

Óscar Mendoza Herrer

Respuesta fisiológica de la encina
(*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*) a
la sequía estival, edáfica y
atmosférica, del clima
mediterráneo: análisis de los
mecanismos hidráulicos y
fotosintéticos

Director/es

Peguero Pina, José Javier
Sancho Knapik, Domingo

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LA ENCINA
(QUERCUS ILEX SUBSP. ROTUNDIFOLIA) A LA
SEQUÍA ESTIVAL, EDÁFICA Y ATMOSFÉRICA, DEL
CLIMA MEDITERRÁNEO: ANÁLISIS DE LOS
MECANISMOS HIDRÁULICOS Y FOTOSINTÉTICOS

Autor

Óscar Mendoza Herrer

Director/es

Peguero Pina, José Javier
Sancho Knapik, Domingo

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias y del Medio Natural

2023



Universidad
Zaragoza



TESIS DOCTORAL

Respuesta fisiológica de la encina (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*)
a la sequía estival, edáfica y atmosférica, del clima mediterráneo:
análisis de los mecanismos hidráulicos y fotosintéticos

AUTOR

Óscar Mendoza Herrer

DIRECTORES:

Dr. Jose Javier Peguero Pina

Dr. Domingo Sancho Knapik

Centro de Investigación y Tecnología

Centro de Investigación y Tecnología

Agroalimentaria de Aragón

Agroalimentaria de Aragón

Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

“ ...

Duerme el recuerdo, la esperanza duerme

y es tranquilo curso de tu vida

como el crecer de las encinas, lento,

lento y seguro.

...”

Mi Salamanca (Miguel de Unamuno)

Mi agradecimiento más profundo,

a mi familia y amigos, por esos sentires cómplices,

a mis directores de Tesis y a Eustaquio, por su continuo apoyo, esfuerzo y buen hacer,

y a mis compañeros de la Investigación y la Educación, por haberme acompañado en este caminar.

¡¡¡Muchas Gracias!!!

RESUMEN

El clima Mediterráneo se caracteriza por veranos cálidos y secos, e inviernos fríos, presentando durante la estación estival un mínimo (menos del 20%) de precipitaciones, las cuales pueden venir en forma de tormentas de corta duración y baja intensidad que se desprecian en el balance hídrico del suelo. Esta coincidencia de las temperaturas máximas con las precipitaciones mínimas produce la característica aridez estival del clima Mediterráneo. En la Cuenca Mediterránea, caracterizada por dicho clima, la encina (*Quercus ilex* L.) es una de las especies vegetales arbóreas más representativa, por su extensión y por su abundancia, siendo identificada como una especie paradigmática del clima mediterráneo, al generar paisajes característicos de un alto valor ecológico en dicho entorno. Además de su importancia paisajística, la encina tiene un enorme valor económico por su capacidad de simbiosis con la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.), siendo la especie más utilizada como planta micorrizada para la implantación de explotaciones truferas.

Para la presente tesis, se tiene en consideración el modelo continuo suelo-planta-atmósfera, que analiza el flujo de agua en los vegetales terrestres como un proceso dinámico desde la fuente (suelo) hasta el sumidero final (atmósfera). De esta manera, se observa que la encina en el clima mediterráneo, se enfrenta durante el periodo estival a un doble estrés hídrico, el edáfico y el atmosférico. Además, bajo un escenario de calentamiento global del planeta, la encina puede verse afectada por un aumento del estrés hídrico estival y la aparición de mayores episodios térmicos extremos, tanto en las épocas estivales como invernales, afectando de forma directa a la salud de las masas forestales actuales y a la producción económica relacionada con las explotaciones agrícolas.

El objetivo general de la presente tesis es profundizar en el conocimiento del comportamiento ecofisiológico de la encina (*Quercus ilex* L.) frente al estrés hídrico, justificado por ser un buen indicador de la salud de las masas forestales del entorno mediterráneo frente al cambio climático, debido a su extensión geográfica, su abundancia en dicho entorno y las adaptaciones evolutivas que le confieren resistencia frente al aumento de estreses hídrico y térmico previstos; y por permitir, a su vez, evaluar y mejorar las plantaciones truferas, al estar en relación directa con el sistema productivo de la trufa, y por tanto, tener importantes implicaciones económicas.

Para ello, en la tesis se comienza analizando el papel de la encina (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*) como una especie mediterránea que puede soportar una intensa sequía estival gracias a una alta resistencia a la cavitación más allá del cierre estomático. Además de las limitaciones estomáticas, las limitaciones mesofílicas y bioquímicas a la captación de CO₂ también podrían aumentar en la encina bajo sequía. Sin embargo, ningún estudio ha abordado cómo los factores hidráulicos y no hidráulicos pueden limitar la recuperación de la fotosíntesis tras rehidratación después de inducir una pérdida del 50% de la conductividad hidráulica por estrés hídrico. En este primer estudio de la tesis se midieron los parámetros fotosintéticos, la embolia nativa del xilema y la concentración de ácido abscísico (ABA) en encinas con niveles crecientes de estrés hídrico edáfico y después de siete días de recuperación tras haber regado de nuevo la planta. El estrés hídrico causó una fuerte disminución en la asimilación neta de CO₂ (A_N), en la conductancia estomática y del mesófilo (g_s y g_m), y en la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}). El cierre estomático podría estar inducido por el rápido incremento registrado en la concentración de ABA. El alto nivel de embolia medido en el xilema explicó la fuerte regulación a la baja de g_s incluso después de un nuevo riego. Por este motivo, sólo se observó una recuperación parcial del A_N a pesar de que los factores no hidráulicos no limitaron la recuperación de A_N , ya que i/la concentración de ABA disminuyó

fuertemente y g_m y V_{cmax} recuperaron sus valores originales tras rehidratación. Por lo tanto, el modelo de limitación hidráulico-estomático de la fotosíntesis estaría implicado en la recuperación parcial de la A_N , con el fin de evitar la embolia generalizada del xilema bajo eventos de sequía posteriores que podrían comprometer la supervivencia de la encina.

En segundo lugar, se plantea que las sequías extremas y los eventos de calor, producidos frecuentemente en los climas mediterráneos, inducen anomalías en los flujos de CO_2 ecosistema-atmósfera. Para mitigar las consecuencias sobre los bosques y la agricultura, los gestores deben tener un mejor conocimiento del ecosistema mediante el seguimiento del estado de las plantas. El estado hídrico se observa comúnmente midiendo el potencial hídrico, pero cuando el evento extremo ha terminado, este parámetro no puede mostrar a los gestores la recuperación de otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis. Para abordar este problema, se ha evaluado el estado hídrico y la capacidad fotosintética de *Quercus ilex* a lo largo de un evento intenso de estrés hídrico y una posterior rehidratación. La capacidad fotosintética se evaluó a través de los parámetros de fluorescencia de clorofila y los índices de reflectancia de la hoja. Se observó que todos los parámetros de fluorescencia cambiaron a medida que el potencial hídrico disminuía, y no se recuperaron completamente después de la rehidratación. Entre los índices de reflectancia, el índice de reflectancia fisiológico (IRP, en inglés *photochemical reflectance index*, PRI) varió de forma similar a la fluorescencia, obteniéndose una fuerte correlación con el *quenching* no fotoquímico (en inglés *non photochemical quenching*, NPQ). Se propuso utilizar el PRI para detectar el nivel de capacidad fotosintética en *Quercus ilex*, por su facilidad de manejo. También se concluyó que las sequías intensas y el estrés térmico no sólo podrían reducir la capacidad fotosintética a través de los cambios en los parámetros de fluorescencia de clorofila durante el periodo de estrés, sino que también podrían afectar a la capacidad fotosintética una vez recuperado el estado hídrico de la planta.

En tercer lugar, en la tesis se analiza cómo las altas tasas de déficit de presión de vapor de agua (DPV, en inglés *vapor pressure deficit*, VPD) pueden disminuir gravemente la productividad de las plantas al reducir la conductancia estomática, lo que podría agravarse durante los periodos estivales en climas mediterráneos debido al déficit hídrico del suelo. En este tercer estudio, se monitorizó la respuesta de *Quercus ilex* a los cambios en el VPD durante el verano para evaluar los efectos y consecuencias de ambos estreses hídricos (atmosférico y edáfico) en el intercambio de gases. Para ello se realizaron mediciones en árboles de una plantación experimental durante dos veranos consecutivos con déficit hídrico moderado, utilizando tres métodos diferentes: a nivel de hoja con un analizador de gases, utilizando una cámara de planta entera para un seguimiento a corto plazo a nivel de árbol, y midiendo la temperatura de la copa para un seguimiento a largo plazo. Los tres métodos proporcionaron relaciones negativas entre el VPD y la conductancia foliar con discrepancias probablemente asociadas a la escala de medición. En general, los resultados mostraron que el estrés hídrico atmosférico y el del suelo tenían un efecto aditivo. Bajo un óptimo estado hídrico del suelo, un aumento del VPD se vio parcialmente compensado por una reducción de la conductancia estomática, lo que dio lugar a un ligero aumento de las tasas de transpiración. Con déficit hídrico en el suelo, la respuesta al VPD se tradujo en una mayor disminución de la conductancia estomática, reduciendo la transpiración como estrategia de ahorro de agua. La disminución de la conductancia en respuesta al VPD fue transitoria, recuperándose los valores iniciales tan pronto como el VPD disminuyó, tanto en óptimas condiciones hídricas del suelo como en sequía. Debido a esta alta sensibilidad a la sequía atmosférica, las tasas máximas de ganancia de carbono de la encina se vieron restringidas a un rango ambiental reducido, lo que podría modular su rendimiento fisiológico y su distribución natural.

Por último, ante el hecho de que la sequía estival que caracteriza al clima mediterráneo incluye eventos de baja precipitación (por debajo de 1 mm) como una de las formas de precipitación más comunes, y aunque, estos eventos de baja precipitación se consideran insignificantes en términos del balance hídrico del suelo, éstos podrían desempeñar un importante papel ecofisiológico en los árboles, ya que podrían reducir el estrés de la planta a través de la humectación del dosel y una posterior absorción de agua vía foliar. En este cuarto estudio de la tesis, se monitorizó la respuesta a corto plazo de *Quercus ilex* a un evento de baja precipitación ocurrido durante el periodo estival. Para ello se midió el VPD, el potencial hídrico del suelo y de la planta, la conductancia foliar total (g_t), la máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_v/F_m), y el PRI. Se detectó que, para un evento de lluvia de 0,6 mm, un aumento de la conductancia foliar medido justo antes de la propia lluvia podría ser atribuible exclusivamente a la disminución del VPD provocado por el cambio en las condiciones climáticas precedentes a la lluvia. Por el contrario, el aumento de la conductancia foliar registrado durante y con posterioridad a la lluvia pudo ser atribuible a la combinación del descenso en el VPD mas una posible absorción de agua por las hojas, que provocó una recuperación parcial del F_v/F_m y del PRI. Así pues, las tormentas de baja precipitación podrían tener una importancia significativa a la hora de considerar el balance hídrico de una especie vegetal concreta al igual que otros fenómenos naturales, como la niebla o el rocío, ya considerados especialmente importantes en entornos sometidos a sequías temporales.

Palabras clave: *asimilación de carbono, aridez atmosférica, cambio climático, clima mediterráneo, encina, relaciones hídricas, sequía edáfica*

ABSTRACT

The Mediterranean climate is characterized by hot, dry summers and cold winters, with a minimum (less than 20%) of precipitation during the summer season, which may come in the form of short-lived storms and low-intensity rainfall that is neglected in the soil water balance. This coincidence of maximum temperatures with minimum precipitation produces the characteristic summer aridity of the Mediterranean climate. In the Mediterranean Basin, characterized by this climate, the holm oak (*Quercus ilex* L.) is one of the most representative arboreal plant species, due to its extension and abundance, being identified as a paradigmatic species of the Mediterranean climate, as it generates characteristic landscapes of high ecological value in this environment. In addition to its landscape importance, the holm oak has an enormous economic value due to its capacity for symbiosis with the black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.), being the species most used as a mycorrhizal plant for the establishment of truffle farms.

For the present thesis, the soil-plant-atmosphere continuum model, which analyzes water flow in terrestrial plants as a dynamic process from the source (soil) to the final sink (atmosphere), is taken into consideration. Thus, it is observed that holm oaks in the Mediterranean climate face a double water stress during the summer period: soil and atmospheric stresses. Moreover, under a global warming scenario, holm oak may be affected by an increase in summer water stress and the occurrence of more extreme thermal episodes, both in summer and winter, directly affecting the health of the current forest stands and the economic production related to farms.

The general objective of the present thesis is to deepen the knowledge of the ecophysiological behavior of the holm oak (*Quercus ilex* L.) against water stress, justified by being a good indicator of the health of the forest masses of the Mediterranean environment against climate change, due to its geographical extension, its abundance in this environment and the evolutionary adaptations that give it resistance against the expected increase in water and thermal stresses; and for allowing, in turn, the evaluation and improvement of truffle plantations, since it is directly related to the truffle production system, and therefore has important economic implications.

To this end, the thesis begins by analyzing the role of holm oak (*Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*) as a Mediterranean species that can withstand intense summer drought thanks to a high resistance to cavitation beyond stomatal closure. In addition to stomatal limitations, mesophyll and biochemical limitations to CO₂ uptake could also be increased in holm oak under drought. However, no study has addressed how hydraulic and non-hydraulic factors may limit the recovery of photosynthesis following rehydration after inducing a 50% loss of hydraulic conductance due to water stress. In this first study of the thesis, photosynthetic parameters, native xylem embolism and abscisic acid (ABA) concentration were measured in holm oaks with increasing levels of edaphic water stress and after seven days of recovery following rewatering. Water stress caused a strong decrease in net CO₂ assimilation (A_N), stomatal and mesophyll conductance (g_s and g_m), and maximum carboxylation rate of Rubisco (V_{cmax}). Stomatic closure could be induced by the rapid increase recorded in ABA concentration. The high level of embolism measured in the xylem explained the strong down-regulation of g_s even after rewatering. For this reason, only a partial recovery of A_N was observed despite the fact that non-hydraulic factors did not limit A_N recovery, as i/ ABA concentration strongly decreased and ii/ g_m and V_{cmax} recovered their original values after rehydration. Therefore, the hydraulic-stomatal limitation model of photosynthesis would be involved in the partial recovery of A_N , in order to avoid widespread xylem embolism under subsequent drought events that could compromise oak survival.

Secondly, extreme droughts and heat events, frequently occurring in Mediterranean climates, induce anomalies in ecosystem-atmosphere CO₂ fluxes. To mitigate the consequences on forests and agriculture, managers must have a better understanding of the ecosystem by monitoring plant status. Water status is commonly observed by measuring water potential, but when the extreme event is over, this parameter cannot show managers the recovery of other physiological processes such as photosynthesis. To address this problem, we evaluated the water status and photosynthetic capacity of *Quercus ilex* throughout an intense water stress event and subsequent rehydration. Photosynthetic capacity was evaluated through chlorophyll fluorescence parameters and leaf reflectance indices. It was observed that all fluorescence parameters changed as water potential decreased, and did not fully recover after rehydration. Among the reflectance indices, the physiological reflectance index (PRI) varied similarly to fluorescence, obtaining a strong correlation with non photochemical quenching (NPQ). It was proposed to use PRI to detect the level of photosynthetic capacity in *Quercus ilex*, due to its ease of use. It was also concluded that intense drought and heat stress could not only reduce photosynthetic capacity through changes in chlorophyll fluorescence parameters during the stress period, but could also affect photosynthetic capacity once the plant's water status recovered.

Third, the thesis analyzes how high rates of water vapor pressure deficit (VPD) can severely decrease plant productivity by reducing stomatal conductance, which could be aggravated during summer periods in Mediterranean climates due to soil water deficit. In this third study, the response of *Quercus ilex* to changes in VPD during summer was monitored to evaluate the effects and consequences of both water stresses (atmospheric and edaphic) on gas exchange. For this purpose, measurements were performed on trees in an experimental plantation during two consecutive summers with moderate water deficit, using three different methods: at leaf level with a gas analyzer, using a whole-plant camera for short-term monitoring at tree level, and measuring crown temperature for long-term monitoring. All three methods provided negative relationships between VPD and leaf conductance with discrepancies probably associated with the scale of measurement. Overall, the results showed that atmospheric and soil water stress had an additive effect. Under optimum soil water status, an increase in VPD was partially offset by a reduction in stomatal conductance, resulting in a slight increase in transpiration rates. With soil water deficit, the response to VPD resulted in a further decrease in stomatal conductance, reducing transpiration as a water-saving strategy. The decrease in conductance in response to VPD was transient, recovering initial values as soon as VPD decreased, both in optimal soil water conditions and in drought. Due to this high sensitivity to atmospheric drought, the maximum carbon gain rates of holm oak were restricted to a narrow environmental range, which could modulate its physiological performance and natural distribution.

Finally, given the fact that the summer drought that characterizes the Mediterranean climate includes low precipitation events (below 1 mm) as one of the most common forms of precipitation, and although, these low precipitation events are considered insignificant in terms of soil water balance, they could play an important ecophysiological role in trees, as they could reduce plant stress through canopy wetting and subsequent water uptake via foliar water uptake. In this fourth study of the thesis, the short-term response of *Quercus ilex* to a low precipitation event during the summer period was monitored. For this purpose, VPD, soil and plant water potential, total leaf conductance (g_t), maximum potential photosystem II efficiency (F_v/F_m), and PRI were measured. It was detected that, for a rain event of 0.6 mm, an increase in leaf conductance measured just before the rain itself could be attributable exclusively to the decrease in VPD caused by the change in climatic conditions preceding the rain. On the contrary, the increase in leaf conductance recorded during and after the rain could be attributable to the combination of the decrease in VPD plus a possible water uptake by the leaves, which caused a partial recovery of F_v/F_m and PRI. Thus, low

rainfall storms could be of significant importance when considering the water balance of a particular plant species as other natural phenomena, such as fog or dew, already considered particularly important in environments subject to temporary droughts.

Key words: *atmospheric aridity, carbon assimilation, climate change, holm oak, Mediterranean climate, soil drought, water relations*

Índice de Contenidos

CAPÍTULO 1 Introducción General, Objetivos y Estructura de la Tesis	1
1.1. Introducción General.....	3
1.1.1. El clima Mediterráneo	3
1.1.2. La encina (<i>Quercus ilex</i> L.): arquetipo de árbol mediterráneo resistente a la aridez estival	4
1.1.3. El modelo continuo suelo-planta-atmósfera: flujo del agua	6
1.1.4. Estrategias frente al estrés hídrico y térmico: Cavitación y Fotoprotección.....	8
1.1.5. La encina (<i>Quercus ilex</i> L.): hospedador de <i>Tuber melanosporum</i> Vittad.....	12
1.1.6. El cambio climático y la fragilidad del clima Mediterráneo	13
1.2. Objetivos.....	15
1.3. Estructura de la memoria de Tesis	16
1.4. Bibliografía.....	17
CAPÍTULO 2 La cavitación limita la recuperación del intercambio gaseoso tras estrés por sequía en la encina (<i>Quercus ilex</i> L.)	23
Resumen Capítulo 2.....	25
2.1. Introducción	26
2.2. Materiales y métodos.....	27
2.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales.....	27
2.2.2. Mediciones del potencial hídrico	28
2.2.3. Medidas de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila en las hojas	28
2.2.4. Transpiración y conductancia de toda la planta.....	29
2.2.5. Embolia nativa del xilema.....	30
2.2.6. Determinación del ácido abscísico	30
2.2.7. Análisis estadístico.....	30
2.3. Resultados	31
2.3.1. Transpiración y conductancia de toda la planta.....	31
2.3.2. Parámetros fotosintéticos a escala foliar	31
2.3.3. Embolia nativa del xilema.....	33
2.3.4. Ácido Abscísico	34
2.4. Discusión.....	34
2.4.1. Periodo de sequía	34
2.4.2. Recuperación	35
2.5. Conclusiones.....	37
2.6. Bibliografía.....	37

CAPÍTULO 3 Los parámetros de fluorescencia de clorofila y los índices de reflectancia de la hoja, permiten monitorizar los cambios en el estado fisiológico de *Quercus ilex* L., bajo déficit hídrico progresivo 41

Resumen Capítulo 3.....	43
3.1. Introducción	44
3.2. Materiales y Métodos.....	45
3.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales.....	45
3.2.2. Mediciones del potencial hídrico	46
3.2.3. Fluorescencia de la clorofila	46
3.2.4. Reflectancia espectral	47
3.2.5. Análisis estadístico.....	47
3.3. Resultados	47
3.3.1. Potencial hídrico	47
3.3.2. Parámetros de fluorescencia de la clorofila	48
3.3.3. Índices de reflectancia.....	50
3.4. Discusión.....	51
3.4.1. Respuesta al déficit hídrico	51
3.4.2. Recuperación después de la escasez de agua	53
3.5. Conclusiones.....	53
3.6. Bibliografía.....	53

CAPÍTULO 4 El déficit de presión de vapor de agua limita la transpiración y la fotosíntesis en *Quercus ilex* L.: una comparación de tres métodos durante la sequía estival. 59

Resumen Capítulo 4.....	61
4.1. Introducción	62
4.2. Materiales y métodos.....	63
4.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal.....	63
4.2.2. Mediciones de intercambio de gases a nivel foliar	65
4.2.3. Mediciones de intercambio de gases a nivel de toda la planta	65
4.2.4. Termometría por infrarrojos del dosel.....	67
4.2.5. Análisis estadístico.....	68
4.3. Resultados	69
4.3.1. Evolución de la transpiración y la conductancia estomática.....	69
4.3.2. Respuesta de la conductancia estomática a la VPD y al déficit hídrico del suelo.	76
4.3.3. Respuesta de la fotosíntesis y de la eficiencia en el uso del agua al VPD y al déficit hídrico del suelo	80
4.3.4. Factores que regulan la respuesta a la VPD y al déficit hídrico del suelo	81
4.4. Discusión.....	82
4.4.1. Evaluación de los métodos para controlar la respuesta de las plantas al VPD	82
4.4.2. Efecto del VPD y del déficit hídrico del suelo en <i>Q. ilex</i>	83
4.4.3. Consecuencias de un mayor VPD en la ganancia de carbono	84
4.5. Conclusión	86
4.6. Apéndice A. Cálculo de la conductancia foliar	87
4.7. Apéndice B. Cálculo de la radiación neta isotérmica	88
4.8. Bibliografía.....	88

