP, potencial osmótico a plena turgencia, capacitancias, elasticidad y fracción apoplástica. Los cuales se describen detalladamente en el Ensayo 3. Haciendo una revisión exhaustiva de todos los parámetros derivados de las curvas presión-

volumen, Bartlett et al. (2012) identificó al potencial hídrico al cual se produce el TLP como el parámetro más vinculado a plantas de hábitats más áridos. Lo cual sugiere que aquellas plantas que pueden retrasar su pérdida de turgor mucho más son las que tendrán una adaptación mayor a la sequía.

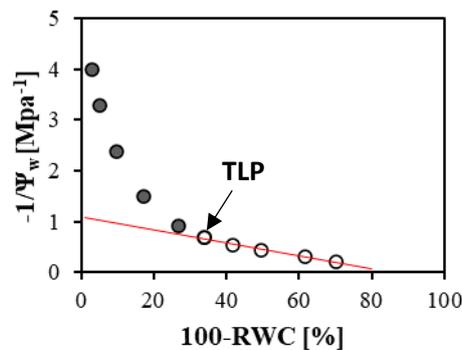


Figura 4. Curva presión-volumen. El punto rojo representa el TLP, a partir del cual el Ψ_p es nulo y la caída del Ψ_w es conducido únicamente por el Ψ_o . Los puntos negros se corresponden con la fase 1 de la curva, mientras que los puntos blancos representan la fase 2. La línea roja extrapola el valor de $-1/\Psi_p$ a la primera fase de la curva, de modo que el punto de corte con el eje y indica el $-1/\Psi_o$ en el punto de turgor máximo, al inicio de la curva.

Transporte de agua en la planta: flujos y conductancias

Como ya se mencionó anteriormente, la transpiración es un proceso trascendental para el transporte de agua, la nutrición mineral y la fotosíntesis. Los estomas desempeñan un rol esencial en el control de la pérdida de agua por transpiración, pero además, son la vía de ingreso de CO_2 para la fotosíntesis (Damour *et al.*, 2010).

La transpiración está limitada por diferentes tipos de resistencia a la difusión del agua, entre las que se incluyen la resistencia estomática (dada por número y geometría de los estomas), la resistencia cuticular (dada por la capa cerosa que recubre la epidermis), y la resistencia de la capa límite generada por el aire estático que se establece en la superficie foliar y cuyo grosor depende de la velocidad del viento y de la morfología de la hoja (Larcher, 2003; Taiz y Zeiger, 2006).

La tasa de transpiración (E , expresada en cantidad de agua por superficie de hoja y tiempo) puede ser cuantificada de diversas formas: el **método de intercambio de gases**, para el que se necesita un sistema analizador de gases

infrarrojo, el **método del potómetro**, que se basa en la medición de la tasa de pérdida de agua mediante pesos y es el que veremos en el Ensayo 4, y, finalmente, el **método del porómetro**, que permite medir la E mediante el análisis del incremento de humedad resultante al introducir la hoja en una cubeta sellada del porómetro. El equipo funciona realmente como un psicrómetro, midiendo la humedad de la cubeta a la vez que aire seco es inyectado a la misma con un flujo creciente hasta aproximarse al flujo necesario para reducir la humedad de la cubeta con la hoja a la humedad ambiental. Este flujo es equivalente al flujo de entrada de agua, es decir, a la tasa de transpiración.

Los factores ambientales que influyen en E y por tanto en la apertura estomática son el déficit de presión de vapor que existe entre la atmósfera y el interior de una hoja, el viento, la luz (calidad y cantidad), el CO_2 ambiental, la temperatura de la hoja, el estado hídrico del suelo y la presencia de contaminantes en el aire (Jones y Corlett, 1992; Lake *et al.*, 2001). Además, la tasa de transpiración también depende de las características intrínsecas de la planta, como la distribución y propiedades de los vasos conductores de agua (xilema), y las características de las hojas que determinan la conductancia hidráulica (K_{leaf}) y estomática (g_s), es decir, cómo de fácil se produce la salida del agua de la hoja al ambiente. La g_s puede estar referenciada tanto a la salida del agua como a la entrada del CO_2 , que, recordemos, son gases que comparten la misma vía de paso. La disposición y estructura de los vasos del xilema, así como las características del tejido no xilemático, determinan principalmente K_{leaf} en condiciones sin estrés (Brodribb *et al.*, 2007; Scoffoni *et al.*, 2016). K_{leaf} está altamente correlacionado con g_s y la capacidad fotosintética (Brodribb *et al.*, 2005). El número y la densidad de los estomas también pueden variar de acuerdo a las condiciones ambientales (intensidad de luz, concentración ambiental de CO_2). Por lo tanto, mediciones de K_{leaf} , g_s y densidad estomática son de especial interés a la hora de describir las características intrínsecas de la transpiración de una especie o variedad.