CAPÍTULO 5 Una precipitación de baja intensidad, que no afecta a las condiciones edáficas, reduce el estrés por sequía en <i>Quercus ilex</i> L.....	95
Resumen Capítulo 5.....	97
5.1. Introducción	98
5.2. Materiales y Métodos.....	99
5.2.1. Condiciones experimentales	99
5.2.2. Seguimiento de las plantas durante el evento de baja precipitación	100
5.2.3. Análisis estadístico.....	101
5.3. Resultados	102
5.4. Discusión y Conclusiones.....	104
5.5. Bibliografía.....	106
CAPÍTULO 6 Discusión General y Conclusiones Finales.....	111
6.1. Discusión general.....	113
6.1.1. Mecanismos de respuesta fisiológica de la encina frente a la escasez estival de agua en el suelo	113
6.1.2. La importancia de la sequía atmosférica en la transpiración y la capacidad de asimilación de carbono de la encina	115
6.1.3. Valoración de la capacidad de recuperación de la encina tras estrés hídrico estival impuesto en el clima mediterráneo	117
6.2. Conclusiones generales	121
6.3. Bibliografía.....	122
ANEXOS.....	127
ANEXO 1 Cavitation Limits the Recovery of Gas Exchange after Severe Drought Stress in Holm Oak (<i>Quercus ilex</i> L.) (Artículo publicado).....	129
ANEXO 2 Chl Fluorescence Parameters and Leaf Reflectance Indices Allow Monitoring Changes in the Physiological Status of <i>Quercus ilex</i> L. under Progressive Water Deficit (Artículo publicado)	145
ANEXO 3 Vapor pressure deficit constrains transpiration and photosynthesis in holm oak: A comparison of three methods during summer drought. (Artículo publicado).....	163
ANEXO 4 A low precipitation event drives a recovery of <i>Quercus ilex</i> L. during summer drought stress (Artículo en preparación)	179

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1 Introducción General, Objetivos y Estructura de la Tesis	1
Figura 1.1 Clima típico de tipo mediterráneo	3
Figura 1.2 Índice de aridez del área de distribución de <i>Quercus ilex</i>	5
Figura 1.3 Esquema del continuo suelo-planta-atmósfera.....	6
Figura 1.4 (A) Relación entre la presión de vapor de agua en la atmósfera y la temperatura. (B) Relación entre el potencial hídrico del aire y su Humedad Relativa (%)	8
Figura 1.5 Representación esquemática de los efectos del estrés estival en la funcionalidad de la planta. .	8
Figura 1.6 BoX-plots del potencial hídrico del tallo a una pérdida de conductividad del 50% (P_{50}) (gráfico superior) y del 80% (P_{80}) (gráfico inferior) para 24 especies de <i>Quercus</i>	9
Figura 1.7 Curvas de tipo de embolia de <i>Q. ilex</i> subsp. <i>ilex</i> (azul) y <i>Q. ilex</i> subsp. <i>ballota</i> (naranja) y el rango de valores de potenciales hídricos encontrados en la literatura	10
Figura 1.8 Cambio anual de la temperatura (respecto a la media preindustrial) frente a las concentraciones atmosféricas de CO_2	13
CAPÍTULO 2 La cavitación limita la recuperación del intercambio gaseoso tras estrés por sequía en la encina (<i>Quercus ilex</i> L.)	23
Figura 2.1 Representación de los valores medios y máximos de VPD diurnos.....	28
Figura 2.2 Evolución de (a) la transpiración de toda la planta (E_{plant}) y (b) la conductancia de toda la planta (g_{plant}) con el potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD})	31
Figura 2.3 Evolución de (a) la fotosíntesis neta (A_N) y (b) la conductancia estomática (g_s) respecto al potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD})	32
Figura 2.4 Evolución de (a) la conductancia mesófila (g_m) y (b) la velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}) respecto al potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD})	32
Figura 2.5 Limitaciones estomática (I_s), mesófila (I_m) y bioquímica (I_b).....	33
Figura 2.6 Evolución de la embolia nativa del xilema (%) con el potencial hídrico del mediodía (ψ_{MD}).....	33
Figura 2.7 Evolución de la concentración de ácido abscísico (ABA, $ng\ g^{-1}$) respecto al potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD})	34
CAPÍTULO 3 Los parámetros de fluorescencia de clorofila y los índices de reflectancia de la hoja, permiten monitorizar los cambios en el estado fisiológico de <i>Quercus ilex</i> L., bajo déficit hídrico progresivo	41
Figura 3.1 Condiciones climáticas del lugar durante el experimento.....	46
Figura 3.2 Relación del potencial hídrico de los brotes antes del amanecer (ψ_{PD}) con la eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M).	48
Figura 3.3 Relaciones del potencial hídrico de los brotes antes del amanecer y del mediodía (ψ_{PD} , ψ_{MD}) con los parámetros de fluorescencia de la clorofila (ChlF): eficiencia real (ϕ_{PSII}) e intrínseca (ϕ_{exc}) del PSII, <i>quenching</i> fotoquímico (qP) y <i>quenching</i> no fotoquímico (NPQ).	49
Figura 3.4 Relaciones del potencial hídrico de los brotes antes del amanecer y al mediodía (ψ_{PD} , ψ_{MD}) con los índices de reflectancia: índice de reflectancia fisiológico (PRI), índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) e índice de agua (WI).	50
Figura 3.5 Relación entre los valores medios ($\pm$ error estándar) del <i>quenching</i> no fotoquímico (NPQ) y el índice de reflectancia fisiológico (PRI).....	52

CAPÍTULO 4 El déficit de presión de vapor de agua limita la transpiración y la fotosíntesis en <i>Quercus ilex</i> L.: una comparación de tres métodos durante la sequía estival.	59
--	----

Figura 4.1 Patrones climáticos anuales en 2018 y 2019 de la zona de estudio. T, temperatura; P, precipitación.....	64
Figura 4.2 Representación esquemática y detalle fotográfico del dispositivo de cámara de planta completa utilizado en este estudio	66
Figura 4.3 Ejemplo de la monitorización del intercambio de gases a nivel de hoja en un ejemplar de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i>	70
Figura 4.4 Ejemplos de monitorización de un día de dos árboles diferentes de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> utilizando una cámara de planta entera.....	71
Figura 4.5 Evolución de la radiación fotosintética activa (PAR) a lo largo del día monitorizada para una encina	72
Figura 4.6 Ejemplo de la evolución del potencial hídrico del suelo (SWP) y de la depresión de la temperatura del dosel (CTD), medidos en una encina a lo largo de un verano mediterráneo	73
Figura 4.8 Temperaturas del aire (T_{air}) y del dosel (T_c) monitorizadas en un ejemplar de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> utilizando el método de termometría por infrarrojos.....	74
Figura 4.7 Detalle de la monitorización de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> mediante el método de termometría por infrarrojos del dosel durante dos olas de calor que difieren en las condiciones hídricas del suelo	75
Figura 4.9 Relación entre el déficit de presión de vapor (VPD) y la conductancia estomática (g_s) o la conductancia total (g_t).....	78
Figura 4.10 Evolución del promedio diurno ($PAR > 500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) del potencial hídrico del suelo (SWP), conductancia total derivada de termometría IR (g_t) y transpiración (E) durante tres olas de calor.....	79
Figura 4.11 Evolución de la fotosíntesis neta (A_N) a lo largo del día, monitorizada con una cámara de planta entera	80
Figura 4.12 Análisis de trayectorias considerando los datos infrarrojos de todo el día y de cada período del día	81
Figura 4.13 Resumen de las principales ventajas e inconvenientes de los tres métodos	83
Figura 4.14 Mapa superpuesto de la distribución espacial natural de <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotundifolia</i> (sombreado en verde) y los valores del rango de VPD a lo largo del periodo vegetativo	85

CAPÍTULO 5 Una precipitación de baja intensidad, que no afecta a las condiciones edáficas, reduce el estrés por sequía en <i>Quercus ilex</i> L.	95
---	----

Figura 5.1. Evolución del déficit de presión de vapor (VPD), precipitación (P) y potencial hídrico del suelo (SWP) durante el control -en condiciones de buen riego (5/7/19)-, y durante el evento estival de baja precipitación bajo déficit hídrico del suelo (del 23/7/19 al 30/7/19)	100
Figura 5.2 Evolución del déficit de presión de vapor máximo (VPD_{max}) para un día concreto y transpiración (E) y conductancia foliar total (g_t) asociadas a ese VPD_{max}	102
Figura 5.3 Potencial hídrico del suelo y de la planta medidos antes del amanecer	103
Figura 5.4 La máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_v/F_m) antes del amanecer, y el índice de reflectancia fisiológica (PRI) al mediodía.....	103
Figura 5.5 La radiación fotosintéticamente activa (PAR), registrada durante el evento de baja precipitación	105

Índice de Tablas

CAPÍTULO 1 Introducción General, Objetivos y Estructura de la Tesis	1
Tabla 1.1 Resultados científicos de la Tesis en forma de artículos científicos en revistas indexadas.	16
CAPÍTULO 2 La cavitación limita la recuperación del intercambio gaseoso tras estrés por sequía en la encina (<i>Quercus ilex</i> L.)	23
Tabla 2.1 Resultados de las pruebas t de Student realizadas para comparar los valores de fotosíntesis neta (A_N), conductancia estomática (g_s), conductancia del mesófilo (g_m) y velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax})	36
CAPÍTULO 4 El déficit de presión de vapor de agua limita la transpiración y la fotosíntesis en <i>Quercus ilex</i> L.: una comparación de tres métodos durante la sequía estival.	59
Tabla 4.1 Comparación de las condiciones de temperatura (T, °C) y déficit de presión de vapor (VPD, kPa) entre el exterior de la cámara (fuera) y el interior de la cámara (dentro).....	72
Tabla 4.2 Análisis de varianza (ANOVA)	76
Tabla 4.3 Estimaciones de los parámetros de las curvas log-logísticas que describen la relación entre el déficit de presión de vapor (VPD) y la conductancia estandarizada	77

Listado de Abreviaturas

ABA ácido abscísico

AEI Agencia Estatal de Investigación

A_N asimilación neta de CO₂

ANOVA análisis de varianza con un factor

BD base de datos de indexación

C_a concentración controlada de CO₂ en la cubeta

C_c concentración cloroplástica de CO₂

CTD canopy temperature depresión, en español depresión de la temperatura del dosel

ChlF fluorescencia de clorofila

C_i concentración subestomática de CO₂

C_{in} concentración de CO₂ del aire que entra de la cámara

CITA Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

CMNUCC Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático

CO₂ dióxido de carbono

C_{out} concentración de CO₂ del aire que sale de la cámara

C_p constante de calor específico molar del aire a presión constante

d diámetro

D déficit de concentración de vapor de agua

DE desviación estándar

DOY *day of year*, en español día del año

EA *East Atlantic*, en español Patrón del Atlántico Oriental (PAO)

E transpiración del árbol a nivel foliar

ED50 valor de un parámetro al 50% del valor de un segundo parámetro

E_{plant} transpiración por planta

ENSO *El Niño-Southern Oscillation*, en español El Niño-Oscilación del Sur (ENOS)

e_a presión de vapor de agua

e_{in} es la presión parcial de vapor de agua del aire de referencia suministrado a la cubeta

e_{leaf} es la presión de vapor de agua saturada dentro de la hoja

e_{out} es la presión parcial de vapor de agua en el aire dentro de la cámara

e_{sat} presión de vapor a saturación

FI factor de impacto

FITE Fondo de Inversiones de Teruel

FEP copolímero de etileno-propileno fluorado

F₀ fluorescencia de clorofila inicial en la oscuridad

F'₀ fluorescencia de clorofila mínimo, tras la iluminación en presencia de luz roja lejana

F_M fluorescencia máxima de clorofila en la oscuridad

F'_M fluorescencia de clorofila máxima durante un pulso de luz saturante

F_S fluorescencia de clorofila en estado estacionario

F_v/F_M máxima eficiencia potencial del fotosistema II

g_{bH} conductancia térmica de la capa límite

gⁱ valor individual de conductancia

g_m conductancia del mesófilo

g_{min} conductancia mínima

g_{max} conductancia máxima

g_{plant} conductancia por planta

g_r conductancia térmica radiativa

g_s conductancia estomática

g_t conductancia foliar total

h ángulo horario del sol

INIA Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

IRGA *infrared gas analyzer*, en español analizador de gases por infrarrojos

IR infrarrojos

IRT *infrared thermography/ thermometer*, en español termometría/termómetros por infrarrojos

iWUE eficiencia intrínseca en el uso del agua

J_F tasa de transporte electrónico

K constante de proporcionalidad

K_{diff} fracción de radiación difusa

K_m constante de Michaelis-Menten

K_t fracción transmitida

L calor molar de vaporización

LA área foliar

I_b limitación bioquímica a la fotosíntesis

I_m limitación del mesófilo a la fotosíntesis

I_s limitación estomática a la fotosíntesis

LSC *leaf-specific hydraulic conductivity*, en español conductividad específica foliar (CEF)

MCIN Ministerio de Ciencia e Innovación

n número de medidas

NAO *North Atlantic Oscillation*, en español Oscilación del Atlántico Norte (OAN)

NDVI *normalized difference vegetation index*, en español índice de vegetación diferencial normalizado

NPQ *Non-photochemical quenching*, en español *quenching* (apagado) no fotoquímico

P precipitación

P presión atmosférica

P, p, p-value es el p-valor. Medición estadística entre 0 y 1 para el contraste de hipótesis

pH potencial de hidrogeniones

PA *Path Analysis*, en español análisis del camino

PAR *photosynthetic active radiation*, en español radiación fotosintética activa (RFA)

PPFD *photosynthetic photon flux density*, en español densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF)

PLC₅₀, **P₅₀** pérdida de conductividad hidráulica del 50%

PLC₈₀, **P₈₀** pérdida de conductividad hidráulica del 80%

PRI *photochemical reflectance index*, en español índice de reflectancia fisiológica (IRF)

PSII fotosistema II

PSII (1-Φ_{exc}) disipación en la antena del fotosistema II

PVC policloruro de vinilo

Q_{diff} radiación difusa que llega al sensor

Q_{dir} radiación directa que llega al sensor

Q_{dir-dosel} radiación directa incidente en la superficie del dosel

Q₀ radiación neta isotérmica total

qP *quenching* fotoquímico

Q_{sensor} radiación horizontal

R constante universal de los gases

R² Coeficiente de determinación del ajuste

R₅₃₁ reflectancia a 531 nm

RCP *Representative Concentration Pathway*, en español Trayectorias de Concentración Representativas (TCR)

RH *relative humidity*, en español humedad relativa (HR)

R_L tasa de respiración en la luz

rpm revoluciones por minuto

r_t es la resistencia total de la hoja al vapor de agua (estomática + capa límite)

SPAC *Soil-Plant-Atmosphere Continuum*, en español continuo suelo-planta-atmósfera (CSPA)

std g conductancia foliar estandarizada

SWP *soil water potential*, en español potencial hídrico del suelo (PHS)

T temperatura

T_{air} temperatura del aire

T_c temperatura del dosel

T_{dry} temperatura de la hoja modelizada para una superficie seca

t de Student prueba estadística *t* de Student

TLP *turgor loss point*, en español punto de pérdida de turgencia (PPT)

t-value valor *t*, mide el tamaño de la diferencia en relación con la variación en los datos de la muestra

u es la velocidad del viento

V_{cmax} velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco

V_p vapor de agua atmosférica

VPD *vapor pressure deficit*, en español déficit de presión de vapor (DPV)

VPD_{max} *maximum vapor pressure deficit*, en español déficit de presión de vapor máximo

v/v volumen de soluto por cada 100 unidades de volumen de la solución

V_w volumen molal parcial del agua en la atmósfera

W es el flujo másico de aire que entra en la cámara

wa fracciones mol de vapor de agua en el aire circundante a la hoja

wi fracciones mol de vapor de agua dentro de la hoja

WI *water index*, en español índice de agua o hídrico

WUE eficiencia en el uso del agua

α ángulo cenital de la superficie

Γ* punto de compensación de CO₂ cloroplástico en ausencia de respiración mitocondrial

δ declinación

ϵ_l es la emisividad de onda larga de la hoja

λ latitud

σ es la constante de Stefan-Boltzmann

ϕ_{PSII} eficiencia real del fotosistema II

ϕ_{exc} eficiencia intrínseca del fotosistema II

χ acimut de la superficie

Ψ potencial hídrico

Ψ_{MD} potencial hídrico a mediodía

Ψ_{PD} potencial hídrico antes del amanecer

CAPÍTULO 1

Introducción General, Objetivos y Estructura de la Tesis

1.1. Introducción General

1.1.1. El clima Mediterráneo

El clima Mediterráneo se caracteriza por veranos cálidos y secos, e inviernos fríos (Lionello *et al.* 2006; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017), presentando más del 50% de las precipitaciones durante la estación invernal y menos del 20% durante la estación estival (Deitch *et al.* 2017; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017). Esta coincidencia de las temperaturas máximas con las precipitaciones mínimas produce la característica aridez estival del clima Mediterráneo (Walter 1985; Breckle 2002; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017), entendida como el lapso de tiempo en el que los valores de temperatura están por encima de los de precipitación en un diagrama ombrotérmico de tipo Gaussen (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017) como se muestra en la **Figura 1.1**.

Cabe destacar de las precipitaciones mediterráneas estivales que las mas comunes son las tormentas de corta duración, siendo hasta el 100% de la lluvia caída durante julio y agosto (Mosmann *et al.*, 2004). Dentro de este tipo de precipitaciones, las tormentas de verano de alta intensidad podrían aportar agua no disponible para las raíces de las plantas debido a la escorrentía, mientras que las tormentas de baja precipitación (por debajo de 1 mm), que suponen el 54% de la precipitación total de verano (<http://www.aemet.es>), se consideran insignificantes en términos de balance hídrico del suelo (Allen *et al.*, 2000).

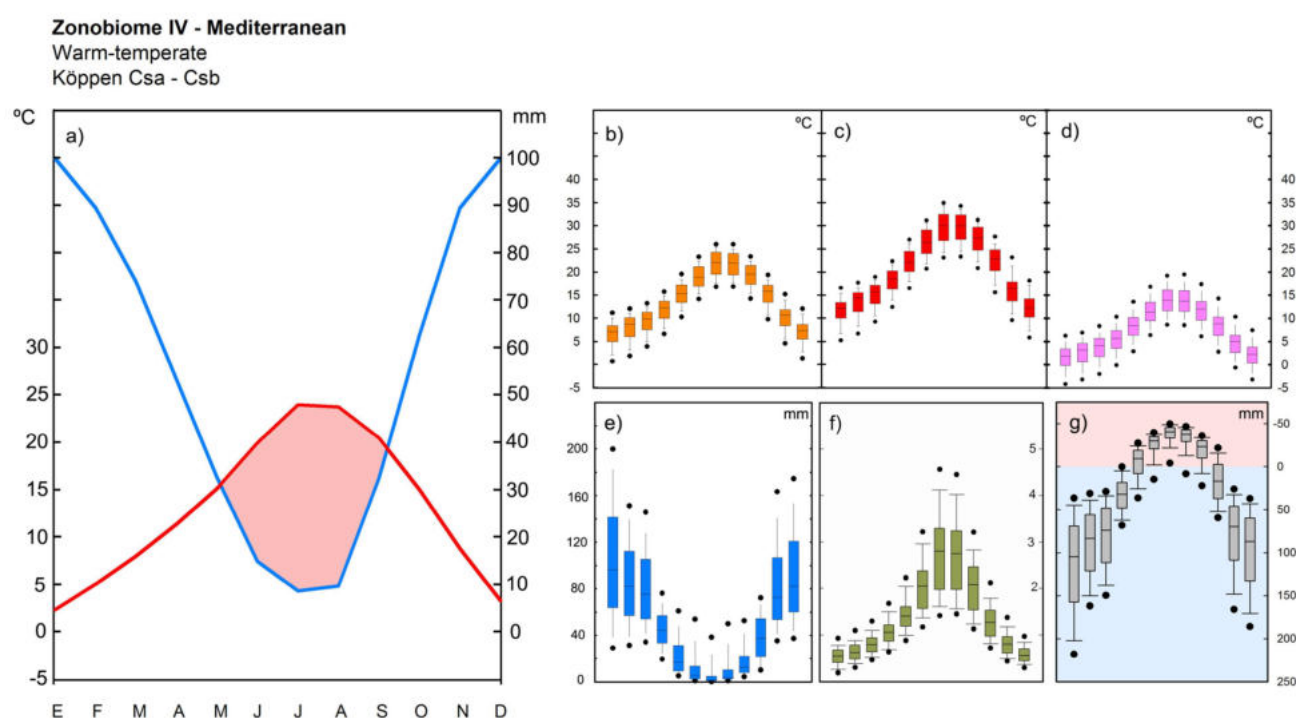


Figura 1.1 Clima típico de tipo mediterráneo (hemisferio norte) con veranos cálidos y secos e inviernos suaves y lluviosos (a), donde se muestran las precipitaciones (P en mm, color azul) y las temperaturas (T en °C, color rojo). b, c y d muestran los valores de temperatura media, máxima y mínima mensual, respectivamente. e y f muestran la precipitación mensual y el déficit de presión de vapor (DPV, en inglés *vapor pressure deficit*, VPD), respectivamente. g muestra la diferencia entre 2P y T, que indica aridez (área rosa) según Gaussen. Figura obtenida de Gil-Pelegrín *et al.*, 2017.

Las regiones bajo climas de tipo mediterráneo representan una proporción relativamente pequeña de las áreas continentales del mundo, si se compara con otro tipo de climas, y aparecen fragmentadas en diferentes territorios de los hemisferios norte y sur (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017). A su vez, se encuentran ubicadas en la cara occidental de los continentes en ambos hemisferios entre los 30° y 40° de latitud (Lionello *et al.*, 2006; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017). En concreto, se pueden encontrar climas de tipo mediterráneo en i) las regiones de Europa, África y Asia que rodean la cuenca del Mediterráneo (excluyendo Egipto, Libia y la mayor parte de Túnez) y que se extienden hasta el sur de Turquía y el norte de Siria; ii) la costa del Pacífico de América del Norte, que se extiende por el estado de California en EE.UU. y Nueva California en México; iii) la costa central de Chile; iv) una amplia zona del oeste y el sur de Australia; y v) la región del Cabo en Sudáfrica (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017).

Las zonas donde se presenta este clima constituyen el límite entre las latitudes templadas y tropicales, donde el desplazamiento de las células de altas presiones subtropicales hacia latitudes más altas durante el verano provoca la estabilidad atmosférica y, como consecuencia, la ausencia de precipitaciones (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017). Así, las variaciones en i) la distribución temporal de las precipitaciones, ii) la duración del periodo de aridez, iii) la amplitud térmica anual o iv) la frecuencia de los eventos extremos, producen a su vez una gran variedad de ambientes, y como consecuencia, estas regiones son ecotonos con una rica biodiversidad (Cowling *et al.*, 1996).

Al mismo tiempo, la Cuenca Mediterránea es la región de clima Mediterráneo con un régimen climático más heterogéneo, causado, por un lado, por los siguientes factores geográficos que modifican a los patrones atmosféricos del clima mediterráneo: i) la irregularidad orográfica por las grandes diferencias de altitud entre la montaña y el valle, ii) la proximidad a las masas de agua marina y iii) la exposición a los vientos del Este (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017). Por otro lado, por las siguientes combinaciones: i) la posibilidad de un segundo mínimo de precipitación, pero en este caso en invierno (Cuadrat *et al.*, 2007; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017), al generarse anticiclones térmicos en el interior de los continentes durante el invierno (Wallen 1970; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017), ii) frentes de aire húmedo procedentes del Atlántico en primavera por la desaparición de la influencia de las altas presiones, y iii) abundantes precipitaciones en las zonas costeras de la Cuenca Mediterránea, tras la época estival, por la fuerte actividad ciclónica y las altas temperaturas alcanzadas por la masa del agua al final del verano. Esta heterogeneidad climática, a la vez, se ve afectada por los patrones atmosféricos de escala global: i) Oscilación del Atlántico Norte (OAN, en inglés *North Atlantic Oscillation*, NAO) modificando las precipitaciones invernales en la zona occidental (Hurrell *et al.*, 2004; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017), ii) Patrón del Atlántico Oriental (PAO, en inglés *East Atlantic*, EA) causando anomalías en las precipitaciones de las zonas orientales (Krichak y Alpert, 2005; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017), y iii) El Niño-Oscilación del Sur (ENOS, en inglés *El Niño-Southern Oscillation*, ENSO) influyendo en las precipitaciones invernales de la zona oriental (Pozo-Vázquez *et al.*, 2001; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017).

1.1.2. La encina (*Quercus ilex* L.): arquetipo de árbol mediterráneo resistente a la aridez estival

En la Cuenca Mediterránea, la encina (*Quercus ilex* L.) es una de las especies vegetales características por su extensión y por su abundancia, siendo identificada como una especie paradigmática del clima mediterráneo (Figura 1.2, Martín-Sánchez *et al.*, 2022), definiendo el Zonobioma IV o Zonobioma de los bosques esclerófilos (Walter, 1985) al generar paisajes característicos de un alto valor ecológico en dicho entorno. Los bosques con *Quercus ilex* tienen su máxima expresión en el Mediterráneo occidental (Breckle, 2002), a partir de la cual presenta diferentes transiciones, i) hacia Oriente Medio, es sustituido por *Quercus calliprinos*

Webb en hábitats costeros y más suaves (Barbero *et al.*, 1992); ii) hacia el Zonobioma VI o "Zonobioma de los bosques caducifolios" (menor aridez y menor temperatura media anual) es sustituido por especies submediterráneas de hoja caduca de invierno como *Quercus faginea* Lam. y *Quercus pyrenaica* Willd. en el Mediterráneo Occidental, o *Quercus cerris* L. y *Quercus frainetto* Ten. en el Mediterráneo Oriental; iii) hacia climas templados, (donde la sequía estival desaparece) es sustituido por *Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. o *Fagus sylvatica* L.; iv) hacia el Zonobioma III o "Zonobioma de los Desiertos Calientes" (aumento de aridez), donde se encuentran los desiertos y las zonas semiáridas, es sustituido por *Quercus coccifera* L.; v) hacia el Zonobioma VII o "Zonobioma de las Estepas y Desiertos Fríos" (temperatura media anual disminuye pero se mantiene la pluviometría media), es sustituido en las zonas interiores de la Península Ibérica por *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. (clasificándose como una especie aparte *Quercus rotundifolia* Lam. Encycl. 1: 723 (1785)) y en la parte oriental sustituida por *Quercus baloot* Griff. (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017).

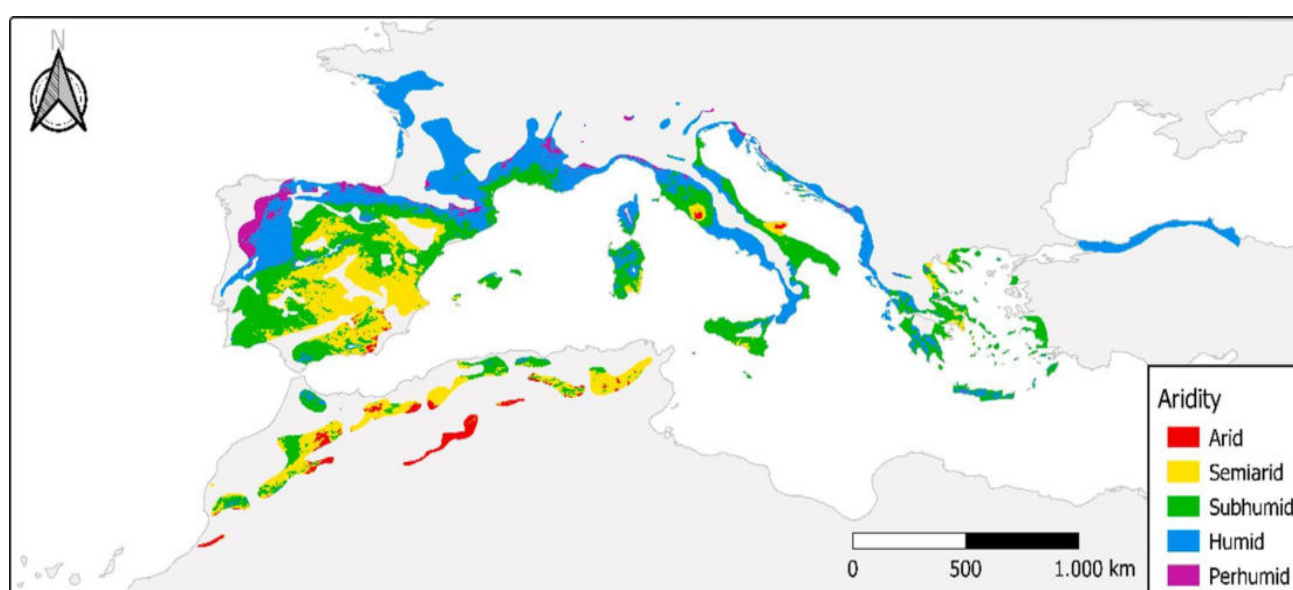


Figura 1.2 Índice de aridez del área de distribución de *Quercus ilex* calculado según el índice de Emberger (Emberger, 1930). La información sobre la distribución fue tomada de EUFORGEN (Programa Europeo de Recursos Genéticos Forestales, <http://www.euforgen.org/>) y modificada según el mapa de procedencias de *Quercus ilex* en la Península Ibérica (MITECO, <https://www.miteco.gob.es>) y el proyecto de investigación "Climatic Modelling of Distribution Ranges of Plant Species" de la Martin-Lu-University Halle-Wittenberg (2006). Figura obtenida de Martín-Sánchez *et al.*, 2022.

Una de las razones que pueden justificar la abundante presencia de la encina en la cuenca mediterránea es su fuerte resistencia al estrés hídrico estival y al estrés térmico invernal. El estrés hídrico estival, sobre el que se centra la presente Tesis, presenta una doble componente de manera simultánea en el clima mediterráneo: por un lado la sequía atmosférica coincidiendo con el máximo déficit de presión de vapor de agua (DPV, en inglés *vapor pressure deficit*, VPD) anual, y por otro lado la sequía edáfica coincidiendo con los valores mínimos de potencial hídrico (Ψ) en el suelo, representando ambos a los extremos del gradiente hidráulico en el comportamiento ecofisiológico de la planta, según el modelo "continuo suelo-planta-atmósfera" (Gil-Pelegrín *et al.*, 2005), que permite modelizar el complejo funcionamiento de las relaciones hídricas de un vegetal de una manera relativamente sencilla.

1.1.3. El modelo continuo suelo-planta-atmósfera: flujo del agua

El modelo continuo suelo-planta-atmósfera (CSPA, en inglés *Soil-Plant-Atmosphere Continuum*, SPAC) analiza el flujo de agua en los vegetales terrestres como un proceso dinámico desde la fuente (suelo) hasta el sumidero final (atmósfera). Así, el flujo de agua a través del vegetal es directamente proporcional al gradiente de potencial entre los extremos e inversamente proporcional a la suma de resistencias que a lo largo del camino limitan el libre movimiento del agua (Huber, 1928; Van der Honert, 1948). **Figura 1.3.**

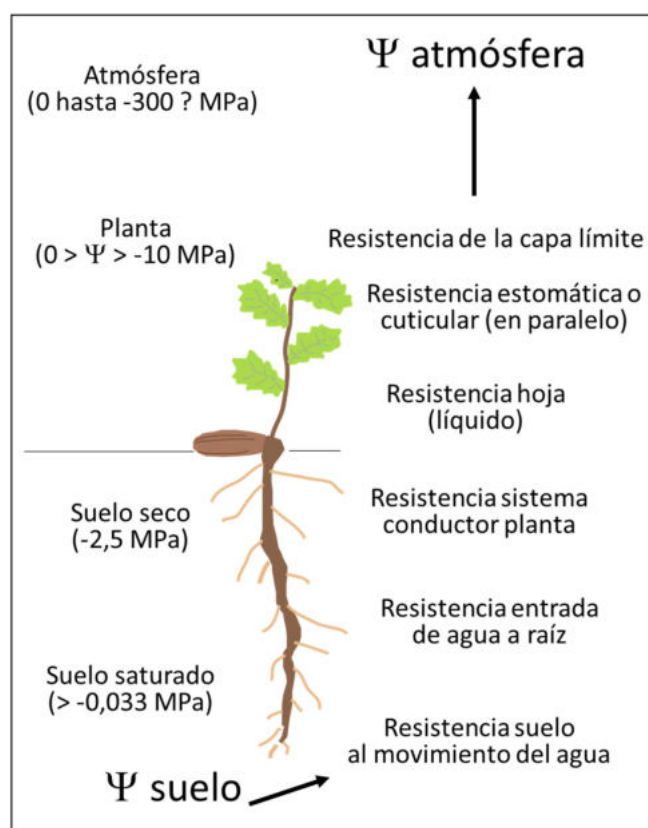


Figura 1.3 Esquema del continuo suelo-planta-atmósfera. Figura tomada de Gil-Pelegrín *et al.*, 2005

En la parte suelo del modelo SPAC, el movimiento del agua viene definido por, i) la conductividad hidráulica del suelo (constante de proporcionalidad, K), ii) la porosidad total, iii) la distribución del tamaño de los poros, iv) y el grado de saturación en agua del suelo (contenido volumétrico del agua) y su estado energético o potencial hídrico (Ψ) (Rundell y Jarrell, 1991). Sin embargo los parámetros más significativos en climas con estrés hídrico edáfico moderado o severo son K y Ψ (Gil-Pelegrín *et al.*, 2005).

Las estrategias que utiliza la planta según este modelo para regular la resistencia al flujo hidráulico, se pueden diferenciar por un lado, las que tienen lugar en las raíces, por otro lado en el tallo y por último en la hoja. Es en el tallo y, sobre todo, en la hoja donde más se incide en la Tesis.

En el sistema radicular se acepta la influencia de i) el propio desarrollo radicular de la planta (Gil-Pelegrín *et al.*, 2005), ii) la regulación de la entrada del agua a través de la raíz, mediante micorrización desarrollando un manto que recubre la raíz (Nardini *et al.*, 2000), iii) la resistencia de la raíz al flujo radial, por un lado las barreras simplásmicas, y por otro, las barreras apoplásmicas (Schreiber *et al.*, 1999), siendo estas la causa de la suberificación de la raíz frente a sequía edáfica (North y Nobel, 1991), iv) la resistencia de la raíz al flujo axial, en el que el sistema vascular xilemático constituido por los vasos (de mayor diámetro que las

traqueidas) y las traqueidas, donde las conexiones mediante paredes no perforadas, limita la eficacia del transporte, y donde la anatomía del vaso permite mayores flujos que las traqueidas (Comstock y Sperry, 2000).

En el tallo se considera, en general, la cantidad de área de xilema producida por el vegetal, condicionado por i) la anatomía propia de vasos y traqueidas (Nobel, 1983; Zimmermann, 1983; Pallardy 1989), ii) la filogenia, procesos de división y diferenciación celular de los elementos que conforman el tejido conductor, iii) la formación de anillos anuales de crecimiento en leñosas bajo estacionalidad climática (Gil-Pelegrín *et al.*, 2005), iv) discontinuidad por vía xilemática, mediante la entrada de burbuja de aire desplazando el líquido del conducto (cavitación), pudiendo llegar a ocupar dicho conducto por aire a presión atmosférica (embolia) siendo los conductos de mayor diámetro más susceptibles de sufrir dicho proceso, causando que los conductos de la primavera precedente (vasos) no sean funcionales y los conductos de verano precedente (traqueidas) permanezcan funcionales (Gil-Pelegrín *et al.*, 2005).

Para el elemento foliar, que es el componente del modelo SPAC donde más se incide en esta tesis, hay que tener en cuenta los siguientes factores: i) superficie foliar que debe ser abastecida por el xilema, conductividad específica foliar (CEF, en inglés *Leaf-Specific hydraulic Conductance*, LSC) (Tyree y Ewers, 1991), ii) el sistema de nervios de la hoja (Nardini *et al.*, 2003), iii) flujo no vascular del agua líquida por la hoja hasta su llegada al mesófilo (Yang y Tyree, 1993), regulados por la permeabilidad y difusión de los distintos compartimentos que conforman la célula (Tyree y Cheung, 1977), iv) cambio de fase del agua, de líquida a gaseosa, a través de las paredes celulares limitantes con los espacios intercelulares del mesófilo (Larcher, 1995) y a través de la cutícula (Schönherr y Schmidt, 1979), v) la regulación de la conductancia estomática (g_s), bien en ciclos diarios, bien en ciclos de sequía (Sperry, 2004; Brodribb y Holbrook, 2004), vi) cutícula que, aun cuando los estomas están cerrados, permite un flujo denominado transpiración residual (Gil-Pelegrín, 1993), y vii) espesor de la capa límite (Martín *et al.*, 1999), capa de aire en régimen laminar que rodea la hoja a través de la que los intercambios se realizan mediante difusión (Nobel, 1983)

Y por último, se encuentra la atmósfera como sumidero final, en la que el agua se encontrará en forma de vapor, midiéndose su abundancia en forma de presión de vapor de agua (e_a). Se denominará presión de vapor a saturación (e_{sat}) a la medida obtenida, considerando el agua un gas ideal, en una atmósfera confinada y en contacto con una superficie de agua pura en un equilibrio líquido-vapor, dicho equilibrio variará en función de la temperatura (**Figura 1.4A**) (Nobel, 1983). La diferencia entre e_a y e_{sat} , para una determinada temperatura, se denomina déficit de presión de vapor siendo un buen indicador del gradiente de presión del modelo SPAC en estudios relacionados con la transpiración (Gil-Pelegrín, 1993). A su vez la humedad relativa (HR, en inglés *relative humidity*, RH) se puede definir mediante la ratio e_a/e_{sat} . Y por último, del mismo modo que para el resto de compartimentos del modelo SPAC, se puede calcular el estado energético del agua en la atmósfera en términos de potencial hídrico (Ψ), el cual puede llegar a valores de -100 MPa, no alcanzables en suelo o planta. Estos dos parámetros (Ψ y HR) se pueden relacionar (**Figura 1.4B**) mediante la siguiente fórmula (Slavik, 1974, Nobel, 1983):

$$\Psi = \frac{RT}{V_w} \ln \left(\frac{RH\%}{100} \right)$$

En la que R es la constante universal de los gases ($8,3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T la temperatura absoluta (medida en K), V_w el volumen molar parcial del agua en la atmósfera ($1.805 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ a 20°C) y HR es la humedad relativa (%).

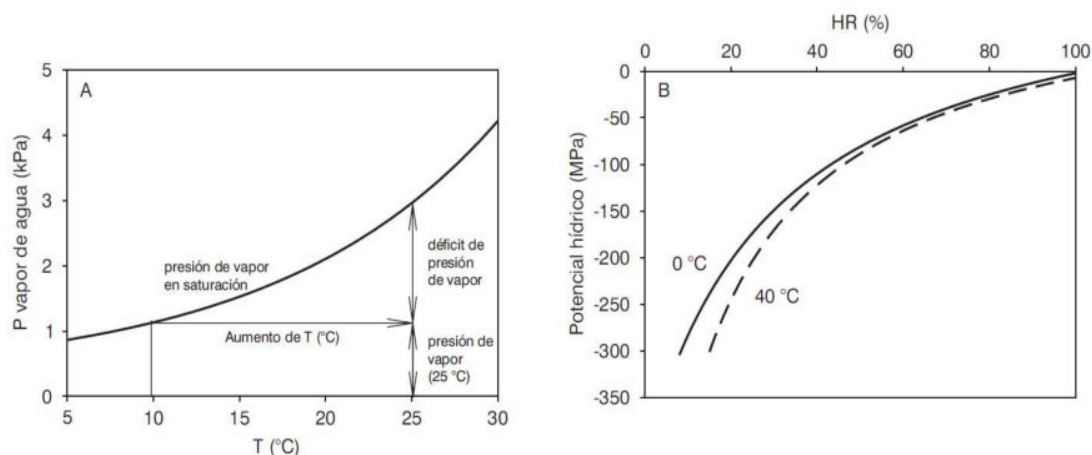


Figura 1.4 (A) Relación entre la presión de vapor de agua en la atmósfera y la temperatura. (B) Relación entre el potencial hídrico del aire y su Humedad Relativa (%). Las curvas a 0°C y 40°C pretenden ilustrar el escaso efecto de la temperatura en esta relación. Figura tomada de Gil-Pelegri *et al.*, 2005.

1.1.4. Estrategias frente al estrés hídrico y térmico: Cavitación y Fotoprotección

Introducido mediante los párrafos anteriores el doble estrés hídrico de la encina bajo el clima mediterráneo, y viendo su influencia general en la planta gracias el modelo SPAC, es el momento de analizar los efectos del estrés estival en la funcionalidad de la planta y resaltar las estrategias desarrolladas por esta especie para hacer frente a la sequía y a las temperaturas extremas mediante los mecanismos en los que se centra la presente Tesis: i/ la resistencia del xilema a la cavitación y ii/ la fotoprotección a nivel celular y foliar. (**Figura 1.5**)

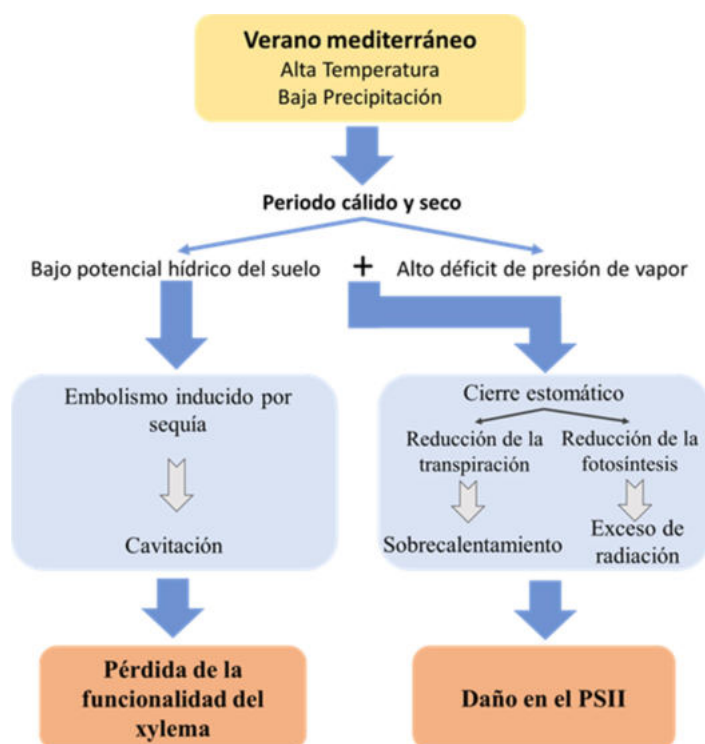


Figura 1.5 Representación esquemática de los efectos del estrés estival en la funcionalidad de la planta. Figura obtenida y traducida de Martín-Sánchez *et al.*, 2022.

1.1.4.1. Resistencia del xilema a la cavitación en *Quercus ilex*

Respecto a la resistencia del xilema a la cavitación, se ha observado que la encina presenta un alto grado de variación intraespecífica en los valores de potencial hídrico del tallo que inducen una pérdida de conductividad del 50% (P_{50}) y del 80% (P_{80}), muy similar al encontrado para una muestra representativa de todo el género (**Figura 1.6**). Sin embargo, hay que destacar que la encina en promedio es más resistente a la cavitación que el conjunto de las especies del género, también si consideramos ambas subespecies por separado (*Q. ilex* subsp. *ballota* y *Q. ilex* subsp. *ilex*) (**Figura 1.6**) (Martín-Sánchez *et al.*, 2022). La elevada variabilidad intraespecífica de la vulnerabilidad del xilema a la cavitación en la encina se puede explicar a través de la capacidad de aclimatación de las plantas a las condiciones ambientales existentes en cada localización de la especie (Cochard *et al.*, 1997). Y por otro lado, la resistencia a la cavitación también puede ajustarse a la cantidad de sequía experimentada in situ (Hacke *et al.*, 2000).

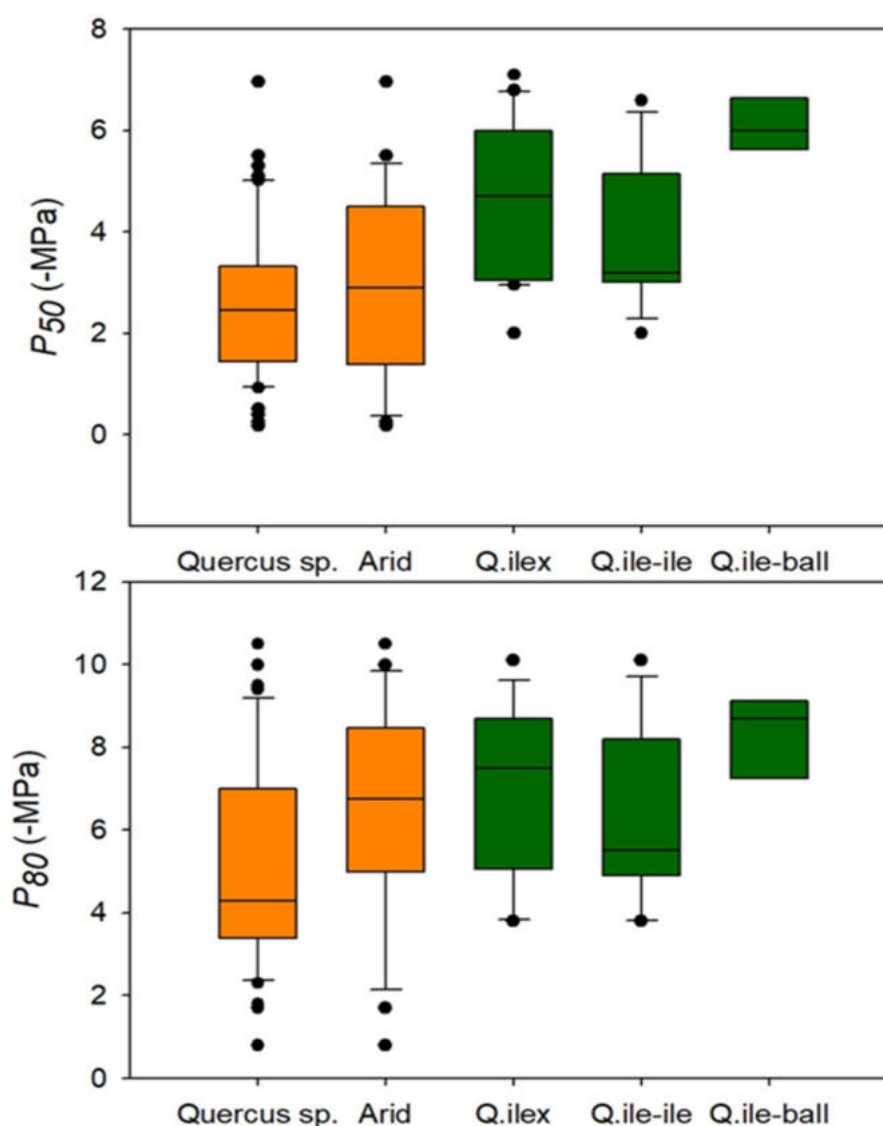


Figura 1.6 BoX-plots del potencial hídrico del tallo a una pérdida de conductividad del 50% (P_{50}) (gráfico superior) y del 80% (P_{80}) (gráfico inferior) para 24 especies de *Quercus* (*Quercus* sp., $n = 67$, en naranja), de las cuales 13 especies ocupan zonas áridas (Arid, $n = 42$, en naranja), además de *Q. ilex* ($n = 19$) como especie única, y distinguiendo entre ambas subespecies: *Q. ilex* subsp. *ilex* y *Q. ilex* subsp. *ballota* (en verde). Figura obtenida de Martín-Sánchez *et al.*, 2022.