Conductancia hidráulica (K_{leaf})

La conductancia hidráulica de una parte de la planta (en este caso, la hoja) depende de E y del gradiente de potencial hídrico que se genera debido a la transpiración ($\Delta\Psi$). $\Delta\Psi$ se determina como la diferencia entre el potencial en equilibrio de la hoja (cuando no se produce transpiración) y el potencial generado debido a la pérdida de agua por transpiración. K_{leaf} engloba el transporte de agua

desde el pecíolo, pasando por el sistema vascular foliar y el mesófilo – apoplasto y simplasto – hasta los sitios de evaporación (la cámara subestomática) (Flexas *et al.*, 2013). La longitud del sistema de venación por área (*Vein Length per Area, VLA*), así como la máxima distancia entre las venas y el estoma son características anatómicas que determinan K_{leaf} ; una mayor densidad del sistema de venas así como una menor distancia entre éstas y los estomas son características asociadas a una elevada K_{leaf} (Brodrigg *et al.* 2007; Scoffoni *et al.* 2016) y, por tanto, permiten una mayor conductancia estomática y elevadas tasas de transpiración y de fotosíntesis (Flexas *et al.* 2013, Xiong *et al.* 2018). Además de ser dependiente de los factores anatómicos de las hojas, K_{leaf} puede variar dependiendo de las condiciones ambientales, como la luz (Xiong *et al.*, 2018) y, principalmente, la disponibilidad de agua. Un proceso de estrés hídrico importante puede determinar una disminución fuerte de K_{leaf} debido tanto al embolismo de los vasos (Brodrigg *et al.*, 2016) como a una disminución en la conductancia hidráulica extraxilemática en el mesófilo (Scoffoni *et al.*, 2017). Existen diversas técnicas para medir K_{leaf} (revisadas en Flexas *et al.*, 2013): el método del flujo evaporativo (*Evaporative Flux Method, EFM*), el de la cinética de rehidratación (*Rehydration Kinetics Method, RKM*), la medición de flujo a elevada presión (*High Pressure FlowMeter, HPFM*) y el de la bomba de vacío (*Vacuum Pump Method, VPM*). Todos estos métodos requieren el uso de hojas escindidas. El método del flujo evaporativo es un método fiable y asequible: está basado en el cálculo de la tasa de transpiración en una hoja escindida conectada a través del pecíolo a una fuente de agua (por lo tanto, el flujo de agua se lleva a cabo en condiciones muy parecidas a la vía “natural”) y situada bajo una fuente de luz, junto con la posterior medición del potencial hídrico una vez la tasa transpiratoria es estable (Sack y Scoffoni, 2012). Este último método se describirá más detalladamente en el Ensayo 5. La determinación de la densidad de estomas y el VLA se realizará con detalle en los Ensayos 6 y 7, respectivamente.

Estatus hídrico del suelo

Las características del suelo determinan su capacidad para retener agua y nutrientes; la textura determinará la cantidad de poros y capilares que se necesitan para mantener el agua y permitir la aireación de la raíz. A su vez, el tipo de suelo determinará también la capacidad de intercambio catiónico, es decir, la capacidad de retención e intercambio de nutrientes. Por ejemplo, los suelos

arcillosos presentan alta capacidad de intercambio catiónico y mayor capacidad de retención de agua.

El **contenido de agua en el suelo** se puede calcular a partir de su masa fresca y seca de una manera equivalente al método para calcular el CHR en las hojas. La **capacidad de campo** de un suelo es un indicador de su capacidad de retener agua y es equivalente al contenido hídrico del suelo tras su total saturación de agua, una vez que se ha drenado el exceso de agua. Los suelos arcillosos o con gran cantidad de humus pueden contener un 40% de su volumen de agua, mientras que suelos arenosos únicamente alcanzan un 3% de agua (Taiz y Zeiger, 2006). Por otro lado, se denomina **punto de marchitez permanente** al contenido de agua del suelo en el cual la mayor parte de las plantas permanecen marchitas, incluso cuando hayan igualado el Ψ_w de las hojas al del suelo. Se trata de un parámetro específico no solo del suelo, sino que depende también de la comunidad vegetal y del potencial hídrico en el cual se produce el TLP. El **agua disponible para la planta** equivale al agua del suelo en el rango entre capacidad de campo y punto de marchitez permanente. Cuanto más cercano esté el contenido hídrico del suelo al punto de marchitez permanente será más difícil para la planta disponer de agua (Kramer y Boyer, 1995). El agua del suelo, la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente se calcularán en el Ensayo 9.

FASE EXPERIMENTAL

Ensayo 1. Contenido hídrico, contenido hídrico relativo y déficit de saturación hídrica

Material

Material biológico: hojas.

Otros materiales: tijeras podadoras, sacabocados, cinta para marcar, marcadores, cámara húmeda.

Equipos: Balanza de dos o tres cifras decimales.

Metodología

Para calcular el contenido hídrico (CH), el contenido hídrico relativo (CHR) y el déficit de saturación hídrica (DSH) se requieren únicamente tres valores: la masa fresca (MF), la masa seca (MS) y la masa a plena turgencia (MT).

$$CH = \left(\frac{MF - MS}{MS} \right)$$

$$CHR = \left(\frac{MF - MS}{MT - MS} \right) \times 100$$

$$DSH = \left(\frac{MT - MF}{MT - MS} \right) \times 100$$

Fíjense que DSH es equivalente a 100-CHR, es decir, al agua que falta para alcanzar el peso turgente. El CH es útil calcularlo en ocasiones cuando el peso a plena turgencia no es conocido o es muy difícil de obtener, aunque hay que tener en cuenta que las unidades de CH no son en porcentaje, al contrario que CHR y DSH, sino que se dan en g H₂O g⁻¹ de peso de muestra seca.

Estos valores se pueden obtener de la hoja entera (incluyendo peciolo) o, en su defecto, de discos de hojas extraídos mediante el uso de un sacabocados.

MF se debe determinar al momento de realizar el corte de la hoja durante el muestreo. Si esto no es posible, se recomienda almacenar la hoja en una bolsa hermética lo más ajustada posible para evitar cambios en el contenido hídrico de la muestra y transportarla al laboratorio en el menor tiempo posible en condiciones de oscuridad y bajas temperaturas.