Un concepto importante que hay que considerar cuando hablamos de la resistencia al estrés hídrico es el denominado “margen de seguridad”, bien entendido como, la diferencia entre el potencial hídrico del suelo que induce el cierre estomático (es decir, el punto de pérdida de turgencia, PPT, en inglés *turgor loss point*, TLP) y P_{50} (Brodribb y Hill, 1999), o bien entendido como, la diferencia entre el potencial hídrico mínimo experimentado por el árbol en el campo durante la estación seca y el potencial hídrico que induce el 12%, 50% y 88% de pérdida de conductividad hidráulica (Meinzer *et al.*, 2009). En este sentido, la subespecie *Q. ilex* subsp. *ballota* tiene márgenes de seguridad más altos que la subespecie *Q. ilex* subsp. *ilex* (Martín-Sánchez *et al.*, 2022) como se observa en la **Figura 1.7**.

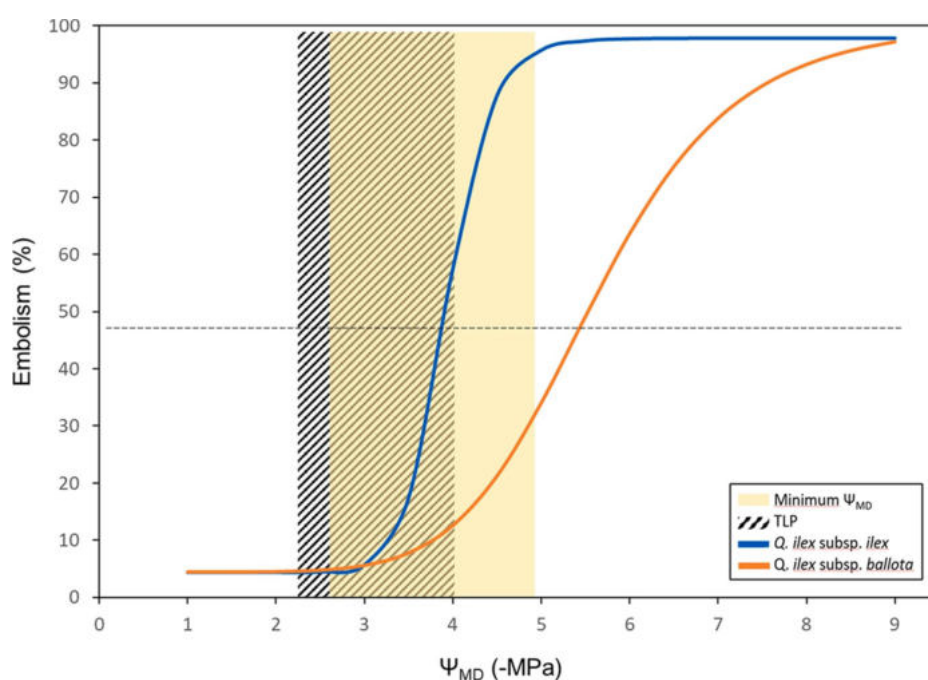


Figura 1.7 Curvas de tipo de embolia de *Q. ilex* subsp. *ilex* (azul) y *Q. ilex* subsp. *ballota* (naranja) y el rango de valores de potenciales hídricos encontrados en la literatura (Tabla A3 de Martín-Sánchez *et al.*, 2022) para los dos criterios de cálculo del margen de seguridad: i) potencial hídrico mínimo medido en el campo a mediodía (Ψ_{MD} , en amarillo, de -2,6 a -4,91 MPa) y ii) punto de pérdida de turgencia (PPT, en inglés *turgor loss point*, TLP, con líneas discontinuas, de -2,23 a -4 MPa). La línea horizontal de puntos representa los valores P_{50} para ambas subespecies. Las curvas tipo para cada subespecie se han extraído de Alonso-Forn *et al.* (2020) para *Q. ilex* subsp. *ballota* y de datos no publicados para *Q. ilex* subsp. *ilex* (Martín-Sánchez *et al.*, 2022). Figura obtenida de Martín-Sánchez *et al.*, 2022.

Cerrando el aspecto de la resistencia del xilema a la cavitación, no solo depende de la vulnerabilidad del tallo, sino que también está relacionada con la capacidad de otros órganos de la planta para soportar la embolia del xilema (Skelton *et al.*, 2018). Así, Hochberg *et al.*, 2017, definen la "segmentación de la vulnerabilidad" al hecho de que los órganos más prescindibles, como por ejemplo las hojas, son más vulnerables a la cavitación, que los más importantes, como por ejemplo el tallo. Sin embargo, en la encina no se ven evidencias de segmentación a la vulnerabilidad, mostrando una alta resistencia a la cavitación inducida por la sequía tanto en las hojas como en el tallo (Martín-Sánchez *et al.*, 2022), lo cual, podría estar relacionado con la mayor duración de las hojas, que le permite así, asimilar el carbono durante más de un periodo vegetativo (Corcuera *et al.*, 2005).

1.1.4.2. Mecanismos de fotoprotección en *Quercus ilex*

El descenso en el potencial hídrico del suelo promueve el cierre estomático en la encina, minimizando el consumo de agua a expensas de reducir su actividad fotosintética (Acherar y Rambal, 1992; Mediavilla y Escudero, 2003, 2004; Peguero-Pina *et al.*, 2009; Alonso-Forn *et al.*, 2021, Capítulo 2 de la presente Tesis). Este hecho le permite soportar periodos de sequía severa con potenciales hídricos foliares inferiores a los que inducen el cierre estomático, pero muy superiores al límite de cavitación (presentando un amplio margen de seguridad hidráulica, según Martin-StPaul *et al.*, 2017).

A su vez, en el clima mediterráneo, el verano presenta una combinación de altas temperaturas junto con una baja humedad del aire, causando un aumento del déficit de presión de vapor de agua, por lo que su atmósfera tiene una mayor demanda evaporativa. Ante este escenario, la encina mantendrá una estrategia conservadora o ahorradora de agua (Levitt, 1980; Mediavilla y Escudero, 2003) mediante cierre estomático, aun cuando haya disponibilidad de agua en el suelo, presentando una reducción significativa de la conductancia estomática a aproximadamente a 2,0 kPa. Ya que cuando abre los estomas en esta atmósfera de alta demanda evaporativa, la tasa de transpiración estomática a su vez es muy alta y por tanto las pérdidas de agua también lo son. Además mediante esta estrategia evita daños irreversibles a nivel foliar para conservar las hojas (perennes) en el mejor estado fisiológico posible durante su vida (Mediavilla y Escudero, 2003).

La implementación de mecanismos de fotoprotección a escala foliar es una de las estrategias que desarrolla la encina para soportar el estrés hídrico y las altas temperaturas que experimenta durante el verano. En este sentido, junto con la gran resistencia a la cavitación por estrés hídrico en la hoja, la encina tiene un comportamiento conservador a escala foliar, desarrollando estrategias que mejoran la resistencia a la sequía a nivel celular.

Una de las estrategias que desarrolla la encina para mejorar la resistencia a nivel celular es contener el colapso de las células bajo potenciales hídricos negativos. El estrés hídrico puede llegar a colapsar las células, como consecuencia del daño físico de la membrana celular durante la deshidratación celular y la fuga de electrolitos (Farrant, 2000). Martín-Sánchez *et al.* (2022) encontró bajos niveles de desestabilización de la membrana (30%) para $\Psi = -4$ MPa, lo que indica que el alto grado de resistencia al estrés hídrico de este especie a nivel celular.

Como consecuencia de esta cualidad, necesita a su vez mecanismos fotoprotectores, ya que los complejos captadores de luz de ambos fotosistemas continúan recogiendo luz, y la energía de excitación no puede dirigirse a la cadena de transporte de electrones, pudiendo superar la cantidad que se utilizaría para la fotosíntesis debido al cierre estomático (Demmig-Adams y Adams, 2006). Por lo tanto, los electrones no consumidos en la fijación del CO₂ pueden reaccionar con el O₂ generando especies reactivas de oxígeno y aumentando la posibilidad de daño oxidativo (Hernández *et al.*, 2012).

Así algunos de los mecanismos fotoprotectores que ha desarrollado la encina para hacer frente a este cierre estomático y el exceso de energía de excitación son: i) la presencia de tricomas en la superficie adaxial de la hoja, permitiendo la disminución de la susceptibilidad al fotodaño a través del aumento de la reflectancia de la hoja (Morales *et al.*, 2002), ii) la disipación térmica de la energía acumulada mediante el apagado no fotoquímico (en inglés *Non-photochemical quenching*, NPQ) de la fluorescencia de la clorofila, la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (formación de anteraxantina y zeaxantina) (Méthy *et al.*, 1996; Peguero-Pina *et al.*, 2009, García-Plazaola *et al.*, 2017) y la disipación en la antena del fotosistema

II, PSII ($1-\Phi_{exc}$), y iii) disminución de la máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_v/F_m) y de la eficiencia real del fotosistema II (Φ_{PSII}), protegiendo el aparato fotosintético frente al estrés hídrico (Chiatante *et al.*, 2015). Finalmente, el reducido tamaño de la hoja que presenta la encina contribuye a una mayor disipación de energía térmica bajo condiciones de altas temperaturas, que podrían causar daños en el fotosistema II (PSII) (Arnold *et al.*, 2021) pudiendo llegar a ser irreversibles si se supera su temperatura crítica.

1.1.5. La encina (*Quercus ilex* L.): hospedador de *Tuber melanosporum* Vittad.

Además de su importancia paisajística, la encina tiene un importante valor económico por su capacidad de simbiosis con la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.), siendo la especie más utilizada como planta micorrizada para la implantación de explotaciones truferas. En el arco mediterráneo, el cultivo y la recolección de diferentes especies de hongos (hipogeos y epigeos) ha contribuido de manera esencial al asentamiento de la población y al establecimiento del tejido social de extensas zonas del territorio. En este sentido, el cultivo de trufa negra en regiones desfavorecidas ha supuesto una nueva fuente de recursos, con una creciente importancia económica y social en diversas áreas rurales de España con un alto grado de despoblación y un escaso desarrollo del tejido industrial. En estas áreas, donde los rendimientos de cereal no suelen llegar a unos mínimos aceptables, el cultivo de la trufa constituye un motor de desarrollo económico sostenible. Además de su beneficio directo, la comercialización de la trufa tiene efectos económicos positivos sobre otras empresas relacionadas con el sector, desde viveros productores de planta micorrizada, empresas especializadas en sistemas de riego, empresas transformadoras o relacionadas con el ámbito de la restauración y turismo rural (Büntgen *et al.*, 2015).

Según estimaciones obtenidas de diferentes fuentes (Bonet *et al.*, 2009; Reyna y García-Barreda, 2014) la cantidad de trufa comercializada desde Aragón se aproxima a las 40 toneladas/año, lo que en valor económico (con un precio medio entre 350 y 500 €/kg, según la campaña) puede llegar a significar entre 15 y 22 millones de euros. En España se considera que se produce más del 50% de la trufa comercializada en el mundo. En Aragón el cultivo de la trufa negra ocupa unas 10.000 ha, con una tendencia creciente durante los últimos años (Reyna, 2012). En este sentido, estudios recientes indican que hasta 625.353 ha en Aragón son óptimas para este fin (Barriuso *et al.*, 2014a,b; Serrano-Notivoli *et al.*, 2015).

La truficultura tiene un marcado carácter multifuncional (Reyna y García-Barreda, 2014; Büntgen *et al.*, 2015). La forestación de tierras agrícolas con bajos rendimientos en cereal o en barbecho permanente mediante plantas micorrizadas con trufa negra ofrece una opción agronómica sostenible, impulsando además la conservación de la biodiversidad a través de la expansión de encinares (*Quercus ilex* L.) y quejigares (*Quercus faginea* Lam.). Todavía son muchas las incógnitas que rodean a la trufa y, especialmente, a su cultivo. A pesar de los esfuerzos en investigación realizados por diferentes equipos muy consolidados en truficultura (Domínguez-Núñez *et al.*, 2009; Olivera *et al.*, 2011, 2014), hace falta un incremento de los conocimientos que ayuden a estabilizar la producción de las plantaciones truferas.

La mayor parte de las parcelas con potencial capacidad productora de trufa suelen asentarse en zonas donde las precipitaciones no son muy abundantes y sobre suelos muy degradados con poca capacidad de retención de agua. Por este motivo, el riego es una labor básica a realizar en las parcelas si se pretende obtener una cosecha continua y homogénea, sin tener que depender de unas precipitaciones cada vez más escasas y desigualmente repartidas en el tiempo. En este sentido, en un estudio realizado sobre un elevado número de ejemplares de encina micorrizada con *Tuber melanosporum* en la provincia de Soria, Büntgen *et al.* (2015) concluyen que el riego de las plantaciones es la única forma de contrarrestar el decaimiento de las truferas

naturales atribuible a los efectos del incremento de la sequía en el área mediterránea. Por lo tanto, el conocimiento de las necesidades de riego del árbol, tanto en relación a la cantidad como al momento de realizar los aportes hídricos, es crítico para alcanzar niveles de rentabilidad en las plantaciones para atender los mercados nacionales e internacionales.

1.1.6. El cambio climático y la fragilidad del clima Mediterráneo

Este escenario mediterráneo, donde uno de sus elementos característicos es la encina, se está viendo afectado por el cambio climático causado por el calentamiento global que sufre el planeta, frente al cual, el Acuerdo de París de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC) de diciembre de 2015 tiene como objetivo *“mantener el aumento de la temperatura media global por debajo de 2 °C por encima de los niveles preindustriales y continuar los esfuerzos para limitar el aumento de la temperatura a 1,5 °C...”* (Guiot y Cramer, 2016)

Al considerar dichos valores del calentamiento global, la diferencia entre alcanzar 1.5 °C o superar 2 °C, por encima de los niveles preindustriales, tiene una importancia crítica para las políticas de adaptación en la región mediterránea, especialmente en lo referente a la ordenación del territorio y la conservación de la biodiversidad. Esto se debe, a que alcanzar el objetivo global de 2 °C implicaría temperaturas promedio sustancialmente más altas, con máximos diarios que alcanzan valores extremos, para muchas regiones del mundo. Así, las temperaturas regionales en la cuenca del Mediterráneo son ahora ~ 1.3 °C más altas que durante 1880-1920, en comparación con un aumento de ~ 0.85 °C en todo el mundo (**Figura 1.8**).

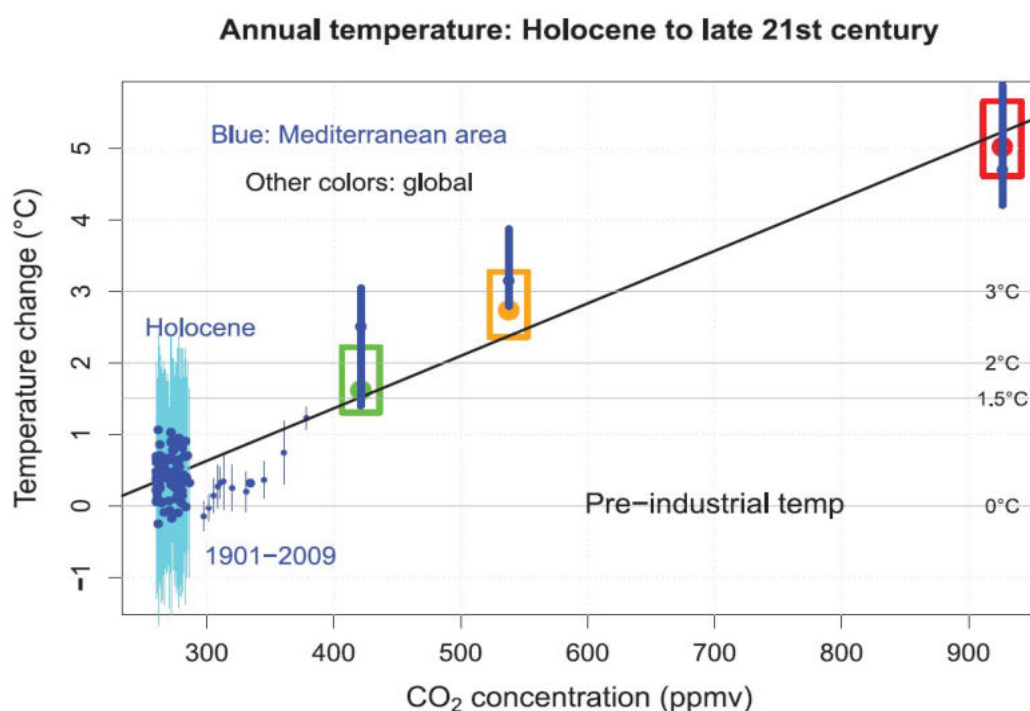


Figura 1.8 Cambio anual de la temperatura (respecto a la media preindustrial) frente a las concentraciones atmosféricas de CO₂ (expresadas en ppmv, partes por millón de volumen). Los recuadros de color representan los escenarios según la proyección teórica de las Trayectorias de Concentración Representativas (TCR, en inglés *Representative Concentration Pathway*, RCP) del Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático para 2010-2100 (percentiles 25, 50 y 75): TCR2.5 (verde), TCR4.5 (naranja) y TCR8.5 (rojo). Los círculos azules sólidos con barras verticales se refieren a los mismos tres escenarios para la región

mediterránea (10°O a 45°E, 28°N a 48°N). Para el Holoceno, los círculos azules con barras de error cian (1s) se derivan de reconstrucciones climáticas a partir de polen para cada siglo desde 10.000 hasta 100 años a.C. por pasos de 100 años (Guiot y Kaniewski, 2015) (la variabilidad se multiplica por un factor de 3 para tener en cuenta que la resolución temporal es de 100 años en lugar de medias de 10 años para los escenarios). Las barras verticales representan las DE (Desviación Estándar) de ± 1 proporcionadas por el método de reconstrucción. Los círculos de tamaño medio de 1901-2009 son las observaciones cuadrículadas de la Unidad de Investigación Climática TS3.1 (Harris *et al.*, 2014) promediadas en la misma zona y suavizadas con un paso de tiempo de 10 años. Las barras verticales representan las correspondientes DE. Las líneas horizontales indican la temperatura media preindustrial y los tres umbrales mencionados en el Acuerdo de París (1,5°, 2° y 3°C). La línea de regresión negra se basa en los tres escenarios globales. (Figura obtenida de Guiot y Cramer, 2016)

El análisis de las temperaturas medias anuales, bajo distintos aumentos de diferentes gases de efecto invernadero, mediante modelos climáticos a escala global y mediterránea, produciendo una serie de tiempo observacional y una reconstrucción histórico espacio-temporal a escala mediterránea (**Figura 1.8**) indican que (i) el calentamiento proyectado en la cuenca mediterránea supera la tendencia global para la mayoría de las simulaciones; (ii) la primera década del siglo XXI ya ha superado la variabilidad de la temperatura del Holoceno; (iii) el calentamiento global, pero también el calentamiento regional, es aproximadamente una función lineal de la concentración de CO₂; y (iv) sólo unas pocas simulaciones proporcionan un calentamiento global inferior a 2 °C a fines del siglo XXI.

De estos análisis se deduce que durante el Holoceno (especialmente en la segunda mitad de esta época), han ocurrido períodos de déficits de precipitación, pero a diferencia de la situación del siglo XXI, las temperaturas no se elevaron por encima del promedio actual (**Figura 1.8**) (Guiot y Kaniewski, 2015). Estos períodos de déficits de precipitación (~ 6 a, ~ 5.2 a, ~ 4.2 a, ~ 4 a, ~ 3.1 a y ~ 2.9 mil años a.C.) han sido identificados como posibles causas de declives o colapsos en la civilización en la región del Mediterráneo oriental (Weninger *et al.*, 2009; Kaniewski *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2011). El período 1998-2012 fue el más seco de los últimos 500 años (Cook *et al.*, 2016), que coincide con otra gran crisis, aunque los factores sociales han sido probablemente las principales causas de esta crisis (Middleton, 2012; Knapp y Manning, 2016).

Finalmente, estos análisis muestran que, en aproximadamente un siglo, el cambio climático antropogénico sin políticas de mitigación ambiciosas probablemente alterará los ecosistemas en el Mediterráneo de una manera que no tiene precedentes durante los últimos 10 milenios. A pesar de las incertidumbres conocidas en los modelos climáticos, los escenarios de emisiones de gases de efecto invernadero a nivel de los compromisos de los países antes del Acuerdo de París de la CMNUCC probablemente llevarán a la expansión sustancial de los desiertos en gran parte del sur de Europa y el norte de África. Sólo el escenario que corresponde al objetivo de 1,5 °C del Acuerdo de París, permite que los cambios en los ecosistemas permanezcan dentro de los límites experimentados durante el Holoceno (Guiot y Cramer, 2016).

Así, estos efectos expuestos del cambio climático por calentamiento global tienen como consecuencia una modificación del clima mediterráneo, con un aumento del estrés hídrico estival y la aparición de mayores episodios térmicos extremos tanto en las épocas estivales como invernales, afectando de forma directa a la salud de las masas forestales actuales y a la producción económica relacionada con las explotaciones agrícolas.

1.2. Objetivos

En base a todo lo expuesto, la presente tesis doctoral emana de una serie de investigaciones enmarcadas, por un lado, dentro del Programa Estatal de I+D+I Orientada a los Retos de la Sociedad (Reto de Seguridad y Calidad Alimentaria, Actividad Agraria Productiva y Sostenible, Sostenibilidad de los Recursos Naturales e Investigación Marina y Marítima) del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, 2013-2016, con el Proyecto Científico-Técnico de I+D+i “*Aplicación de nuevas tecnologías al desarrollo de sensores para el seguimiento no destructivo del estado hídrico de la encina (*Quercus ilex* L.) en plantaciones truferas*” (RTA2015-00054-C02-01) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), perteneciente al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España.

Por otro lado, dentro de los Programas Estatales de Generación del Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i y de I+d+i Orientada a los Retos de la Sociedad (Área 17 Ciencias agrarias y agroalimentarias, Sub Área de Agricultura y Forestal) de la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) con el Proyecto “*La gestión forestal como herramienta revitalizadora del monte bajo de quercíneas: reactivación de sumideros de carbono y otros servicios ecosistémicos*” (PID2019-106701RR-I00).

Y por último, dentro del Fondo de Inversiones de Teruel (FITE) del Gobierno de Aragón y gobierno de España con el Proyecto “*Análisis de la poda de encinas truferas: Incidencia sobre la capacidad productiva y el consumo de agua*” (FITE-2017-PETRA).