La determinación de MT puede realizarse por varios métodos. El más común consiste en almacenar la hoja en una cámara húmeda durante 24 h aproximadamente. La cámara húmeda puede equivaler a un recipiente hermético con papel de filtro o algodón humedecido envolviendo la muestra. Introducir la hoja en una bolsa hermética llena de agua también puede servir.

MS se determina al final, introduciendo las muestras individualmente en un sobre rotulado que se almacenará en estufa a 60-70°C hasta que el secado sea máximo y las muestras no varíen el peso (48-72 h suele ser más que suficiente).

Ensayo 2. Determinación de potenciales hídricos en la planta y el suelo

Materiales

Material biológico: plantas en maceta, la mitad oscurecidas

Otros materiales: tijeras podadoras, cuchillas, lupa.

Equipos: cámara de presión, psicrómetro de suelo.

Metodología

Durante la noche, en condiciones de transpiración nula, el potencial hídrico de la hoja se iguala a la del suelo alcanzado por las raíces de la planta. Durante el día, a medida que los estomas se van abriendo y E va aumentando, el potencial hídrico de la hoja se va haciendo más negativo, distanciándose del potencial del suelo y favoreciendo el flujo horizontal de agua. Es por ello que las medidas de potencial hídrico tomadas antes del amanecer se consideran equivalentes a las del suelo y aquellas tomadas durante el mediodía señalan el estatus hídrico de la planta durante su máxima apertura estomática (en esas condiciones ambientales).

Las medidas de Ψ_w tanto antes del amanecer (o en las macetas sombreadas) como durante el mediodía deben seguir el mismo procedimiento que se ilustra a continuación:

1) Escisión de la hoja con un corte limpio e inmediatamente después engancharla en la tapa de la cámara dejando el peciolo a la vista e introducir el limbo de la hoja sobrante en la cámara de presión. Asegurarse de que una vez cerrada la cámara, se realiza un giro de unos 30° en el sentido de las agujas del reloj para sellar la cámara.



2) Una vez sellada la cámara, movemos la tapa negra en el sentido de las agujas del reloj para estrangular la goma que rodea el peciolo y evitar que este se mueva durante la medida por la presión.



3) Abrimos la llave del manómetro al que está conectada la cámara de presión (o nos aseguramos de que está abierta).



4) Posicionamos la válvula horizontal en posición "chamber" para así permitir que el aire comprimido en la botella vaya pasando poco a poco a la cámara donde está la hoja. La "valve rate" controla la rapidez con la que sube la presión, que idealmente debe fijarse a 1 mBar por segundo.



5) Observar el corte del peciolo atentamente y justo cuando veamos la sabia salir por el xilema del corte, posicionar la válvula horizontal en "OFF" para detener la entrada de aire.



6) Realizar la lectura de la presión de la cámara. La foto del ejemplo indica -12 Bares (o -1,2 MPA). Recuerda que la presión de la cámara es positiva, pero la de la hoja es negativa, es decir, -1,2 MPa es la presión con la que el agua está retenida en el tejido, puesto que se requiere de una presión positiva de +1,2 MPa para superarla y extraer ese agua.



7) Despresurizar la cámara moviendo la válvula horizontal en la posición "Exhaust". Esto hará salir todo el aire a presión de la cámara y nos permitirá abrirla para cambiar la hoja.



El potencial de suelo también es posible medirlo con psicrómetros adaptados como el que se muestra en la Figura 5. El inconveniente de este tipo de medidas es la heterogeneidad del suelo, el cual suele tener potenciales menores (más negativos) en superficie y más cercanos a cero a medida que aumentamos la profundidad. Además, en campo, algunas plantas pueden tener un sistema radicular realmente profundo y puede acceder a suelos mucho más hidratados de los que podemos acceder en superficie. Sin embargo, en estudios controlados en maceta, esta medida de potencial hídrico de suelo puede ser útil si no se dispone del potencial hídrico previo al amanecer.



Figura 5. Psicrómetro de suelo (WP4C, Decagon).

Ensayo 3. Curvas presión-volumen.

Materiales

Material biológico: muestras vegetales, especialmente hojas.

Otros materiales: pinzas, tijeras podadoras, sobres de papel, cuchillas

Equipos: Balanza de precisión, cámara de presión o psicrómetro, estufa.

Metodología

Las curvas presión volumen deben comenzar en el estado de máximo hidratación. Por ello, se deben cortar las hojas antes del amanecer o bien hidratarlas en cámara húmeda utilizando la misma metodología que la descrita para calcular la MT. A continuación, a lo largo de 4-8 horas, se van realizando

medidas de Ψ_w con la cámara de presión o el psicrómetro de la misma hoja alternadas con periodos de desecación al aire. Inmediatamente después de la medida del Ψ_w se deben pesar la muestra y anotar la MF asociada. Al finalizar la curva, la muestra se debe meter en estufa a 60°C durante aproximadamente 48-72 h para obtener la MS.

El tiempo total requerido para elaborar la curva, así como el tiempo adecuado de los intervalos de desecación depende de cada especie y para determinarlos se deben realizar pruebas *a priori*. El objetivo es obtener tantos puntos en la curva como sea posible para cada fase, de modo que se pueda diferenciar fácilmente el TLP.

Para analizar la curva presión-volumen obtenida, recomendamos el uso de la plantilla Excel asociada a este material docente (adaptado de la herramienta de Excel de Sack y Pasquet-Kok, 2011). El primer paso para utilizar la plantilla es sustituir los valores de la curva del ejemplo de las celdas azules por los medidos (columna F y G). Automáticamente, se representará en el primer gráfico de la derecha el Ψ_w vs. el agua foliar (resultante de la resta entre MF-MS).

El segundo paso consiste en seleccionar los puntos de esta gráfica que se utilizarán para calcular la MT mediante la intersección en el eje x (en el ejemplo, sombreados en **gris**). Para ello, se deben incluir únicamente los puntos del inicio de la curva (los primeros medidos) que se ajusten a una recta, eliminando aquellos puntos que formen una asíntota hacia el eje x (sombreados en **verde** en el ejemplo). Aunque esta asíntota no es frecuente en plantas vasculares, en especies de briófitos o especies que albergan mucho líquido intersticial es frecuente iniciar la curva con un contenido hídrico mayor que el de la MT. Estos puntos no habría que tenerlos en cuenta en el análisis. Se deben modificar las celdas destacadas en amarillo en el cuadrante del paso 2 (columnas P y Q) para seleccionar únicamente los puntos deseados, manteniendo una coherencia con la gráfica. Esto nos permitirá saber en qué cantidad de agua nuestra muestra ha alcanzado la turgencia máxima. Es a partir de este valor (celda Q1) a partir del cual se calcula el CHR (columna J).

Una vez calculado el CHR, se continúa con el paso 3, que consiste en delimitar el TLP. En la gráfica del cuadrante del paso 3 (debajo de las columnas T, U y V), se deben seleccionar los puntos de la curva que se vayan a considerar parte de la fase lineal de deshidratación, ampliando o reduciendo la serie gris de la gráfica para garantizar esa linealidad. El primer punto incluido en esta serie de datos grises debe ser el TLP y se resalta la fila entera en **naranja**. Una vez

seleccionado el TLP, se debe modificar las celdas destacadas en **amarillo** (columna T y U) para que alberguen los mismos puntos que la serie gris de la gráfica.

El cuarto y último paso consiste en corregir todos los parámetros resultantes de la curva (columnas comprendidas entre la columnas X y AE) para adaptarlos al nuevo TLP definido. Los parámetros obtenidos a partir de la curva presión-volumen se definen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros obtenidos del análisis de la curva presión-volumen.

Parámetro	Fórmula	Definición
SWC	$= \frac{MT - MS}{MS}$	Contenido saturante de agua relativizado a masa seca
ψ_o	$= - \frac{1}{\text{intercepto y de la curva PV}}$	Potencial osmótico al inicio de la curva, en condiciones de turgor.
ψ_{TLP}	= ψ_w seleccionado en el momento de TLP	Potencial hídrico en el que se produce la pérdida del turgor.
CHR_{TLP}	= CHR seleccionado en la misma fila que el ψ_{TLP}	Contenido hídrico relativo en el que se produce la pérdida de turgor.
ϵ	$= \frac{\Delta\psi_p}{CHR}$	Módulo de elasticidad del tejido. Valores altos indican mayor rigidez.
C_{FT}	= $\frac{\Delta CHR}{\psi_w}$ para valores por encima del TLP	Capacitancia de la hoja antes del TLP
C_{TLP}	= $\frac{\Delta CHR}{\psi_w}$ para valores por debajo del TLP	Capacitancia de la hoja después del TLP
α_f	= intercepto X de la curva PV	Fracción apoplástica del CHR.

Ensayo 4. Determinación de la tasa de transpiración con el método del potómetro

Materiales

Material biológico: ramas de una planta leñosa o planta completa

Otros materiales: tubos, tapón para inserción del tallo, embudo, pipeta, pinzas de soporte, agua desgasificada.

Metodología

El método del potómetro es muy sencillo y permite medir la transpiración completa de una rama. En primer lugar, hay que montar el sistema como se muestra en la Figura 6, aunque pueden existir variantes a este sistema. El embudo, de la pipeta y del extremo del tubo en el que se conectará la rama deben ubicarse a la misma altura. A continuación, antes de colocar la rama, se rellena el sistema con agua destilada desgasificada (por ejemplo, con vacío o con un sonicador). Cuando el nivel del agua haya rellenado todo el sistema, se conecta la rama asegurándonos de que no quedan burbujas en su interior. Para escindir la rama de la planta hay que cortarla debajo del agua para asegurarnos de que no causamos embolismo en los vasos y conectarla al sistema de modo que pase al aire el menor tiempo posible. La conexión entre el tubo y la rama debe no tener fugas, por lo que es recomendable cubrirla con vaselina.

Una vez que está todo montado, se realiza una primera lectura del nivel del agua de la pipeta y tras un tiempo controlado (10 min) se realiza una segunda lectura. Debido a la transpiración de la planta, el agua del sistema se va perdiendo y las lecturas de la pipeta van disminuyendo. El volumen que se ha perdido en la pipeta desde la primera y la segunda lectura es el volumen de agua total transpirado. La transpiración, por tanto, se calcula de la siguiente manera:

$$E = \frac{\text{volumen de agua perdido}}{\text{tiempo transcurrido entre lecturas} \cdot \text{área total de hojas}}$$