Habiéndose desarrollado dichas investigaciones en la Unidad de Recursos Forestales, la cual, actualmente, forma parte del Departamento de Sistemas Agrícolas, Forestales y Medio Ambiente del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

El objetivo general del presente estudio es profundizar en el conocimiento del comportamiento ecofisiológico de la encina (*Quercus ilex*) frente al estrés hídrico, justificado, como se ha expuesto, por ser un buen indicador de la salud de las masas forestales del entorno mediterráneo frente al cambio climático, debido a su extensión geográfica, su abundancia en dicho entorno y las adaptaciones evolutivas que le confieren resistencia frente al aumento de estreses hídrico y térmico previstos; y por permitir, a su vez, evaluar y mejorar las plantaciones truferas, al estar en relación directa con el sistema productivo de la trufa, y por tanto, tener importantes implicaciones económicas.

Esta profundización se lleva a cabo mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar cómo los factores hidráulicos y no hidráulicos pueden limitar la recuperación de la fotosíntesis de *Quercus ilex*, tras rehidratación después de inducir una pérdida del 50% de la conductividad hidráulica por estrés hídrico en el suelo.
2. Evaluar los efectos y consecuencias de ambos estreses hídricos (atmosférico y edáfico), característicos del clima mediterráneo durante el periodo estival, en el intercambio de gases de *Quercus ilex*.
3. Evaluar el papel que desempeñan los eventos de baja precipitación, característicos del período de sequía estival del clima mediterráneo, en la ecofisiología de *Quercus ilex*.

1.3. Estructura de la memoria de Tesis

En esta memoria de tesis cada capítulo es independiente, presentando las referencias bibliográficas específicas y apéndices de dicho capítulo. El capítulo 1 (Introducción General, Objetivos y Estructura de la Tesis) presenta y contextualiza el clima mediterráneo, realiza una puesta en valor de la especie estudiada, *Quercus ilex*, en dicho escenario, así como el modelo SPAC para comprender las estrategias fisiológicas de la planta para su supervivencia en dicho entorno, relacionándolo con la tendencia que se deduce de las investigaciones sobre el cambio climático. El capítulo finaliza con los objetivos de la tesis y la estructura de la presente memoria. Los capítulos 2, 3, 4 y 5, han sido estructurados en formato de publicación, y tienen su propio resumen, contexto, materiales y métodos, en cada uno de ellos, a su vez, se detallan los objetivos, metodología, resultados, discusiones y conclusiones. Al final de la memoria, en los anexos, se incluyen las copias de los tres trabajos publicados, que se corresponden con los capítulos 2, 3 y 4, y el trabajo en preparación que se corresponde con el capítulo 5 (**Tabla 1.1**). El capítulo 6 sintetiza, mediante una discusión global, los principales resultados obtenidos en cada uno de los capítulos de las presentes investigaciones, y las conclusiones finales a las que se han llegado.

Tabla 1.1 Resultados científicos de la Tesis en forma de artículos científicos en revistas indexadas. En dicha tabla, el Capítulo es el de la presente Tesis con el que se corresponde el artículo, Aceptada es el año en el que se acepta la publicación, Referencia es la referencia completa del artículo, BD es la base de datos de indexación, FI es el factor de impacto, y Q el cuartil.

Capítulo	Aceptada	Referencia	BD	FI	Q
2	2018	Peguero-Pina, J.J., Mendoza-Herrer, O., Gil-Pelegrín, E., Sancho-Knapik, D., 2018. Cavitation limits the recovery of gas exchange after severe drought stress in holm oak (<i>Quercus ilex</i> L.). <i>Forests</i> , 9, 443. https://doi.org/10.3390/f9070443	JCR	2.116	Q1
3	2018	Sancho-Knapik, D., Mendoza-Herrer, Ó., Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., 2018. Chl fluorescence parameters and leaf reflectance indices allow monitoring changes in the physiological status of <i>Quercus ilex</i> L. under progressive water deficit. <i>Forests</i> , 9, 400. https://doi.org/10.3390/f9070400	JCR	2.116	Q1
4	2022	Sancho-Knapik, D., Mendoza-Herrer, Ó, Alonso-Forn, D., Saz, M.A., Martín-Sánchez, R., Dos Santos Silva, J.V., Ogee, J., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., Ferrio, J.P., 2022. Vapor pressure deficit constrains transpiration and photosynthesis in holm oak: A comparison of three methods during summer drought. <i>Agricultural and Forest Meteorology</i> , 327. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109218	JCR	6.424	Q1
5	En preparación	Sancho-Knapik, D., Mendoza-Herrer, Ó, Martín-Sánchez, R., Alonso-Forn, D., Ferrio, J.P., Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., 2023. A low precipitation event drives a recovery of <i>Quercus ilex</i> L. during summer drought stress. <i>Forests</i> .	-	-	-

A continuación se resume brevemente el contenido de los capítulos 2, 3, 4 y 5, que constituyen los resultados experimentales obtenidos durante la realización de la tesis.

El segundo capítulo analiza el papel de la encina (*Quercus ilex* L.) como especie mediterránea que puede soportar una intensa sequía estival gracias a una alta resistencia a la cavitación más allá del cierre estomático. Además de las limitaciones estomáticas, las limitaciones mesofílicas y bioquímicas a la captación de CO₂ también podrían aumentar en la encina bajo sequía. Este es el primer estudio que aborda cómo los factores hidráulicos y no hidráulicos pueden limitar la recuperación de la fotosíntesis tras la rehidratación después de inducir una pérdida del 50% de la conductividad hidráulica por estrés hídrico.

El tercer capítulo plantea que las sequías extremas y los eventos de calor, producidos frecuentemente en los climas mediterráneos, inducen anomalías en los flujos de CO₂ ecosistema-atmósfera. Para mitigar las consecuencias sobre los bosques y la agricultura, los gestores deben tener un mejor conocimiento del ecosistema mediante el seguimiento del estado de las plantas. El estado hídrico se observa comúnmente midiendo el potencial hídrico, pero cuando el evento extremo ha terminado, este parámetro no puede mostrar a los gestores la recuperación de otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis. Para abordar este problema, se ha evaluado el estado hídrico y la capacidad fotosintética de *Quercus ilex* L. a lo largo de un evento intenso de estrés hídrico y una posterior rehidratación.

El cuarto capítulo, registra cómo las altas tasas de VPD pueden disminuir gravemente la productividad de las plantas al reducir la conductancia estomática, lo que podría agravarse durante los periodos estivales en climas mediterráneos debido al déficit hídrico del suelo. En este estudio, se monitoriza la respuesta de *Quercus ilex*, a los cambios en VPD durante el verano para evaluar los efectos y consecuencias de ambos estreses hídricos (atmosférico y edáfico) en el intercambio de gases. Para ello se realizaron mediciones en árboles de una plantación trufera experimental durante dos veranos consecutivos con déficit hídrico moderado, utilizando tres métodos diferentes: a nivel de hoja con un analizador de gases, utilizando una cámara de planta entera para un seguimiento a corto plazo a nivel de árbol, y midiendo la temperatura de la copa para un seguimiento a largo plazo.

El quinto capítulo, ante el hecho de que la sequía estival que caracteriza al clima mediterráneo incluye tormentas de baja precipitación (por debajo de 1 mm) como una de las formas de precipitación más comunes, se investiga que estos eventos de baja precipitación considerados insignificantes en términos del balance hídrico del suelo, podrían desempeñar un importante papel ecofisiológico en los árboles, ya que podrían reducir el estrés de la planta a través de la humectación del dosel y una posterior absorción de agua vía foliar. En este estudio, se monitoriza la respuesta a corto plazo de *Quercus ilex*, a un evento de baja precipitación ocurrido durante el periodo estival. Para ello se midió el déficit de presión de vapor (VPD), el potencial hídrico del suelo y de la planta, la conductancia foliar total (g_t), la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (F_V/F_M), y el índice de reflectancia fisiológica (IRF, en inglés *photochemical reflectance index*, PRI).

1.4. Bibliografía

- Acherar, M., Rambal, S., 1992. Comparative water relations of four Mediterranean oak species. *Vegetatio* 99–100, 177–184. <https://www.jstor.org/stable/20046148>.
- Allen, R.G., Walter, I.A., Elliott, B., Mechan, B., Jensen, M.E., Itentisu, D., Howell, T.A., Snyder, R., Brown, P., Eching, S., et al., 2000. Issues, requirements and challenges in selecting and specifying and

- standardized ET equation. Proceedings of the 4th Decennial Symposium, Phoenix, Arizona, USA, November 14-16; Evans, R.G.; Benham, B.L.; Trooien, T.P., Eds. American Society of Agricultural Engineers, Saint Joseph, pp 201–204.
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., Mencuccini, M., Mendoza-Herrer, O., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2021. Contrasting functional strategies following severe drought in two Mediterranean oaks with different leaf habit: *Quercus faginea* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* 41, 371–387. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa135>.
- Alonso-Forn, D., Sancho-Knapik, D., Ferrio, J.P., Peguero-Pina, J.J., Bueno, A., Onoda, Y., Cavender-Bares, J., Niinemets, Ü., Jansen, S., Riederer, M., Cornelissen, J.H.C., Chai, Y., Gil-Pelegrín, E., 2020. Revisiting the functional basis of sclerophylly within the leaf economics spectrum of oaks: different roads to Rome. *Curr. Forestry Rep.* 6, 260–281. <https://doi.org/10.1007/s40725-020-00122-7>.
- Arnold, P.A., Briceño, V.F., Gowland, K.M., Catling, A.A., Bravo, L.A., Nicotra, A.B., 2021. A high-throughput method for measuring critical thermal limits of leaves by chlorophyll imaging fluorescence. *Funct. Plant Biol.* 48, 634–646. <https://doi.org/10.1071/FP20344>.
- Barbero, M., Loisel, R., Quèzel, P., 1992. Biogeography, ecology and history of Mediterranean *Quercus ilex* ecosystems. *Vegetatio* 99-100:19-34
- Barriuso, J.J., Serrano, R., Martín-Santafé, M., Sánchez-Durán, S., Incausa, A., Cuadrat, J.M., 2014a. Mapa de aptitud para el cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) en la provincia de Huesca. URL:<http://hdl.handle.net/10532/2769>.
- Barriuso, J.J., Serrano, R., Martín-Santafé, M., Sánchez-Durán, S., Cuadrat, J.M., 2014b. Mapa de aptitud para el cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) en la provincia de Zaragoza. URL: <http://hdl.handle.net/10532/2472>.
- Büntgen, U., Egli, S., Schneider, L., Von Arx, G., Rigling, A., Camarero, J.J., Sangüesa-Barreda, G., Fischer, C.R., Oliach, D., Bonet, J.A., Colinas, C., Tegel, W., Ruiz Barbarin, J.I., Martínez-Peña, F., 2015. Long-term irrigation effects on Spanish holm oak growth and its black truffle symbiont. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 202: 148-159.
- Bonet, J.A., Oliach, D., Fischer, C., Olivera, A., Martínez de Aragón, J., Colinas, C., 2009. Cultivation methods of the black truffle, the most profitable mediterranean non-wood forest production; a state of the art review. *EFI Proceedings* 57: 57-71.
- Breckle, S.W., 2002. *Walter's Vegetation of the Earth. The Ecological Systems of the Geo- Biosphere.* 4th-edition. Springer, Berlin
- Brodribb, T., Hill, R.S., 1999. The importance of xylem constraints in the distribution of conifer species. *New Phytol.* 143, 365–372. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00446.x>.
- Brodribb, T. J., Holbrook, N. M., 2004. Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. *New Phytol.*, 162 (3): 663-670.
- Chiatante, D., Tognetti, R., Scippa, G.S., Congiu, T., Baesso, B., Terzaghi, M., Montagnoli, A., 2015. Interspecific variation in functional traits of oak seedlings (*Quercus ilex*, *Quercus trojana*, *Quercus virgiliana*) grown under artificial drought and fire conditions. *J. Plant Res.* 128, 595–611. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0729-4>.
- Cochard, H., Peiffer, M., Le Gall, K., André, G., 1997. Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L.: impacts on water relations. *J. Exp. Bot.* 48, 655–663. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.3.655>.
- Comstock, J.P., Sperry, J.S., 2000. Some theoretical considerations of optimal conduit length for water transport in plants. *Tansley Review No. 119. New Phytol.*, 148: 195-218.

- Cook, B.I., Anchukaitis, K.J., Touchan, R., Meko, D.M., Cook, E.R., 2016. Spatiotemporal drought variability in the Mediterranean over the last 900 years. *J. Geophys. Res.* 121, 2060–2074 <https://doi.org/10.1002/2015JD023929>
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A., Gil-Pelegrín, E., 2005. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* subsp. *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian Peninsula. *Tree Physiol.* 25, 599–608. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.5.599>.
- Cowling, R.M., Rundel, P.W., Lamont, B.B., Arroyo, M.K., Arianoutsou, M., 1996. Plant diversity in mediterranean-climate regions. *Trends Ecol Evol* 11:362-366
- Cuadrat, J.M., Saz, M.A., Vicente-Serrano, S., González-Hidalgo, J.C., 2007. Water resources and precipitation trends in Aragon (Spain). *Int J Water Resour D* 23:107-124
- Deitch, M.J., Sapundjieff, M.J., Feirer, S.T., 2017. Characterizing precipitation variability and trends in the world's Mediterranean-Climate areas. *Water* 9:259
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* 172, 11–21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x>.
- Domínguez-Núñez, J.A., Planelles-González, R., Rodríguez-Barreal, J.A., Saiz de Omeñaca-González, J.A., 2009. Influence of water-stress acclimation and *Tuber melanosporum* mycorrhization on *Quercus ilex* seedlings. *Agroforestry Systems* 75: 251-259.
- Emberger, L., 1930. La Végétation De La Région Méditerranéenne: Essai D'une Classification Des Groupements Végétaux. Librairie générale de l'enseignement.
- Farrant, J.M., 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecol.* 151, 29–39. <https://www.jstor.org/stable/20050993>.
- García-Plazaola, J.I., Hernández, A., Fernández-Marín, B., Esteban, R., Peguero-Pina, J.J., Verhoeven, A., Cavender-Bares, J., 2017. Photoprotective mechanisms in the genus *Quercus* in response to winter cold and summer drought. In: Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D. (Eds.), *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* Springer International Publishing, Berlin/Heidelberg, pp. 361–391
- Gil-Pelegrín, E., Aranda, I., Peguero-Pina, J.J., Vilagrosa, A., 2005. El continuo suelo-planta-atmósfera como un modelo integrador de la ecofisiología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For* 14(3), 358-370
- Gil-Pelegrín, E., Saz, M.A., Cuadrat, J.M., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017. Oaks under Mediterranean-type climates: functional response to summer aridity. In: Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D. (Eds.), *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* Springer International Publishing, Berlin/Heidelberg, pp. 137–193 DOI: 10.1007/978-3-319-69099-5_5
- Gil-Pelegrín E., 1993. Estudios ecofisiológicos sobre *Pinus uncinata* Mill. En el límite superior de la especie. Tesis Doctoral. Univ. Autónoma de Madrid.
- Guiot, J., Kaniewski, D., 2015. The Mediterranean Basin and Southern Europe in a warmer world: what can we learn from the past? *Front. Earth Sci.* 3, 28 <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00028>
- Guiot, J., Cramer, W., 2016. Climate change: The 2015 Paris Agreement thresholds and Mediterranean basin ecosystems. *Science* VOL 354 ISSUE 6311 10.1126/science.aah5015
- Hacke, U.G., Sperry, J.S., Pittermann, J., 2000. Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah. *Basic Appl. Ecol.* 1, 31–41. <https://doi.org/10.1078/1439-1791-00006>.
- Harris, I.P., Jones, P.D., Osborn, T.J., Lister, D.H., 2014. Updated High-Resolution Grids of Monthly Climatic Observations—The CRU TS3.10 Dataset. *International Journal of Climatology*, 34, 623-642. <https://doi.org/10.1002/joc.3711>

- Hernández, I., Cela, J., Alegre, L., Munné-Bosch, S., 2012. Antioxidants defences against drought stress. In: Aroca, R. (Ed.), *Plant Responses to Drought Stress*. Springer, Berlin, pp. 231–258.
- Hochberg, U., Windt, C.W., Ponomarenko, A., Zhang, Y.J., Gersony, J., Rockwell, F.E., Holbrook, N.M., 2017. Stomatal closure, basal leaf embolism, and shedding protect the hydraulic integrity of grape stems. *Plant Physiol* 174, 764–775. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01816>.
- Huber, B., 1928. Weitere quantitative Untersuchungen über das Wasserleitungssystem der Pflanzen. *Jahrb.Wiss.Bot.*, 67: 877-959.
- Hurrell, J.W., Dickson, R.R. 2004. Climate Variability Over the North Atlantic In book: *Marine Ecosystems and Climate Variation - the North Atlantic* Publisher: Oxford University Press Editors: Stenseth, N.C. and Ottersen, G. and Hurrell, J.W. and Belgrano, A DOI:10.1093/acprof:oso/9780198507499.003.0002
- Kaniewski, D., Van Campo, E, Weiss, H., 2012. Drought is a recurring challenge in the Middle East. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3862–3867
- Knapp, A.B., Manning, S.W., 2016. Crisis in Context: The End of the Late Bronze Age in the Eastern Mediterranean. *Am. J. Archaeol.* 120, 99–149 DOI: 10.3764/aja.120.1.0099
- Krichak, S.O., Alpert, P., 2005. Decadal trends in the East Atlantic/West Russia pattern and the Mediterranean precipitation. *Int J Climatol* 25: 183–192
- Larcher, W., 1995. *Physiological Plant Ecology*. Third Edition. Springer Verlag, Berlin.
- Levitt, J., 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Academic Press, New York, p. 697.
- Lionello, P, Malanotte-Rizzoli, P, Boscolo, R, Alpert, P., Artale, V., Li, L., Luterbacher, J., May, W. Trigo, R., Tsimplis, M., Ulbrich, U., Xoplaki, E., 2006. The Mediterranean Climate: An overview of the main characteristics and issues, In: Lionello P, Malanotte-Rizzoli P, R Boscolo R (eds). *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, p 1–26
- Martin, T.A., Hinckley, T.M., Meinzer, F.C., Sprugel, D.G., 1999. Boundary layer conductance, leaf temperature and transpiration of *Abies amabilis* branches. *Tree Physiol.*, 19: 435-443.
- Martín-Sánchez, R., Peguero-Pina, J.J., Alonso-Forn, D., Ferrio, J.P., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2022. Summer and winter can equally stress holm oak (*Quercus ilex* L.) in Mediterranean areas: A physiological view. *Flora* 290, 152058
- Martin-StPaul, N., Delzon, S., Cochard, H., 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol. Lett.* 20, 1437–1447. <https://doi.org/10.1111/ele.12851>.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiol.* 23, 987–996. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.14.987>.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2004. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *For. Ecol. Manag.* 187, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2003.07.006>.
- Meinzer, F.C., Johnson, D.M., Lachenbruch, B., McCulloh, K.A., Woodruff, D.R., 2009. Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Funct. Ecol.* 23, 922–930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01577.x>.
- Méthy, M., Damesin, C., Rambal, S., 1996. Drought and photosystem II activity in two Mediterranean oaks. *Ann. For. Sci.* 53, 255–262. <https://doi.org/10.1051/forest:19960208>.
- Middleton, G.D., 2012. Nothing Lasts Forever: Environmental Discourses on the Collapse of Past Societies. *J. Archaeol. Res.* 20, 257–307
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., Montserrat, G., Gil-Pelegrín, E., 2002. Trichomes and photosynthetic pigment composition changes: responses of *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Quercus*

- coccifera* L. to Mediterranean stress conditions. *Trees* 16, 504–510. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0195-1>.
- Mosmann, V., Castro, A., Fraile, R., Dessens, J., Sanchez, J.L., 2004. Detection of statistically significant trends in the summer precipitation of mainland Spain. *Atmos. Res.*, 70, 43-53. DOI: 10.1016/j.atmosres.2003.11.002
- Nardini, A., Salleo, S., Raimondo F., 2003. Changes in leaf hydraulic conductance correlate with leaf vein embolism in *Cercis siliquastrum* L. *Trees*, 17: 529-534
- Nardini, A., Salleo, S., Tyree, M.T., Vertovec, M., 2000. Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Ann. For. Sci.*, 54: 305-312.
- Nobel, P.S., 1983. *Biophysical Plant Physiology and Ecology*, W.H. Freeman, San Francisco.
- North, G.B., Nobel, P.S., 1991. Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave deserti* (Agavaceae). *Am. J. Bot.*, 78: 906-915.
- Olivera, A., Bonet, J.A., Palacio, L., Liu, B., Colinas, C., 2014. Weed control modifies *Tuber melanosporum* mycelial expansion in young oak plantations. *Annals of Forest Science* 71: 495-504.
- Olivera, A., Fischer, C.R., Bonet, J.A., Martínez de Aragón, J., Oliach, D., Colinas, C., 2011. Weed management and irrigation are key treatments in emerging black truffle (*Tuber melanosporum*) cultivation. *New Forests* 42: 227-239.
- Pallardy, S.G., 1989. Hydraulic architecture and conductivity: an overview. En: *Structural and functional responses to environmental stresses* (Kreeb K.H., H. Richter, T.M. Hinckley, eds.). SPB Academic Pub. The Hague.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.* 36, 453–462. <https://doi.org/10.1071/FP08297>.
- Pozo-Vázquez, D., Esteban-Parra, M.J., Rodrigo, F.S., Castro-Diez, Y., 2001. A study of NAO variability and its possible non-linear influences on European Surface temperature. *Clim Dyn* 17: 701–715
- Reyna, S., 2012. Sostenibilidad de la truficultura: aspectos ecológicos, económicos y sociales. En: Reyna S (ed) *Truficultura. Fundamentos y técnicas*. 2nd ed. Mundi Prensa, Madrid, pp 51-73.
- Reyna, S., García-Barreda, S., 2014. Black truffle cultivation: a global reality. *Forest Systems* 23: 317-328.
- Roberts, N., Brayshaw, D., Kuzucuoglu, C., Perez, R., Sadori, L., 2011. The mid-Holocene climatic transition in the Mediterranean: Causes and consequences. *Holocene* 21, 3–13 <https://doi.org/10.1177/0959683610388058>
- Rundell, P.W., Jarrell, W.M., 1991. Water in the environment. In Percy R.W., Ehleringer J., Mooney H.A. and P.W. Rundell, eds: *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*. Chapman and Hall, London, pp. 29-56.
- Schönherr, J., Schmidt, H.W., 1979. Water permeability of Plant Cuticles. *Planta*, 144: 391-400.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., Zeier J., 1999. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J.Exp.Bot.*, 50(337): 1267-1280.
- Serrano-Notivol, R., Incausa-Ginés, A., Martín-Santafé, M., Sánchez-Durán, S., Barriuso-Vargas, J.J., 2015. Modelización espacial del hábitat potencial de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) en la provincia de Huesca (España). ITEA, en prensa. <http://dx.doi.org/10.12706/itea.2015.015>.
- Skelton, R.P., Dawson, T.E., Thompson, S.E., Shen, Y., Weitz, A.P., Ackerly, D., 2018. Low vulnerability to xylem embolism in leaves and stems of North American oaks. *Plant Physiol.* 177, 1066–1077. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00103>.