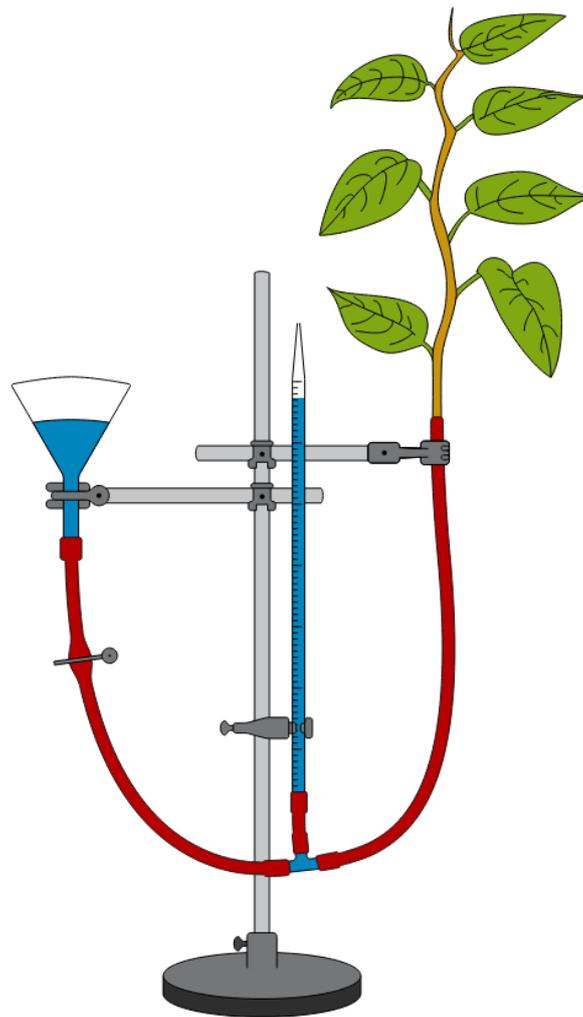


Figura 6. Montaje del potómetro para la determinación de la transpiración (Wikipedia.org).

Ensayo 5. Determinación de la conductancia hidráulica foliar

Material

Material biológico: hojas de las especies a evaluar, a ser posible con pecíolo robusto y de corte circular

Otros materiales: frasco Erlenmeyer de 200ml, tubos de plástico, bisturí, teflón, lámpara de intensidad conocida, ventilador plano, agua destilada y desgasificada

Equipos: cámara de presión, balanza de precisión con sistema de registro de datos, termocupla, sonicador, escáner o cámara de fotos

Metodología

Para evaluar la conductancia hidráulica (K_{leaf}) en hojas sin estrés, se seleccionan las hojas deseadas, se cortan por la base del pecíolo (y se vuelve a cortar el extremo del pecíolo sumergido en agua para evitar embolismos) y se dejan en agua para su rehidratación durante una noche. Se necesita agua destilada desgasificada (mediante el sonicador) para generar un flujo de agua a través de la hoja. El sistema completo (Figura 7) consta del frasco con agua situado en la balanza (para monitorizar la pérdida de agua), idealmente en una balanza cerrada con atmósfera saturada (disponer papel mojado en el interior) para garantizar que el cambio de peso es debido únicamente al flujo transpiratorio; los tubos de plástico conectan el frasco con el pecíolo de la hoja (debidamente sellado con la cinta). Es vital impedir la entrada de aire en el sistema frasco-tubos-hoja; por ello, a la hora de conectar la hoja con los tubos situar ambos sumergidos en una bandeja con agua destilada.

Una vez conectada la hoja, se sitúa debajo de una fuente de luz a la intensidad deseada y encima del ventilador para así reducir la resistencia de la capa limitante al intercambio de gases; a ser posible, mantener la temperatura foliar alrededor de 25°C. La hoja debe situarse a una altura ligeramente superior a la línea de agua del frasco (Figura 7). En este punto, se monitorea el cambio de peso por unidad de tiempo (cada minuto) durante el tiempo necesario hasta que la tasa de transpiración ($\text{mg H}_2\text{O s}^{-1}$) sea estable durante 5-10 minutos (sin cambios significativos en la tasa de transpiración). Una vez estable, se desconecta la hoja y se deja dentro de una bolsa sellable con elevada humedad en oscuridad durante 20 minutos para equilibrar el potencial hídrico; finalmente, se mide el potencial hídrico mediante la cámara de presión. K_{leaf} ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) se determina en función de la tasa de transpiración registrada (E ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el gradiente de potencial hídrico ($\Psi_w - \Psi_{leaf}$; MPa, se considera que $\Psi_w = 0$ MPa) mediante la siguiente fórmula (Xiong *et al.*, 2018):

$$K_{leaf} = \frac{E}{\Psi_w - \Psi_{leaf}}$$

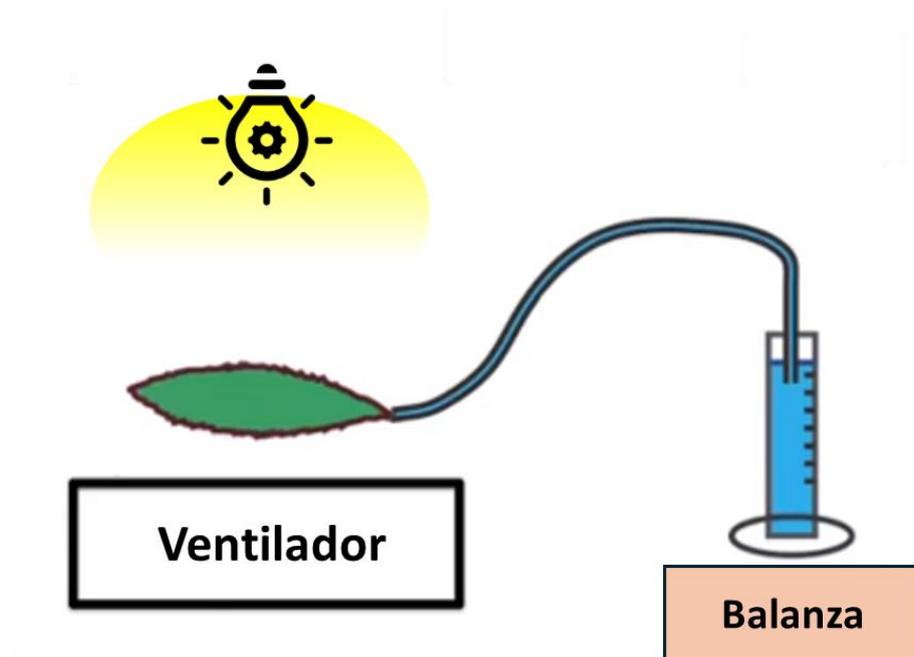


Figura 7. Montaje del sistema de medición de la conductancia hidráulica foliar por el método de flujo evaporativo.

Ensayo 6. Observación y cuantificación de estomas

Materiales

Material biológico: hojas de las especies estudiadas

Otros materiales: Láminas porta y cubre objeto, esmalte transparente, cinta pegante transparente, agua

Equipos: Microscopio

Metodología

Los índices más utilizados para cuantificar estomas son la densidad estomática (δ_s), la densidad estomática promedio (D_s) y el índice estomático (SI). Para calcular δ_s es necesario observar y los estomas al microscopio y hacer un recuento de ellos para un área de visión delimitada (Figura 8):

$$\delta_s = \frac{\text{número de estomas observados}}{\text{área de visión delimitada (cm}^2\text{)}}$$

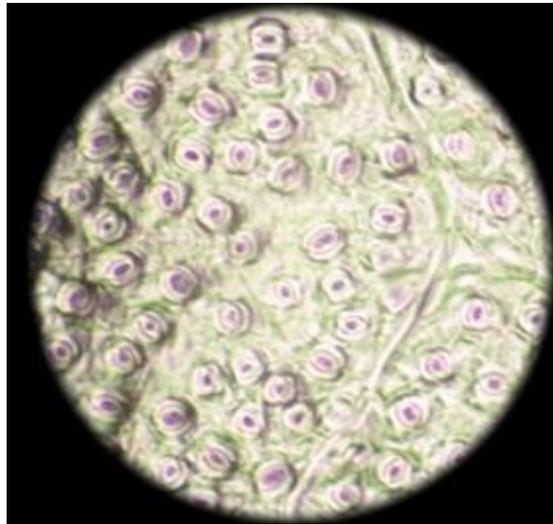


Figura 8. Visualización de estomas al microscopio para su recuento.

Para facilitar la observación de estomas, se pueden utilizar varios métodos. El más sencillo consiste en separar la epidermis del mesófilo de las hojas con la ayuda de unas pinzas y un bisturí. La epidermis aislada de este modo se coloca sobre una gota de agua depositada en un portaobjetos. Tras colocar el cubreobjetos, la muestra ya se puede observar en el microscopio. Sin embargo, este método no es fácilmente realizable para todas las especies vegetales.

Otro método indirecto para la observación de estomas consiste en aplicar una capa de esmalte transparente sobre la superficie foliar. Al secarse se pueden aplicar una o dos capas de esmaltes adicionales para aumentar su grosor y facilitar su retirada, o usar cinta adhesiva. Una vez separada la capa de esmalte de la hoja, quedarán impresos las cavidades de los estomas en la cara que estaba en contacto con la hoja. Se debe colocar el film de esmalte seco con esta cara hacia arriba en el portaobjetos para facilitar su observación en el microscopio. Este procedimiento se ilustra en la Figura 9). Si la hoja presenta alta densidad de tricomas o pelos es necesario cortarlos primero para posteriormente realizar el procedimiento de impresión de los estomas.



Figura 9. Procedimiento para la impresión de los estomas en una capa de esmalte y cinta adhesiva (de izquierda a derecha).

No todas las hojas presentan sus estomas en la cara abaxial únicamente (**hipoestomática**), sino que hay hojas que presentan estomas tanto en su cara adaxial como abaxial (**anfiestomáticas**). La δ_s se debe calcular para ambas caras de la hoja y promediarlas de la siguiente manera (El-Sharkawy *et al.*, 1985):

$$D_s = \frac{\delta_s \text{ superior}^2 + \delta_s \text{ inferior}^2}{\delta_s \text{ superior} + \delta_s \text{ inferior}}$$

El SI utiliza los valores de δ_s o D_s normalizados a la densidad de las células epidérmicas (δ_e). El número de células epidérmicas se puede contar a la par que el número de estomas, utilizando los mismos campos de visión (Salisbury, 1928; Royer, 2001):

$$\delta_e = \frac{\text{número de células epidérmicas}}{\text{área de visión delimitada (cm}^2\text{)}}$$

$$SI (\%) = \left(\frac{\delta_s}{\delta_s + \delta_e} \right) \times 100$$

Ensayo 7. Tinción de hojas y cálculo de VLA

Material

Material biológico: hojas

Otros materiales: safranina, etanol, NaOH al 5%, lejía, agua destilada, papel de filtro, pinzas, bata y guantes

Equipos: Escáner o cámara de fotos.

Metodología

Con este protocolo de tinción de hojas pretendemos resaltar los conductos xilemáticos de las mismas para luego poder calcular el VLA. Se trata de una adaptación publicada por Sack *et al.* (2014) y Scoffoni *et al.* (2016).