- Slavik, B., 1974. Methods of studying Plant Water Relations, Academia Publishing House, Prague and Springer-Verlag, Berlin.
- Sperry, J., 2004. Coordinating stomatal and xylem functioning - an evolutionary perspective. *New Phytol.*, 162: 568-570.
- Tyree, M.T., Cheung, Y.N.S., 1977. Resistance to wáter flow in *Fagus grandifolia* leaves. *Can. J. Bot.*, 55: 2591-2599.
- Tyree, M.T., Ewers, F.W., 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytol.*, 119:345-360.
- Van den Honert, T.H., 1948. Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Soc.* 3:1.
- Wallen, C.C., 1970. Climates of Central and Southern Europe. World survey of climatology Volume 6. Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam.
- Walter, H., 1985. Vegetation of the Earth and ecological systems of the geo-biosphere. 3rd ed, Springer, Berlin 318 pp
- Weninger, B., Clare, L., Rohling, E.J., Bar-Yosef, O., Böhner, U., Budja, M., Bundschuh, M., Feurdean, A., Gebel, H.G.K., Jöris, O., Linstädter, J., Mayewski, P., Mühlenbruch, T., Reingruber, A., Rollefson, G., Schyle, D., Thissen, L., Todorova, H., Zielhofer, C., 2009. The Impact of Rapid Climate Change on Prehistoric Societies during the Holocene in the Eastern Mediterranean *Documenta Praehistorica* 902 36, 7–59 DOI:10.4312/dp.36.2
- Yang, S., Tyree, M.T., 1993. Hydraulic resistance in the soots of *Acer sacharum* and its influence on leaf water potential and transpiration. *Tree Physiol.*, 12:231-242.
- Zimmermann, M.H., 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer Verlag series in Wood Science: Springer-Verlag, Berlin.

CAPÍTULO 2

La cavitación limita la recuperación del intercambio gaseoso tras estrés por sequía en la encina (*Quercus ilex* L.)

Resumen Capítulo 2

La encina (*Quercus ilex* L.) es una especie mediterránea que puede soportar una intensa sequía estival gracias a una alta resistencia a la cavitación más allá del cierre estomático. Además de las limitaciones estomáticas, las limitaciones mesofílicas y bioquímicas a la captación de CO_2 también podrían aumentar en la encina bajo sequía. Sin embargo, ningún estudio ha abordado cómo los factores hidráulicos y no hidráulicos pueden limitar la recuperación de la fotosíntesis tras rehidratación después de inducir una pérdida del 50% de la conductividad hidráulica por estrés hídrico. En este estudio se midieron los parámetros fotosintéticos, la embolia nativa del xilema y la concentración de ácido abscísico (ABA) en encinas con niveles crecientes de estrés hídrico y después de siete días de recuperación tras haber regado de nuevo la planta. El estrés hídrico causó una fuerte disminución en la asimilación neta de CO_2 (A_N), en la conductancia estomática y del mesófilo (g_s y g_m), y en la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}). El cierre estomático podría estar inducido por el rápido incremento registrado en la concentración de ABA. El alto nivel de embolia en el xilema explicó la fuerte regulación a la baja de g_s incluso después de un nuevo riego. Por este motivo, sólo se observó una recuperación parcial del A_N a pesar de que los factores no hidráulicos no limitaron la recuperación de A_N , ya que i/la concentración de ABA disminuyó fuertemente y ii/ g_m y V_{cmax} recuperaron sus valores originales tras rehidratación. Por lo tanto, el modelo de limitación hidráulico-estomático de la fotosíntesis estaría implicado en la recuperación parcial de la A_N , con el fin de evitar la embolia generalizada del xilema bajo eventos de sequía posteriores que podrían comprometer la supervivencia de la encina.

2.1. Introducción

Los climas de tipo mediterráneo se caracterizan por veranos cálidos/secos e inviernos moderadamente fríos que pueden restringir la actividad vegetativa (Montserrat-Martí *et al.*, 2009; Flexas *et al.*, 2014). Este tipo de clima se encuentra en varias regiones situadas entre los 30° y los 40° de latitud en la parte occidental de los continentes (Lionello *et al.*, 2006), en zonas donde el desplazamiento de las altas presiones subtropicales hacia latitudes más altas durante el verano provoca la estabilidad atmosférica, y, como consecuencia, una ausencia de precipitaciones (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017). Además, las proyecciones del cambio climático indican que los ecosistemas mediterráneos podrían experimentar reducciones drásticas de las precipitaciones que agravarán el estrés estacional por sequía (Peñuelas *et al.*, 2018; Busotti *et al.*, 2014). Por lo tanto, las especies vegetales que crecen en el área mediterránea deberían desarrollar mecanismos y estrategias para hacer frente a períodos prolongados de escasez de agua (Niinemets y Keenan, 2014).

El cierre estomático en respuesta a la sequía es una forma común de regular el consumo de agua (Gallé *et al.*, 2007; Peguero-Pina *et al.*, 2008, 2009; Klein, 2014). Esta estrategia se considera un mecanismo efectivo que previene la cavitación del xilema y la embolia incontrolada (Vilagrosa *et al.*, 2003; Tombesi *et al.*, 2015), aunque a costa de una reducción en la asimilación neta de CO₂ que podría comprometer el balance de carbono de la planta (Flexas *et al.*, 2014; McDowell, 2011). La existencia de un retardo entre el potencial hídrico que causa el cierre estomático y el que induce una amplia cavitación del xilema (es decir, un amplio "margen de seguridad") (Hochberg *et al.*, 2018) es común en las plantas que se encuentran en ambientes con limitación de agua (Hacke *et al.*, 2000). Varios estudios sugieren que un amplio "margen de seguridad" aumentaría la supervivencia y la competitividad bajo condiciones de sequía severa en el Mediterráneo (Vilagrosa *et al.*, 2003, 2010).

La encina (*Quercus ilex* L.) es una especie arbórea Circum-Mediterránea clave -tanto en términos de distribución geográfica como en dominancia en el paisaje- que experimenta potenciales hídricos muy negativos bajo sequía extrema (Aguadé *et al.*, 2015), y muestra una alta resistencia a la cavitación inducida por la sequía (Peguero-Pina *et al.*, 2014). Esta especie tiene un amplio "margen de seguridad" porque el cierre estomático se produce a potenciales hídricos (aproximadamente -3 MPa) (Peguero-Pina *et al.*, 2009; Vilagrosa *et al.*, 2003) muy superiores a los que inducen una pérdida de conductividad hidráulica del 50% (PLC₅₀) (aprox. -6 MPa) (Peguero-Pina *et al.*, 2014). A pesar de ello, en períodos de sequía prolongada, el cierre estomático no puede restringir suficientemente la pérdida de agua para prevenir la formación de embolia generalizada en el xilema (Martorell *et al.*, 2014).

Además de las limitaciones estomáticas, el estrés por sequía también puede reducir la fotosíntesis mediante (i) la disminución de la conductancia del mesófilo al CO₂ (g_m), es decir, aumentando la resistencia a la transferencia de CO₂ desde los espacios intercelulares a los sitios de carboxilación en los cloroplastos (limitaciones del mesófilo), y (ii) disminuyendo la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}), es decir, inhibiendo la capacidad de fijar el CO₂ en forma de azúcares (limitaciones bioquímicas) (Flexas *et al.*, 2012). En cuanto a la encina, Galle *et al.* (2011) demostraron, que las limitaciones del mesófilo se incrementan cuando se experimenta un estrés por sequía; este hecho juega un papel predominante en la limitación de la fotosíntesis en estas condiciones. Además, estos autores también caracterizaron la velocidad de recuperación de los parámetros fotosintéticos después de un nuevo riego, pero sólo encontraron una recuperación parcial de la asimilación neta de CO₂ debido a la persistencia de bajas conductancias estomáticas y mesofílicas.

El tiempo de recuperación del funcionamiento de la planta es crítico para el funcionamiento del ecosistema, especialmente si llega una nueva sequía como recientemente han abordado Schwalm *et al.* (2017). Sin embargo, pocos estudios han abordado la relación entre los parámetros hidráulicos y fotosintéticos durante la sequía y la recuperación (Martorell *et al.*, 2014; Resco *et al.*, 2009; Brodribb *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Guadagno *et al.*, 2017). En general, estos autores sugirieron que la recuperación de la capacidad fotosintética podría ser impulsada por la recuperación de la capacidad de transporte de agua a las hojas transpirantes. Además de los parámetros hidráulicos, Yan *et al.* (2017) propusieron que los factores no hidráulicos podrían poner en peligro la recuperación del intercambio de gases tras una sequía severa en *Robinia pseudoacacia*, en concreto a través de la existencia de ácido abscísico (ABA) residual durante la etapa de recuperación.

Sin embargo, hasta donde sabemos, ningún estudio ha abordado el papel tanto de la hidráulica (embolia del xilema) como de los factores no hidráulicos (es decir, g_m , V_{cmax} y ABA) en la disminución de la actividad fotosintética de la encina en condiciones de sequía severa, y su posterior recuperación tras el proceso de rehidratación, el cual es el objetivo principal del presente estudio. Nuestra hipótesis es que la recuperación de la asimilación neta de CO_2 en la encina después de sufrir una sequía severa (es decir, alcanzar valores de potencial hídrico cercanos a PLC_{50}) se verá comprometida por una embolia generalizada del xilema, más que por factores no hidráulicos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Semillas de encina (*Q. ilex* subsp. *rotundifolia*) (procedencia "Soria", 41°46' N, 2°29' O, 1074 m sobre el nivel del mar, España) se sembraron y cultivaron en 2003 en contenedores de 0,5 L dentro de un invernadero bajo las mismas condiciones con una mezcla de 80% de compost (Neuhaus Humin Substrat N6; Klasman-Deilmann GmbH, Geeste, Alemania) y 20% de perlita. Tras el primer ciclo de crecimiento, las plántulas se trasplantaron a contenedores de 25 L llenos de la misma mezcla de compost y perlita, y se cultivaron al aire libre en el CITA de Aragón (41°39' N, 0°52' O, Zaragoza, España), en condiciones mediterráneas (temperatura media anual 15,4 °C, precipitación total anual 298 mm). Un fertilizante de liberación lenta (15:9:12 N:P:K, Osmocote Plus, Sierra Chemical, Milpitas, CA, EE.UU.) se añadió periódicamente a la capa superior de 10 cm de sustrato (3 g L⁻¹ de sustrato de crecimiento). Todas las plantas se cultivaron en las mismas condiciones ambientales, se regaron por goteo cada 2 días y se podaron cuando fue necesario.

Dos semanas antes del inicio del experimento, diez plantas en maceta (de 14 años de edad y aprox. 1,5 m de altura y unos 0,8 m de diámetro máximo) se colocaron bajo un techo de plástico transparente (película de polietileno para cubierta de invernadero, de 200 µm de espesor) que permitía el paso del 90% de la luz fotosintéticamente activa (~1800 µmol fotones m⁻²s⁻¹ al mediodía, durante el experimento). El uso de cubiertas en los experimentos de estrés hídrico tiene la ventaja de realizar las mediciones en condiciones ambientales más controladas, es decir, evitando los riegos por tormentas o eventos de lluvia no deseados. El riego se interrumpió el 21 de agosto de 2017, y las mediciones en plantas bien regadas comenzaron el 22 de agosto de 2017. Durante los días siguientes se realizaron mediciones en las mismas plantas cada dos o tres días con niveles crecientes de estrés por sequía. El estrés por sequía se mantuvo durante 20 días.

Finalmente, tras la última medición en condiciones de estrés por sequía, las plantas se volvieron a regar y las mediciones se realizaron de nuevo al cabo de 7 días.

La temperatura (T, °C) y la humedad relativa (HR, %) del aire se midieron en el sitio experimental utilizando un registrador de datos Hobo Pro temp/RH (Onset Computer, Bourne, MA, USA) situado a 1,30 m por encima de la superficie del suelo. Las mediciones se registraron cada 60 min desde junio hasta septiembre de 2017. El déficit de presión de vapor (DPV, en inglés *vapour pressure deficit*, VPD, kPa) se calculó a partir de los valores de T y HR según Rundel y Jarrell (1989). (**Figura 2.1**)

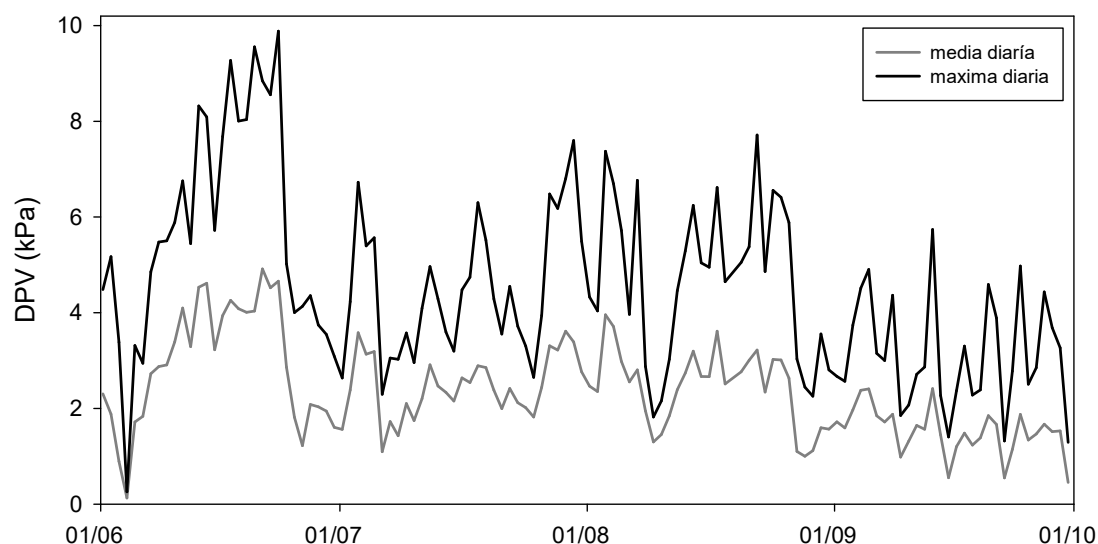


Figura 2.1 Representación de los valores medios y máximos de VPD diurnos (desde el amanecer hasta el atardecer) para este periodo de estudio.

2.2.2. Mediciones del potencial hídrico

El potencial hídrico se midió antes del amanecer y al mediodía (ψ_{PD} y ψ_{MD} , MPa) en brotes de encina (con las hojas todavía unidas a los brotes) con una cámara de presión Scholander siguiendo el procedimiento metodológico descrito por Turner (1988).

2.2.3. Medidas de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila en las hojas

Las mediciones simultáneas de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila se realizaron con un sistema abierto de intercambio de gases (CIRAS-2, PP-Systems, Amesbury, MA, EE.UU.) equipado con una cubeta automática universal (PLC6-U, PP-Systems) y un fluorímetro portátil de amplitud de pulso modulada FMS II (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron entre 8 y 9 h (hora solar) en hojas de encina del año en curso completamente desarrolladas, a una concentración controlada de CO_2 en la cubeta ($C_a = 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (en inglés *photosynthetic photon flux density*, PPFD) saturante de $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En todas las mediciones, el déficit de presión de vapor se mantuvo en 1,25 kPa, y la temperatura de la hoja a 25 °C. Una vez alcanzado el intercambio de gases en estado estacionario, se estimó la absorción neta de CO_2 (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la conductancia estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la eficiencia instantánea del PSII (Φ_{PSII}). El Φ_{PSII} se calculó como $(F'_M - F_S) / F'_M$, donde F_S es la fluorescencia en estado estacionario y F'_M es la fluorescencia máxima

durante un pulso de luz saturante de $\sim 8000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Genty *et al.*, 1989). La tasa de transporte electrónico (J_F) se calculó entonces según Krall y Edwards (1992), siguiendo la metodología descrita en Peguero-Pina *et al.* (2016). La fuga de CO_2 en la cubeta se determinó como se describe en Flexas *et al.* (2007a), y se utilizó para corregir los flujos medidos en la hoja.

La conductancia del mesófilo (g_m) y la velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}) se estimaron según el método de Harley *et al.* (1992) (Ecuación (1)), y el método de un punto De Kauwe *et al.* (2016) (Ecuación (2)), respectivamente, como sigue:

$$g_m = \frac{A_N}{C_i - \frac{\Gamma^*(J_F + 8(A_N + R_L))}{J_F - 4(A_N + R_L)}} \quad (1)$$

$$V_{cmax} = \frac{A_N}{\left(\frac{C_i - \Gamma^*}{C_i + K_m}\right)^{-0.015}} \quad (2)$$

donde A_N y la concentración subestomática de CO_2 (C_i) se tomaron de las mediciones de intercambio de gases con luz saturante. El punto de compensación de CO_2 cloroplástico en ausencia de respiración mitocondrial (Γ^*) y la tasa de respiración en la luz (R_L) se estimaron como se describe en Flexas *et al.* (2007b), mientras que K_m (la constante de Michaelis-Menten) se estimó como se describe en De Kauwe *et al.* (2016).

Para separar las limitaciones relativas sobre A_N correspondientes a la conductancia estomática (limitación estomática a la fotosíntesis, l_s), la conductancia del mesófilo (limitación del mesófilo a la fotosíntesis, l_m) y la capacidad bioquímica (limitación bioquímica a la fotosíntesis, l_b), utilizamos el análisis de limitación cuantitativa de Grassi y Magnani (2005), tal como se aplica en Tomás *et al.* (2013) y Peguero-Pina *et al.* (2017a). Las distintas limitaciones, l_s , l_m y l_b ($l_s + l_m + l_b = 1$), se calcularon de acuerdo con las Ecuaciones (3), (4) y (5):

$$l_s = \frac{g_t/g_s \cdot \delta A_N / \delta C_c}{g_t + \delta A_N / \delta C_c} \quad (3)$$

$$l_m = \frac{g_t/g_m \cdot \delta A_N / \delta C_c}{g_t + \delta A_N / \delta C_c} \quad (4)$$

$$l_b = \frac{g_t}{g_t + \delta A_N / \delta C_c} \quad (5)$$

donde g_s es la conductancia estomática al CO_2 , g_m es la conductancia del mesófilo al CO_2 según Harley *et al.* (1992) (Ecuación (1)), y g_t es la conductancia total al CO_2 desde la atmósfera hasta los cloroplastos, la inversa de la suma de las resistencias en serie, a la CO_2 estomática ($1 / g_s$) y mesofílica ($1 / g_m$). Los valores de g_m obtenidos se utilizaron para calcular la concentración cloroplástica de CO_2 (C_c) mediante la ecuación $C_c = C_i - A_N / g_m$.

2.2.4. Transpiración y conductancia de toda la planta

La transpiración de toda la planta se estimó mediante mediciones lisimétricas pesando las macetas desde la mañana hasta el mediodía cada 2 h (6, 8, 10 y 12 h de tiempo solar) con una balanza de precisión (Wagi Load Cell WLC 20/A2, Radwag Balances and Scales, Radom, Polonia). Para considerar únicamente las pérdidas de agua por transpiración de las plantas, la superficie del suelo y los agujeros de drenaje de las macetas se sellaron antes de la primera medición; estos sellos se retiraron después de la última medición del día. La transpiración ($\text{mol H}_2\text{O s}^{-1}$) se calculó como la diferencia de peso dividida por el tiempo entre dos mediciones

consecutivas. La transpiración de toda la planta en base al área foliar (E_{plant} , mol H₂O m⁻²s⁻¹) se calculó estimando el área foliar total por planta; para ello se estimó el área foliar individual en 20 hojas representativas por planta y se cuantificó el número total de hojas por planta. Además, la conductancia de toda la planta (g_{plant}) se derivó de la ley de difusión de Fick, como se describe en Pearcy *et al.* (1989) en la Ecuación (6):

$$g_{plant} = \frac{E_{plant}}{\Delta VPD} \quad (6)$$

donde ΔVPD es la diferencia de presión de vapor hoja-aire.

2.2.5. Embolia nativa del xilema

La embolia nativa del xilema se estimó en brotes de encina del año en curso recogidos de ramas donde se había medido previamente ψ_{MD} . Los brotes se cortaron bajo el agua en el campo y se trasladaron inmediatamente al laboratorio con el corte sumergido en agua y protegidos a su vez en una bolsa de plástico. Una vez allí, los segmentos del tallo de los brotes se cortaron de nuevo bajo el agua (50 mm de longitud) y se rasuraron ambos extremos con una cuchilla de afeitar. Los segmentos se colocaron en un tubo similar al descrito por Cochard *et al.* (1996) y se conectaron a un medidor de flujo másico digital Liqui-Flow (Bronkhorst High-Tech, Ruurlo, Países Bajos). El tubo con los brotes se sumergió en agua destilada para evitar la desecación y mantener una temperatura casi constante (Vilagrosa *et al.*, 2003). Los segmentos se perfundieron con agua destilada, desgasificada y filtrada (0,22 μ m) que contenía 0,005% (v/v) de Micropur (Katadyn Products, Wallisellen, Suiza) para evitar el crecimiento microbiano (Mayr *et al.*, 2006). La conductividad hidráulica se midió antes y después de eliminar la embolia aplicando perfusiones cortas a 0,15 MPa durante 60-90 s, como describen Sperry *et al.* (1988). La embolia nativa se calculó entonces como la relación entre la conductividad hidráulica antes y después de eliminar la embolia.

2.2.6. Determinación del ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) se determinó en hojas de encina del año en curso completamente desarrolladas. Las muestras se recogieron al mediodía y se almacenaron a -80 °C para su conservación hasta el análisis. La extracción se realizó sobre 50 mg de tejido liofilizado con 3 mL de acetona/agua/ácido fórmico (80:19:1, v/v/v) (30 min, 2000 rpm), centrifugándose posteriormente (15 min, 3000 rpm, 4 °C). La acetona se evaporó bajo una corriente de nitrógeno, y el extracto acuoso restante se ajustó a 1,2 mL con agua Milli-Q. El extracto se particionó dos veces con éter dietílico, se secó bajo nitrógeno y se volvió a disolver en 500 μ L de acetonitrilo/agua (30:70, v/v) con 0,1% de ácido fórmico. El extracto se analizó por espectrometría de masas, y el ABA se cuantificó siguiendo la metodología descrita en Sancho-Knapik *et al.* (2017).

2.2.7. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizaron análisis de la varianza con un factor (ANOVAs) para identificar el efecto del tiempo de medición sobre la transpiración de toda la planta (E_{plant}) y la conductancia (g_{plant}). Se realizaron comparaciones múltiples entre los tiempos de medición para E_{plant} y g_{plant} utilizando la prueba post hoc de diferencia significativa de Tukey. Las pruebas t de Student se utilizaron para comparar los valores de los parámetros fotosintéticos (A_N , g_s , g_m y V_{cmax}) medidos para las plantas bien regadas antes del periodo de sequía con los medidos 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con la versión 8.0 de SAS (SAS, Cary, NC, Estados Unidos).