- 1) Sumergir hojas enteras sin daños visuales en una dilución de NaOH al 5% durante 24 horas aproximadamente para reblandecer los tejidos. Periodos de tiempo excesivamente largos puede desintegrar la hoja, dependiendo de su firmeza.
- 2) Transferir las hojas a otro recipiente con lejía comercial hasta su completo blanqueamiento durante un tiempo indeterminado, muy variable entre especies. Normalmente, en 10-15 minutos las hojas ya se han vuelto blancas o amarillentas. Sin embargo, hay especies muy coriáceas que requieren de más tiempo o especies de consistencia delicada que solo requieren 2 min. Es importante establecer este tiempo a priori con hojas de prueba, ya que el efecto de una incubación en lejía innecesario puede degradar la hoja.
- 3) Lavar las hojas con agua destilada para eliminar los restos de lejía.
- 4) Introducir las hojas en diluciones crecientes de etanol: 30%, 50%, 70% y 100%. En cada dilución, la hoja debe estar como mínimo 5 min sumergida. Este tiempo puede alargarse para hojas muy coriáceas.
- 5) Sumergir las hojas en safranina disuelta al 1% en etanol puro durante 10 min.
- 6) Lavar el exceso de safranina con etanol puro incubando 10-15 min. Aunque el etanol destinado a estos lavados se puede reutilizar varias

veces, es recomendable rehacerlo cuando veamos que está adquiriendo un color fucsia intenso.

- 7) Transferir las hojas a un recipiente con agua destilada. En este estado, las hojas pueden aguantar un par de días sin desteñirse, siendo igualmente recomendable su visualización inmediata.
- 8) Escanear las hojas o fotografiarlas con una escala, tal y como se muestra en la Figura 10. El uso de un microscopio o una lupa suele ser útil cuando la última ramificación de las venas es muy fina.

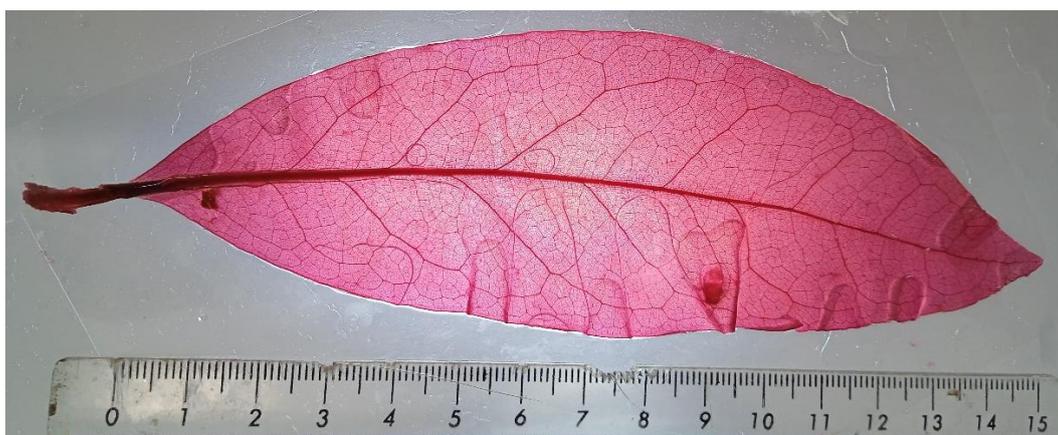


Figura 10. Imagen de una hoja teñida con safranina.

Para el cálculo de VLA se usará el software libre Image J (descarga gratuita en este [link](#)). Cuando esté instalado, hay que activar una opción muy útil que nos permitirá visualizar las áreas y longitudes medidas de una imagen mientras estamos trabajando con ella. Para ello, hay que abrir el desplegable “Analyze” y seleccionar “Set Measurements”. En la ventana emergente activar la casilla última de la columna izquierda “Add to overlay” y hacer click en OK. Esta opción solo hay que activarla una vez tras instalar el software. Ya estamos listos para trabajar con la imagen:

- 1) En primer lugar, se abre la imagen que queremos analizar (File/Open/Selección de la imagen).
- 2) En segundo lugar, seleccionamos el botón de segmento () , medimos los cm de nuestra escala y le otorgamos un valor a la escala (Analyze/Set Scale/Indicar los cm de la escala modificando solamente la casilla de “Known distance”). Si nuestra escala estaba en cm, esa es la unidad con la que el software trabajará con la imagen a partir de ahora.
- 3) El siguiente paso es seleccionar un área representativa de nuestra hoja. Normalmente se escoge la mitad del semilimbo de la misma, evitando el

nervio central (Figura 11). El área de interés se recoge en un rectángulo para medir su área, utilizando el botón de rectángulo () , y dibujando uno en nuestra área de interés haciendo click en la imagen. Para saber el área del rectángulo hay que pulsar Ctrl+M a la vez. Aparecerá un recuadro en el que podemos encontrar el área seleccionada.

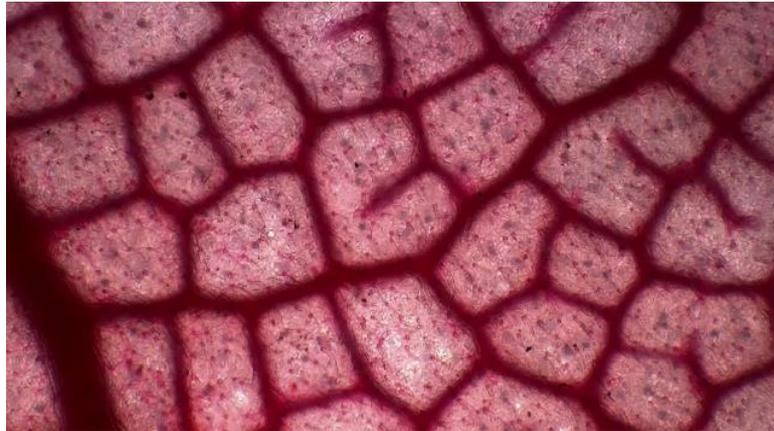


Figura 11. Ejemplo de una zona de interés para calcular el VLA de las venas terciarias. La imagen de la hoja entera se puede usar para calcular el VLA de la vena primaria y secundaria.

- 4) Deseleccionamos el recuadro haciendo click en cualquier lugar de la imagen. Un recuadro amarillo debería seguir apareciendo en la imagen marcando el área de interés seleccionada. Esto es gracias a la activación de la casilla “Add to overlay” que mostramos anteriormente.
- 5) Hacemos click derecho en el botón de segmento () . Se abrirá un desplegable. Seleccionar la opción “Segmented line”. El botón cambiará de símbolo () .
- 6) Calcar el entramado de venas incluido dentro del área seleccionada haciendo tantos clicks y añadiendo tantos segmentos como sea necesario hasta cubrir todas venas de la imagen. Lo que queremos medir no es el área de venación, sino la longitud de las venas. Por tanto, a cada vena solo hay que trazar una línea por encima. Para saber la longitud total hay que pulsar de nuevo Ctrl+M a la vez. Si se han medido varios segmentos, estos se tienen que sumar para tener la longitud total.
- 7) Ahora ya tenemos lo necesario para calcular el VLA mediante la siguiente fórmula:

$$VLA [mm^{-1}] = \frac{\text{Longitud total de venas}}{\text{Área de interés seleccionada}}$$

REFERENCIAS

- Azcón-Bieto J, Talón M** (2000). *Fundamentals of Plant Physiology*. Edicions Universitat de Barcelona: Barcelona, Spain.
- Bartlett MK, Scoffoni C, Sack L** (2012) The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecology letters* **15(5)**, 393-405.
- Brodrribb TJ, Holbrook NM, Zwieniecki MA, Palma B** (2005) Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New phytologist* **165(3)**, 839-846.
- Brodrribb TJ, Bienaimé D, Marmottant P** (2016) Revealing catastrophic failure of leaf networks under stress. *PNAS* **113 (17)**, 4865-4869.
- Brodrribb TJ, Feild TS, Jordan GJ** (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology* **144**, 1890-1898.
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L** (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* **33(9)**, 1419-1438.
- El-Sharkawy MA, Cock JH, Del Pilar Hernandez A** (1985) Stomatal response to air humidity and its relation to stomatal density in a wide range of warm climate species. *Photosynthesis Research* **7**, 137-149.
- 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(13)**, 3965-3981.
- Jones HG** (2007) Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**, 119-130
- Jones HG, Corlett JE** (1992) Current topics in drought physiology. *The Journal of Agricultural Science* **119(3)**, 291-296.
- Kramer PJ, Boyer JS** (1995) *Water relations of plants and soils*. Academic press.

- Lake JA, Woodward FI** (2008) Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist* **179(2)**, 397-404.
- Larcher W** (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.
- Nobel PS** (2009) *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic press.
- Pérez-Harguindeguy N, Díaz S, Garnier E, Lavorel S, Poorter H, Jaureguiberry P, Bret-Harte MS, Cornwell WK, Craine JM, Gurvich DE, Urcelay C, Veneklaas EJ, Reich PB, Poorter L, Wright IJ, Ray P, Enrico L, Pausas JG, de Vos AC, Buchmann N, Funes G, Quétier F, Hodgson JG, Thompson K, Morgan HD, ter Steege H, van der Heijden MGA, Sack L, Blonder B, Poschlod P, Vaieretti MV, Conti G, Staver AC, Aquino S, Cornelissen JHC** (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **61**, 167-234.
- Royer DL** (2001) Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology* **114(1-2)**, 1-28.
- Sack L, Caringella M, Scoffoni C, Mason C, Rawls M, Markesteijn L, Poorter L** (2014) Leaf vein length per unit area is not intrinsically dependent on image magnification: avoiding measurement artifacts for accuracy and precision. *Plant Physiology* **166(2)**, 829-838.
- Sack L, Scoffoni C** (2012) Measurement of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance and their responses to irradiance and dehydration using the evaporative flux method (EFM). *Journal of Visualized Experiments* **70**, e4179, doi:103791/4179.
- Sack L, Pasquet-Kok J, PrometheusWiki contributors** (2011) Leaf Pressure-Volume Curve Parameters. PrometheusWiki. Available at: <http://prometheuswiki.org/tiki-pagehistory.php?page=Leaf%20pressure-volume%20curve%20parameters&preview=16>
- Salisbury EJ** (1928) I. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, **216(431-439)**, 1-65.

- Scoffoni C, Albuquerque C, Brodersen CR, Townes SV, John GP, Bartlett MK, Buckley TN, McElrone AJ, Sack L** (2017) Outside-xylem vulnerability, not xylem embolism, controls leaf hydraulic decline during dehydration. *Plant Physiology* **173**, 1197-1210.
- Scoffoni C, Chatelet DS, Pasquet-kok J, Rawls M, Donoghue MJ, Edwards EJ, Sack L** (2016) Hydraulic basis for the evolution of photosynthetic productivity. *Nature plants* **2**, 16072.
- Slatyer RO** (1969). Physiological significance of internal water relations to crop yield. *Physiological Aspects of Crop Yield* **1**, 53-83.
- Taiz L, Zeiger E** (2006) Fisiología vegetal (Vol. 10). Universitat Jaume I, 1265.
- Tardieu F, Parent B, Simonneau T** (2010) Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? *Plant, Cell & Environment* **33(4)**, 636-647.
- Xiong D, Douthe C, Flexas J** (2018) Differential coordination of stomatal conductance, mesophyll conductance, and leaf hydraulic conductance in response to changing light across species. *Plant, Cell and Environment* **41(2)**, 436-450.
- Yancey PH** (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology* **208(15)**, 2819-2830.