2.3. Resultados

2.3.1. Transpiración y conductancia de toda la planta

Tanto la transpiración como la conductancia a nivel de toda la planta (E_{plant} y g_{plant}) disminuyeron en la encina cuando el potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD}) se hizo más negativo (**Figura 2.2**). Al final del periodo de sequía (cuando ψ_{PD} era de aproximadamente -6 MPa), tanto E_{plant} como g_{plant} alcanzaron valores casi insignificantes. E_{plant} para plantas bien regadas fue estadísticamente mayor al mediodía (hora solar) en comparación con los valores obtenidos a primera y segunda hora de la mañana (**Figura 2.2a**). Este hecho puede explicarse por el aumento gradual del VPD desde primera hora de la mañana hasta el mediodía, ya que g_{plant} no mostró diferencias entre las distintas horas de medición para plantas bien regadas (cuando ψ_{PD} era de aproximadamente 0 MPa, **Figura 2.2b**). g_{plant} sólo mostró diferencias entre los distintos momentos de medición cuando ψ_{PD} era de aproximadamente -3 MPa.

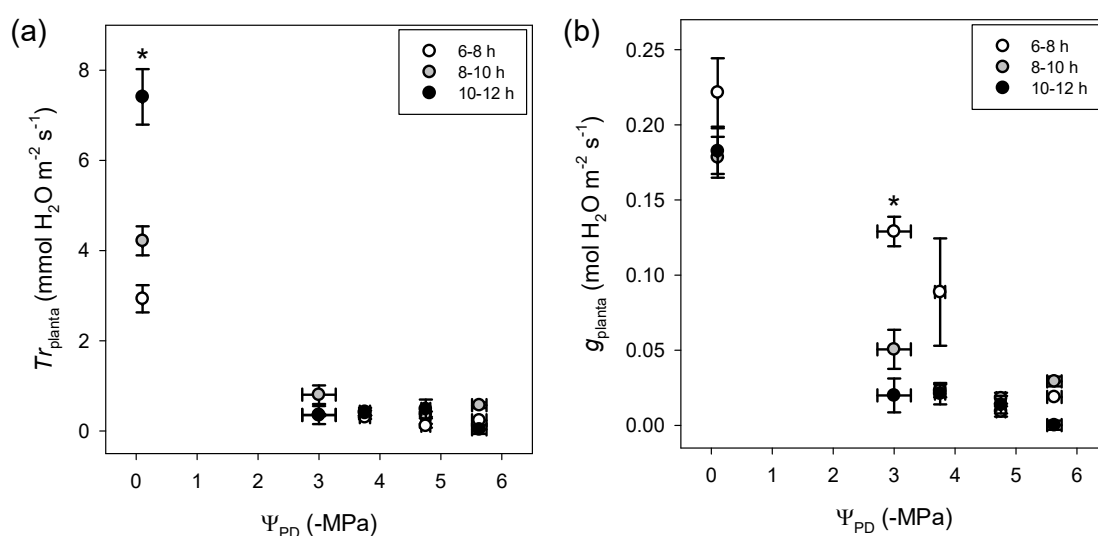


Figura 2.2 Evolución de (a) la transpiración de toda la planta (E_{plant}) y (b) la conductancia de toda la planta (g_{plant}) con el potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD}) para las hojas de encina durante el periodo de sequía a primera hora de la mañana (entre 6 y 8 h de tiempo solar, símbolos blancos), a media mañana (entre 8 y 10 h de tiempo solar, símbolos grises) y al mediodía (entre 10 y 12 h de tiempo solar, símbolos negros). Los datos son la media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre primera hora de la mañana, la media mañana y el mediodía para cada nivel de ψ_{PD} (prueba de Tukey, $p < 0,05$).

2.3.2. Parámetros fotosintéticos a escala foliar

Tanto la fotosíntesis neta como la conductancia estomática a escala foliar (A_{N} y g_{s}) disminuyeron en la encina cuando ψ_{PD} se hizo más negativo, alcanzando valores negativos para A_{N} y casi despreciables para g_{s} al final del periodo de sequía (**Figura 2.3**), lo que coincide con los resultados obtenidos a nivel de toda la planta (**Figura 2.2**). Tanto A_{N} como g_{s} mostraron una recuperación parcial cuando las plantas fueron regadas de nuevo, aunque esta recuperación fue mucho mayor para A_{N} que para g_{s} (64% y 29% con respecto a los valores de las plantas bien regadas respectivamente). Este patrón también se observó para la conductancia

del mesófilo y la velocidad máxima de carboxilación (g_m y V_{cmax}), que mostraron una fuerte disminución a lo largo del periodo de sequía (**Figura 2.4**). Sin embargo, a diferencia de g_s , la recuperación de g_m y V_{cmax} fue casi completa 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo (89 y 75%, respectivamente).

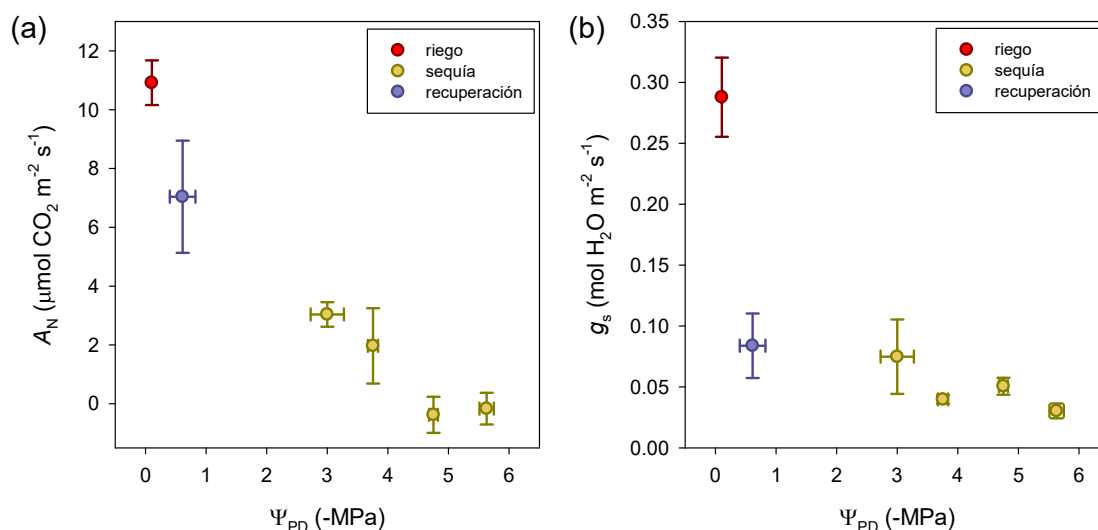


Figura 2.3 Evolución de (a) la fotosíntesis neta (A_N) y (b) la conductancia estomática (g_s) respecto al potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{PD}) para hojas de encina bien regadas (símbolos rojos), durante el periodo de sequía (símbolos amarillos) y 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo (símbolos violetas). Los datos son la media $\pm$ error estándar.

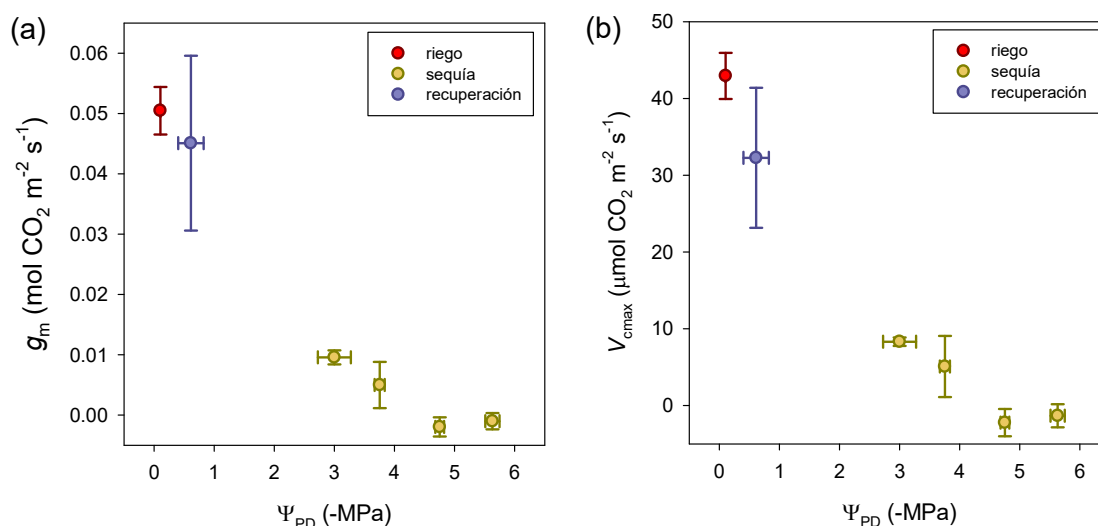


Figura 2.4 Evolución de (a) la conductancia mesófila (g_m) y (b) la velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}) respecto al potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{PD}) para hojas de encina bien regadas (símbolos rojos), durante el periodo de sequía (símbolos amarillos) y 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo (símbolos violetas). Los datos son la media $\pm$ error estándar.

El análisis de las limitaciones relativas a la fotosíntesis reveló que A_N estaba limitada principalmente por la conductancia del mesófilo (limitación del mesófilo a la fotosíntesis, I_m) en las plantas bien regadas, limitación

que se incrementó gradualmente durante el período de sequía (**Figura 2.5**). Sin embargo, hubo un fuerte aumento de I_s y una fuerte disminución de I_m 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo (**Figura 2.4**), probablemente asociado a la falta de recuperación de g_s (**Figura 2.3**).

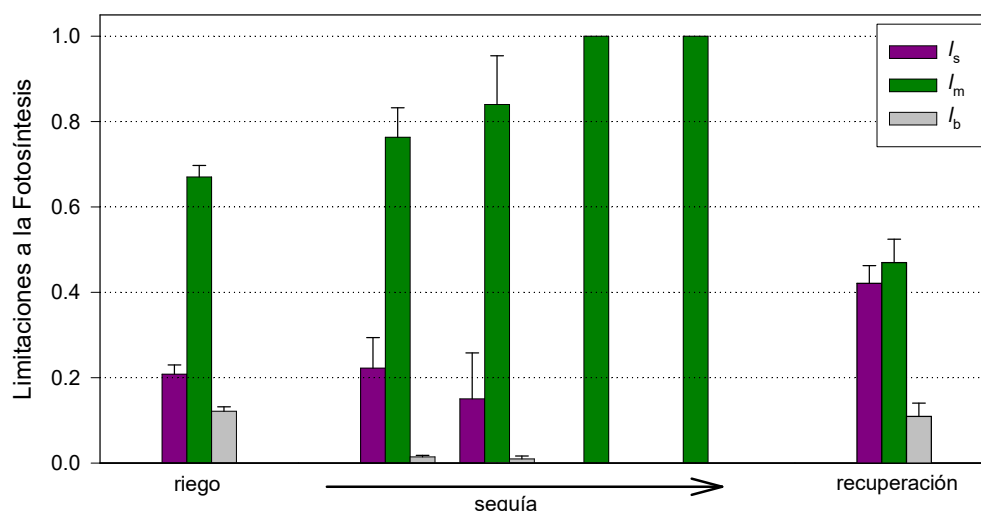


Figura 2.5 Limitaciones estomática (I_s), mesofílica (I_m) y bioquímica (I_b) a la fotosíntesis en hojas de encina bien regadas, con niveles crecientes de estrés por sequía y 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo. Los datos son la media $\pm$ error estándar.

2.3.3. Embolia nativa del xilema

Los niveles crecientes de estrés máximo diario por sequía (estimados a través de la medición de ψ_{MD}) indujeron una pérdida progresiva de la conductividad hidráulica en los brotes de encina, alcanzando valores de embolia nativa del xilema de alrededor del 50% al final del periodo de sequía. Este valor de embolia nativa se mantuvo casi constante durante 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo (aproximadamente 55%, **Figura 2.6**).

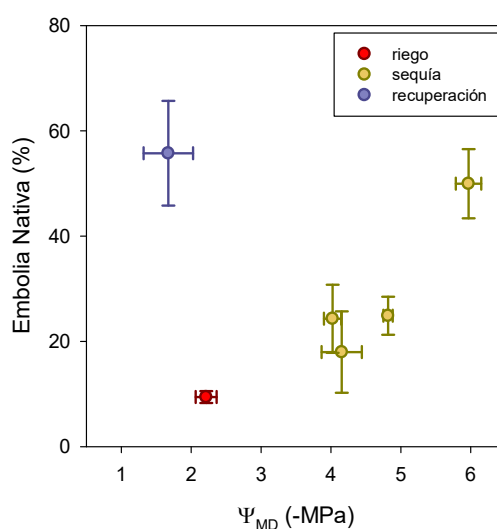


Figura 2.6 Evolución de la embolia nativa del xilema (%) con el potencial hídrico del mediodía (ψ_{MD}) para los brotes de encina bien regados (símbolos rojos), durante el periodo de sequía (símbolos amarillos) y 7 días

después de que las plantas fueran regadas de nuevo (símbolos violetas). Los datos son la media $\pm$ error estándar.

2.3.4. Ácido Abscísico

Los niveles crecientes de estrés por sequía indujeron un fuerte aumento de la concentración de ABA, alcanzando valores máximos en Ψ_{PD} entre -3 y -4 MPa (**Figura 2.7**). A pesar de que el ABA disminuyó progresivamente hasta el final del periodo de sequía, el valor residual después de que las plantas fueran regadas de nuevo fue mucho menor que el registrado durante todo el periodo de sequía, pero ligeramente superior al de las plantas bien regadas (**Figura 2.7**).

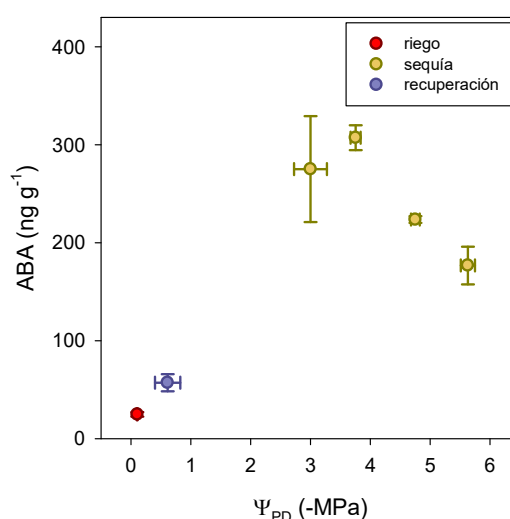


Figura 2.7 Evolución de la concentración de ácido abscísico (ABA, ng g⁻¹) respecto al potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{PD}) para hojas de encina bien regadas (símbolos rojos), durante el periodo de sequía (símbolos amarillos) y 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo (símbolos violetas). Los datos son la media $\pm$ error estándar.

2.4. Discusión

2.4.1. Periodo de sequía

Todos los parámetros fotosintéticos analizados para las hojas de encina se vieron reducidos drásticamente al aumentar los niveles de sequía, alcanzando valores casi insignificantes al final del periodo de sequía (**Figuras 2.3 y 2.4**). Así, la capacidad neta de asimilación del CO₂ (A_N) disminuyó progresivamente y llegó a ser negativa cuando el potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{PD}) fue de aproximadamente -5 MPa, tal y como se ha descrito previamente para esta especie (Peguero-Pina *et al.*, 2009). La caída experimentada por A_N a lo largo del periodo de sequía estuvo acompañada de fuertes reducciones para el resto de parámetros fotosintéticos, es decir, la conductancia estomática (g_s), la conductancia del mesófilo (g_m) y la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}). Estos resultados indican que tanto las limitaciones difusivas (estomáticas y mesofílicas) como las no difusivas (bioquímicas) de la fotosíntesis aumentaron a lo largo del periodo de sequía, lo que ayudó a explicar el patrón seguido por A_N . En relación a esto, se ha reportado

(Galle *et al.*, 2011) un comportamiento similar para A_N , g_s y g_m en encina cuando se somete a sequía, aunque estos autores encontraron que V_{cmax} no se vio afectada a lo largo del experimento.

Independientemente del incremento absoluto encontrado para todos los factores potencialmente limitantes de la fotosíntesis, el análisis de la partición de los diferentes componentes reveló que g_m fue el factor más limitante para la asimilación neta de CO_2 para las plantas bien regadas y durante todo el periodo de sequía (**Figura 2.5**), lo que confirma el importante papel de g_m en la capacidad fotosintética de la encina (Peguero-Pina *et al.*, 2017b). De hecho, la importancia relativa de la limitación del mesófilo (I_m) se incrementó gradualmente durante el periodo de sequía, desde 0,67 para las plantas bien regadas hasta 1,00 cuando la ψ_{PD} era de aproximadamente -5 MPa (**Figura 2.5**), coincidiendo con el momento en que A_N se volvió negativa (**Figura 2.3**).

Además de la respuesta de g_m , la respuesta encontrada en g_s bajo estrés por sequía también impuso una fuerte limitación a la captación de CO_2 . Como se indica en la Introducción, este es un mecanismo común en las plantas mediterráneas en respuesta a una reducción de la disponibilidad de agua en el suelo que se ha reportado para la encina (Peguero-Pina *et al.*, 2009). Los resultados encontrados en el presente estudio parecen indicar que el cierre estomático al inicio del periodo de sequía (cuando la ψ_{PD} era de aproximadamente -3 MPa) podría estar impulsado por el rápido aumento del ácido abscísico (ABA) (**Figura 2.7**), una hormona vegetal que inicia una señalización en cascada para cerrar los estomas y reducir la pérdida de agua (Munemasa *et al.*, 2015). Cabe destacar que, en esta fase, se produce una regulación a la baja de la conductancia estomática a nivel de toda la planta (g_{plant}) desde las primeras horas de la mañana hasta el mediodía (**Figura 2.2**), probablemente asociada a factores hidráulicos por efecto de la incipiente embolia del xilema (**Figura 2.7**). Posteriormente, la concentración de ABA mostró un ligero descenso hasta el final del periodo de sequía, tal y como se ha observado (Yan *et al.*, 2017) para *Amorpha fruticosa* y *Robinia pseudoacacia*. Además, los resultados derivados de este trabajo proporcionan evidencias de que incluso un cierre estomático casi completo (es decir, g_s por debajo de $0,030 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) no puede impedir una pérdida significativa de la conductividad hidráulica en el xilema (aproximadamente un 50% al final del periodo de sequía, **Figura 2.6**).

2.4.2. Recuperación

Los valores de ψ_{PD} para la encina se recuperaron de -5,6 MPa al final del periodo de sequía a -0,6 MPa 7 días después de volver a regar, aunque este valor fue ligeramente más negativo que el de las plantas bien regadas al principio del experimento (-0,1 MPa). Las tasas de recuperación mostraron importantes diferencias cuando se analizaron los distintos parámetros fotosintéticos. Así, g_m y V_{cmax} recuperaron los valores originales registrados para las plantas bien regadas (**Figura 2.4**, **Tabla 2.1**), lo que coincide con los resultados (Galle *et al.*, 2011) para la encina. Sin embargo, al contrario que nuestros resultados, estos autores encontraron que A_N y g_s en la encina recuperaron los valores de control incluso después de tres ciclos de sequía. De hecho, en el presente estudio solamente se registró una recuperación parcial de A_N después de un nuevo riego ($7,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3a**), y este valor fue significativamente distinto ($p < 0,05$, **Tabla 2.1**) cuando se comparó con el medido en plantas bien regadas ($10,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3a**). Este hecho puede explicarse por la baja g_s tras rehidratación ($0,084 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3b**), mucho menor ($p < 0,05$, **Tabla 2.1**) que el valor mostrado por las plantas bien regadas ($0,288 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3b**). Como resultado, las limitaciones estomáticas a la fotosíntesis (I_s) aumentaron significativamente después de la rehidratación, en comparación con los valores estimados tanto para las plantas bien regadas como para las plantas durante el periodo de sequía (**Figura 2.5**).

Tabla 2.1 Resultados de las pruebas t de Student realizadas para comparar los valores de fotosíntesis neta (A_N), conductancia estomática (g_s), conductancia del mesófilo (g_m) y velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}) para las plantas bien regadas antes del periodo de sequía y los medidos 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo. *: Valores significativos a $p < 0,05$.

	t-value	p-value
A_N	2,20	0,049*
g_s	4,38	0,001*
g_m	0,43	0,668
V_{cmax}	1,27	0,231

Estas aparentes discrepancias entre nuestros resultados y los mostrados por Galle *et al.* (2011) pueden explicarse teniendo en cuenta los diferentes niveles de estrés hídrico alcanzados cuando se comparan ambos estudios. Así, el potencial hídrico del mediodía (ψ_{MD}) en la encina sólo disminuyó hasta -2,9 MPa en Galle *et al.* (2011), mientras que en nuestro estudio, ψ_{MD} se acercó a -6 MPa al final del ciclo de sequía (**Figura 2.6**). Estas diferencias en ψ_{MD} entre ambos experimentos tendrían importantes consecuencias en cuanto a la pérdida de conductividad hidráulica del xilema. Efectivamente, encontramos que la embolia del xilema para los brotes de encina era de aproximadamente el 50% al final del periodo de sequía, mientras que el ψ_{MD} reportado por Galle *et al.* (2011) sólo induciría un nivel casi insignificante de embolia del xilema (aproximadamente un 10%) según nuestros datos y los publicados previamente por Peguero-Pina *et al.* (2014) para encinas de diferentes procedencias. La preservación de la integridad del transporte de agua por el xilema puede justificar la rápida recuperación de g_s encontrada para la encina por Gallé *et al.* (2011), una vez que el potencial hídrico fue restaurado a los valores de control. Por el contrario, el importante nivel de embolia del xilema y la falta de recuperación hidráulica (**Figura 2.6**), podrían explicar la fuerte regulación a la baja de g_s , incluso después de regar de nuevo, encontrada en nuestro estudio.

El papel de las limitaciones hidráulicas en la recuperación del intercambio gaseoso de las hojas, una vez rehidratadas tras un periodo de sequía, ha sido discutido en estudios anteriores (Yan *et al.*, 2017; Blackman *et al.*, 2009; Brodribb y Cochard, 2009). Así, Brodribb y Cochard (2009) encontraron una fuerte evidencia de que la limitación hidráulica era el proceso que gobernaba la recuperación del intercambio de gases de la sequía en coníferas con estrés hídrico. Por otro lado, Blackman *et al.* (2009) sugirieron que, además de las limitaciones hidráulicas, factores no hidráulicos como el ABA podrían estar también implicados en la limitación de la tasa de reapertura estomática, después de un nuevo riego, en cuatro especies de angiospermas leñosas nativas de Australia. Más recientemente, Yan *et al.* (2017) afirmaron, que la recuperación estomática en *Amorpha fruticosa* L. y *Robinia pseudoacacia* L., en la etapa de rehidratación, estaba principalmente mediada por factores hidráulicos, aunque también sugirieron, que las limitaciones no hidráulicas, podrían estar a su vez implicadas en la recuperación del intercambio de gases en *R. pseudoacacia*.

En nuestro caso, existen considerables evidencias, que apuntan hacia el papel predominante del modelo de limitación hidráulico-estomática propuesto por Brodribb y Cochard (2009), en la falta de recuperación de A_N encontrada en la encina. En primer lugar, las concentraciones de ABA tras el nuevo riego, estuvieron muy alejadas de las medidas durante el periodo de sequía, especialmente, respecto a los valores máximos

registrados cuando se produjo el cierre estomático (**Figura 2.7**). En segundo lugar, como se ha indicado anteriormente, g_m y V_{cmax} recuperaron completamente sus valores originales para las plantas bien regadas (**Figura 2.4**). Por tanto, estos factores no hidráulicos, no limitarían la recuperación de la actividad fotosintética de la encina. Por otro lado, la caída del potencial hídrico entre antes del amanecer y el mediodía ($\psi_{MD} - \psi_{PD}$), tras rehidratación (aproximadamente 1 MPa), fue mucho menor que para las plantas bien regadas (aproximadamente 2 MPa), lo que sugiere, una regulación a la baja de la transpiración de la planta (a través de una baja g_s), junto con una menor capacidad de transporte de agua a través del xilema hacia las hojas que transpiran (debido a la embolia del xilema), según el modelo propuesto por Oren *et al.* (1999). En este sentido, aunque varios autores han descrito una recuperación de la capacidad hidráulica, por reparación de la embolia tras la rehidratación (por ejemplo, Martorell *et al.*, 2014; Brodersen *et al.*, 2010; Yang y Tyree, 1992; Salleo *et al.*, 1996), éste, no parece ser el caso de la encina, al menos, cuando se alcanzan valores de potencial hídrico cercanos a PLC₅₀.

2.5. Conclusiones

La encina mostró un comportamiento conservador en el uso del agua cuando fue sometida a la sequía, principalmente asociado a un aumento del ABA que desencadenó el cierre estomático. Este hecho, junto con los fuertes descensos de g_m y V_{cmax} , limitó severamente la capacidad fotosintética de esta especie bajo un intenso estrés hídrico. A pesar de las mínimas pérdidas de agua, y de su gran resistencia a la cavitación inducida por la sequía, el estrés hídrico provocó un cierre estomático casi completo, y tasas de embolia del xilema cercanas a PLC₅₀. La recuperación parcial de A_N , encontrada tras la rehidratación, se debió principalmente a factores hidráulicos, que redujeron la g_s , para evitar la embolia masiva del xilema bajo eventos de sequía posteriores, que podrían comprometer la supervivencia de la planta. No obstante, la ocurrencia de episodios acumulados de sequía extrema, puede tener un efecto negativo en el rendimiento a largo plazo de la encina, debido a una menor capacidad de ganancia de carbono.

2.6. Bibliografía

- Aguadé, D., Poyatos, R., Rosas, T., Martínez-Vilalta, J., 2015. Comparative drought responses of *Quercus ilex* L. and *Pinus sylvestris* L. in a montane forest undergoing a vegetation shift. *Forests*, Issue 6, pp. 2505-2529.
- Blackman, C., Brodribb, T., Jordan, G., 2009. Leaf hydraulics and drought stress: Response, recovery and survivorship in four woody temperate plant species. *Plant Cell Environ.*, Issue 32, pp. 1584-1595.
- Brodersen, C., McElrone, A.J., Choat, B., Matthews, M.A., Shackel, K.A., 2010. The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiol.*, Volumen 154, pp. 1088-1095.
- Brodribb, T., Bowman, D.J.M.S., Nichols, S., Delzon, S., Burtlett, R., 2010. Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytol.*, Issue 188, pp. 533-542.
- Brodribb, T., Cochard, H., 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol.*, Issue 149, pp. 575-584.
- Busotti, F., Ferrini, F., Pollastrini, M., Fini, A., 2014. The challenge of Mediterranean sclerophyllous vegetation under climate change: From acclimation to adaptation. *Environ. Exp. Bot.*, Issue 103, pp. 80-98.

- Chen, J., Zhang, Q., Li, X., Cao, K., 2010. Gas exchange and hydraulics in seedlings of *Hevea brasiliensis* during water stress and recovery. *Tree Physiol.*, Issue 30, pp. 876-885.
- Cochard, H., Breda, N., Granier, A., 1996. Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: Evidence for stomatal control of embolism? *Ann. For. Sci.*, Issue 53, pp. 197-206.
- De Kauwe, M., Lin, Y.-S., Wright, I.J., Medlyn, B.E., Crous, K.Y., Ellsworth, D.S., Maire, V., Prentice, I.C., Atkin, O.K., Rogers, A., et al., 2016. A test of the 'one-point method' for estimating maximum carboxylation capacity from field-measured, light-saturated photosynthesis. *New Phytol.*, Issue 210, pp. 1130-1144.
- Flexas, J., Barbour, M.M., Brendel, O., Cabrera, H.M., Carriquí, M., Díaz-Espejo, A., Douthe, C., Dreyer, E., Ferrio, J.P., Gago, J., et al., 2012. Mesophyll conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci.*, pp. 193-194, 70-84.
- Flexas, J., Díaz-Espejo, A., Berry, J.A., Galmés, J., Cifre, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., Ribas-Carbó, M., 2007a. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: Quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *J. Exp. Bot.*, Issue 58, pp. 1533-1543.
- Flexas, J., Díaz-Espejo, A., Gago, J., Gallé, A., Galmés, J., Gulías, J., Medrano, H., 2014. Photosynthetic limitations in Mediterranean plants: A review. *Environ. Exp. Bot.*, Issue 103, pp. 12-23.
- Flexas, J., Ortuño, M.F., Ribas-Carbó, M., Díaz-Espejo, A., Flórez-Sarasa, I.D., Medrano, H., 2007b. Mesophyll conductance to CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, Issue 175, pp. 501-511.
- Galle, A., Florez-Sarasa, I., El Aououad, H., Flexas, J., 2011. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi-deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. *J. Exp. Bot.*, Issue 62, pp. 5207-5216.
- Galle, A., Haldimann, P., Feller, U., 2007. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New Phytol.*, Issue 174, pp. 799-810.
- Genty, B., Briantais, J., Baker, N., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, pp. 87-92.
- Gil-Pelegrín, E., Saz, M.A., Cuadrat, J.M., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017. Oaks under Mediterranean-type climates: Functional response to summer aridity. En: *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* Basel: Springer International Publishing, pp. 137-193.
- Grassi, G., Magnani, F., 2005. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ.*, Issue 28, pp. 834-849.
- Guadagno, C., Ewers, B.E., Speckman, H.N., Aston, T.L., Huhn, B.J., DeVore, S.B., Ladwig, J.T., Strawn, R.N., 2017. Dead or Alive? Using Membrane Failure and Chlorophyll a Fluorescence to Predict Plant Mortality from Drought. *Plant Physiol.*, Issue 175, pp. 223-234.
- Hacke, U., Sperry, J., Pittermann, J., 2000. Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah. *Basic Appl. Ecol.*, Issue 1, pp. 31-41.
- Harley, P., Loreto, F., Di Marco, G., Sharkey, T., 1992. Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by the analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiol.*, Issue 98, pp. 1429-1436.
- Hochberg, U., Rockwell, F., Holbrook, N., Cochard, H., 2018. Iso/Anisohydry: A Plant-Environment Interaction Rather Than a Simple Hydraulic Trait. *Trends Plant Sci.*, Issue 23, pp. 112-120.

- Klein, T., 2014. The variability of stomatal sensitivity to leaf water potential across tree species indicates a continuum between isohydric and anisohydric behaviours. *Funct. Ecol.*, Issue 28, pp. 1313-1320.
- Krall, J., Edwards, G., 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiol. Plant.*, Issue 86, pp. 80-187.
- Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Alpert, P., Artale, V., Li, L., Luterbacher, J., May, W., Trigo, R., Tsimplis, M., et al., 2006. The Mediterranean climate: An overview of the main characteristics and issues. En: *Mediterranean Climate Variability*. Amsterdam: Elsevier, pp. 1-26.
- Martorell, S., Diaz-Espejo, A., Medrano, H., Ball, M.C., Choat, B., 2014. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: Linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant Cell Environment*, Volumen 37, pp. 617-626.
- Mayr, S., Wieser, G., Bauer, H., 2006. Xylem temperatures during winter in conifers at the alpine timberline. *Agric. For. Meteorol.*, Issue 137, pp. 81-88.
- McDowell, N., 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiol.*, Issue 155, pp. 1051-1059.
- Montserrat-Martí, G., Camarero, J.J., Palacio, S., Pérez-Rontomé, C., Milla, R., Albuixech, J., Maestro, M., 2009. Summer-drought constrains the phenology and growth of two co-existing Mediterranean oaks with contrasting leaf habit: Implications for their persistence and reproduction. *Trees*, Issue 23, pp. 787-799.
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., Schroeder, J.I., 2015. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.*, Issue 28, pp. 154-162.
- Niinemets, Ü., Keenan, T., 2014. Photosynthetic responses to stress in Mediterranean evergreens: Mechanisms and MODELS. *Environ. Exp. Bot.*, Issue 103, pp. 24-41.
- Oren, R., Sperry, J.S., Katul, G.G., Pataki, D.E., Ewers, B.E., Phillips, N., Schäfer, K.V.R., 1999. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant Cell Environ.*, Issue 22, pp. 1515-1526.
- Pearcy, R., Schulze, E.-D., Zimmermann, R., 1989. Measurement of transpiration and leaf conductance. En: *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*. 1st ed ed. London: Chapman and Hall, pp. 137-160.
- Peguero-Pina, J.J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., Moya, I., 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia*, Issue 156, pp. 1-11.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Barrón, E., Camarero, J.J., Vilagrosa, A., Gil-Pelegrín, E., 2014. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.*, Issue 114, pp. 301-313.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.*, Issue 36, pp. 453-462.
- Peguero-Pina, J.J., Sisó, S., Fernández-Marín, B., Flexas, J., Galmés, J., García-Plazaola, J.I., Niinemets, Ü., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2016. Leaf functional plasticity decreases the water consumption without further consequences for carbon uptake in *Quercus coccifera* L. under Mediterranean conditions. *Tree Physiol.*, Issue 36, pp. 356-367.
- Peguero-Pina, J.J., Sisó, S., Flexas, J., Galmés, J., García-Nogales, A., Niinemets, Ü., Sancho-Knapik, D., Saz, M.Á., Gil-Pelegrín, E., 2017a. Cell-level anatomical characteristics explain high mesophyll conductance and photosynthetic capacity in sclerophyllous Mediterranean oaks. *New Phytol.*, Issue 214, pp. 585-596.

- Peguero-Pina, J.J.; Sisó, S., Flexas, J., Galmés, J., Niinemets, Ü., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2017b. Coordinated modifications in mesophyll conductance, photosynthetic potentials and leaf nitrogen contribute to explain the large variation in foliage net assimilation rates across *Quercus ilex* provenances. *Tree Physiol.*, Issue 37, pp. 1084-1094.
- Peñuelas, J., Sardans, J., Filella, I., Estiarte, M., Llusà, J., Ogaya, R., Carnicer, J., Bartrons, M., Rivas-Ubach, A., Grau, O., 2018. Assessment of the impacts of climate change on Mediterranean terrestrial ecosystems based on data from field experiments and long-term monitored field gradients in Catalonia. *Environ. Exp. Bot.*, Issue 152, pp. 49-59.
- Resco, V., Ewers, B.E., Sun, W., Huxman, T.E., Weltzin, J.F., Williams, D.G., 2009. Drought induced hydraulic limitations constrain leaf gas exchange recovery from drought after precipitation pulses in the C3 woody legume, *Prosopis velutina*. *New Phytol.*, Issue 181, pp. 672-682.
- Rundel, P., Jarrell, W., 1989. Water in the environment. En: *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*. 1st ed ed. London: Chapman and Hall.
- Salleo, S., Lo Gullo, M.A., De Paoli, D., Zippo, M., 1996. Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: A possible mechanism. *New Phytol.*, 132, 47–56.
- Sancho-Knapik, D., Sanz, M.Á., Peguero-Pina, J.J., Niinemets, Ü., Gil-Pelegrín, E., 2017. Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Ann. For. Sci.*, 74, 24.
- Schwalm, C.R., Anderegg, W.R.L., Michalak, A.M., Fisher, J.B., Biondi, F., Koch, G., Litvak, M., Ogle, K., Shaw, J.D., Wolf, A., *et al.*, 2017. Global patterns of drought recovery. *Nature*, 54, 202–205.
- Sperry, J.S., Donnelly, J.R., Tyree, M.T., 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ.*, 11, 35–40.
- Tomás, M., Flexas, J., Copolovici, L., Galmés, J., Hallik, L., Medrano, H., Ribas-Carbó, M., Tosens, T., Vislap, V., Niinemets, Ü., 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: Quantitative limitations and scaling up by models. *J. Exp. Bot.*, 64, 2269–2281.
- Tombesi, S., Nardini, A., Frioni, T., Soccolini, M., Zadra, C., Farinelli, D., Poni, S., Palliotti, A., 2015. Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Sci. Rep.*, 5, 12449.
- Turner, N.C., 1988. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.*, 9, 289–308.
- Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V.R., Gil-Pelegrín, E., 2003. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *J. Exp. Bot.*, 54, 2015–2024.
- Vilagrosa, A., Morales, F., Abadía, A., Bellot, J., Cochard, H., Gil-Pelegrín, E., 2010. Are symplast tolerance to intense drought conditions and xylem vulnerability to cavitation coordinated? An integrated analysis of photosynthetic, hydraulic and leaf level processes in two Mediterranean drought-resistant species. *Environ. Exp. Bot.*, 69, 233–242.
- Yan, W., Zheng, S., Zhong, Y., Shangguan, Z., 2017. Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. *Sci. Rep.*, 7, 4470.
- Yang, S., Tyree, M.T., 1992. A theoretical model of hydraulic conductivity recovery from embolism with comparison to experimental data on *Acer saccharum*. *Plant Cell Environ.*, 15, 633–643.

CAPÍTULO 3

**Los parámetros de fluorescencia de clorofila
y los índices de reflectancia de la hoja,
permiten monitorizar los cambios
en el estado fisiológico de *Quercus ilex* L.,
bajo déficit hídrico progresivo**

Resumen Capítulo 3

Las sequías extremas y los eventos de calor, producidos frecuentemente en los climas mediterráneos, inducen anomalías en los flujos de CO₂ ecosistema-atmósfera. Para mitigar las consecuencias sobre los bosques y la agricultura, los gestores deben tener un mejor conocimiento del ecosistema mediante el seguimiento del estado de las plantas. El estado hídrico se observa comúnmente midiendo el potencial hídrico, pero cuando el evento extremo ha terminado, este parámetro no puede mostrar a los gestores la recuperación de otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis. Para abordar este problema, se ha evaluado el estado hídrico y la capacidad fotosintética de *Quercus ilex* L. a lo largo de un evento intenso de estrés hídrico y una posterior rehidratación. La capacidad fotosintética se evaluó a través de los parámetros de fluorescencia de clorofila y los índices de reflectancia de la hoja. Se observó que todos los parámetros de fluorescencia cambiaron a medida que el potencial hídrico disminuía, y no se recuperaron completamente después de la rehidratación. Entre los índices de reflectancia, el índice de reflectancia fisiológico (IRP, en inglés *photochemical reflectance index*, PRI) varió de forma similar a la fluorescencia, obteniéndose una fuerte correlación con el *quenching* no fotoquímico (en inglés *non photochemical quenching*, NPQ). Se propuso utilizar el PRI para detectar el nivel de capacidad fotosintética en *Quercus ilex*, por su facilidad de manejo. También se concluyó que las sequías intensas y el estrés térmico no sólo podrían reducir la capacidad fotosintética a través de los cambios en los parámetros de fluorescencia de clorofila durante el periodo de estrés, sino que también podrían afectar a la capacidad fotosintética una vez recuperado el estado hídrico de la planta.

3.1. Introducción

Los eventos climáticos extremos, como las sequías y el estrés térmico, pueden inducir anomalías en los flujos de CO₂ entre el ecosistema y la atmósfera, que pueden modificar el balance neto de carbono de un ecosistema (Reichstein *et al.*, 2013; Frank *et al.*, 2015). Además, la combinación simultánea de ambos estreses, la sequía y el calor, conlleva una reducción del sumidero de C más fuerte que cualquier otro evento extremo por separado (Von Buttlar *et al.*, 2018). Desgraciadamente, ambos estreses se producen durante la época estival en aquellas zonas con climas de tipo mediterráneo como la cuenca mediterránea (Gil-Pelegrín *et al.*, 2017a). En estos ecosistemas, los modelos de cambio climático también predicen un aumento de estos eventos extremos (García-Mozo *et al.*, 2010), lo que aumentaría la escasez de agua (Iglesias *et al.*, 2007) y conduciría a una mayor regulación a la baja de la fotosíntesis neta (Farquhar y Sharkey, 1982) y a una severa reducción de la productividad primaria (Ciais *et al.*, 2005). Las consecuencias a corto plazo de esta reducción son el aumento de los episodios de decaimiento forestal (Rodríguez-Calcerrada *et al.*, 2017) y, en la agricultura, un uso más frecuente del riego para mantener la producción de los cultivos (Chaves *et al.*, 2007). *Quercus ilex* L., como especie arbórea clave de la cuenca mediterránea podría sufrir ambas consecuencias. Por un lado, esta especie es un roble muy extendido en el paisaje de la cuenca mediterránea (De Rigo y Caudullo, 2016) formando parte también de la llamada "dehesa" (Rodríguez-Estevez *et al.*, 2012). Por otro lado, la encina es comúnmente utilizada como productora de hongos comestibles del género *Tuber*, muy apreciados en la alta cocina (Reyna y García-Barreda, 2014; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017b).

Para mitigar las consecuencias de los eventos climáticos extremos en los bosques y la agricultura, los gestores deben tener un mejor conocimiento del ecosistema mediante el seguimiento del estado de las plantas (Sancho-Knapik *et al.*, 2010). En este sentido, el parámetro potencial hídrico (Ψ) (Barrs, 1968; Slavík, 1974) se utiliza globalmente para caracterizar el estado hídrico de las plantas (por ejemplo, Peguero-Pina *et al.*, 2015; Sancho-Knapik *et al.*, 2016, 2017). Sin embargo, una vez superada la escasez de agua, el Ψ sólo puede mostrar a los gestores la recuperación de las plantas en términos de agua, dejando sin conocer la recuperación de otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis. Para evitar este problema, es importante poner en práctica una monitorización del estado hídrico junto con otros métodos indirectos eficaces y fáciles de manejar.

El desarrollo de la teledetección hiperespectral ha permitido utilizar las señales de reflectancia de las hojas, tanto para estimar la concentración de agua en ellas (Peñuelas *et al.*, 1997a) como para cuantificar la química foliar en la vegetación (Gitelson y Merzlyak, 1996; Huang *et al.*, 2004; Asner *et al.*, 2005). De este modo, los cambios en los índices de reflectancia tales como el índice de reflectancia fisiológico (PRI), basado en los cambios en el grado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Morales *et al.*, 1990; Ruban y Young, 1993), se han utilizado para detectar el efecto del estrés por sequía en la capacidad fotosintética (Vicca *et al.*, 2016; Dobrowski *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2012). Sin embargo, otros índices como el índice de vegetación diferencial normalizado (en inglés *normalized difference vegetation index*, NDVI) que indican cambios en la concentración de clorofilas (Peguero-Pina *et al.*, 2008) no siempre muestran una clara correlación con el estrés hídrico de las plantas (Zhang *et al.*, 2017). Los cambios en la capacidad fotosintética también van acompañados de la emisión de fluorescencia de clorofila (ChlF), que regula el cambio entre una utilización eficiente de la luz solar, y un estado de disipación térmica (Horton *et al.*, 1996; Krause y Weis, 1991). Este fenómeno es cuantificable a partir de la medida del *quenching* no fotoquímico (NPQ) de la fluorescencia de la clorofila (Briantais *et al.*, 1979), que bajo estrés ambiental está asociado con la regulación a la baja de la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) (Zhang *et al.*, 2017; Demmig-Adams y Adams, 2006; Porcar-Castell, 2011; Verhoeven, 2014).

Teniendo en cuenta que el estado de la planta puede ser monitorizado de manera fácil y eficiente, tanto en términos de estado hídrico como de capacidad fotosintética, el objetivo de este trabajo es confirmar la relación del Ψ con los parámetros de fluorescencia y reflectancia, para encontrar los mejores índices relacionados con la capacidad fotosintética, capaces de complementar una medición más precisa del estado hídrico. La relación, se estudió durante un intenso periodo de déficit hídrico en el suelo, bajo condiciones extremas de temperatura, en *Q. ilex*, una especie particularmente importante en el paisaje forestal mediterráneo y en la agricultura. Además, también se investigó la recuperación de la planta midiendo su estado después de un nuevo riego.

La hipótesis era, que la mayoría de los parámetros utilizados en este estudio, cambiarían con una disminución del potencial hídrico. También se lanzó la hipótesis, que después de la rehidratación, el estado hídrico de la planta se recuperaría completamente, mientras que la capacidad fotosintética, estimada a través de los parámetros ChlF y reflectancia, no se recuperaría completamente.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Semillas de encina (*Q. ilex* subsp. *rotundifolia*) (procedencia "Soria", 41°46' N, 2°29' O, 1074 m sobre el nivel del mar, España) fueron sembradas y cultivadas en 2003 en contenedores de 0,5 L dentro de un invernadero bajo las mismas condiciones con una mezcla de 80% de compost (Neuhaus Humin Substrat N6; Klasman-Deilmann GmbH, Geeste, Alemania) y 20% de perlita. Tras el primer ciclo de crecimiento, las plántulas se trasplantaron a contenedores de 25 L llenos de la misma mezcla (4:1 compost:perlita) y se cultivaron desde entonces en el exterior en el CITA de Aragón (41°39' N, 0°52' O, Zaragoza, España) en condiciones mediterráneas (temperatura media anual 15,4 °C, precipitación total anual 298 mm). Se añadió periódicamente un fertilizante de liberación lenta (15:9:12 N:P:K, Osmocote Plus, Sierra Chemical, Milpitas, CA, USA) a la capa superior de 10 cm del sustrato (3 g L⁻¹ de sustrato de crecimiento). Todas las plantas se cultivaron en las mismas condiciones ambientales y se regaron por goteo cada dos días.

El experimento tuvo lugar durante el verano de 2017. Dos semanas antes del inicio del experimento, se colocaron diez plantas en maceta (14 años de edad), bajo un techo de plástico transparente que permitía el paso del 90% de la luz fotosintéticamente activa (~1800 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al mediodía, durante el experimento). El uso de las cubiertas en los experimentos de estrés hídrico, tiene la ventaja de realizar las mediciones en condiciones ambientales más controladas, evitando la rehidratación por tormentas o eventos de lluvia no deseados. El riego se interrumpió el 21 de agosto de 2017, y las mediciones en plantas bien regadas comenzaron el 22 de agosto de 2017. Durante los días siguientes, se realizaron mediciones cada dos o tres días con niveles crecientes de estrés por sequía. El estrés por sequía se impuso durante 20 días. Finalmente, después de la última medición en condiciones de estrés por sequía, las plantas se volvieron a regar y las mediciones se realizaron de nuevo después de 7 días. La temperatura del aire (T , °C) y la humedad relativa (HR, en inglés relative humidity, RH, %) se midieron en el sitio experimental utilizando un registrador de datos Hobo Pro temp/RH (Onset Computer, Bourne, MA, USA), situado a 1,30 m por encima de la superficie del suelo. Las mediciones se registraron cada 60 minutos durante agosto y septiembre de 2017. Los valores medios diurnos (desde el amanecer hasta la puesta del sol), de T y RH, la T máxima y la RH mínima de cada día durante este periodo se muestran en la **Figura 3.1**.

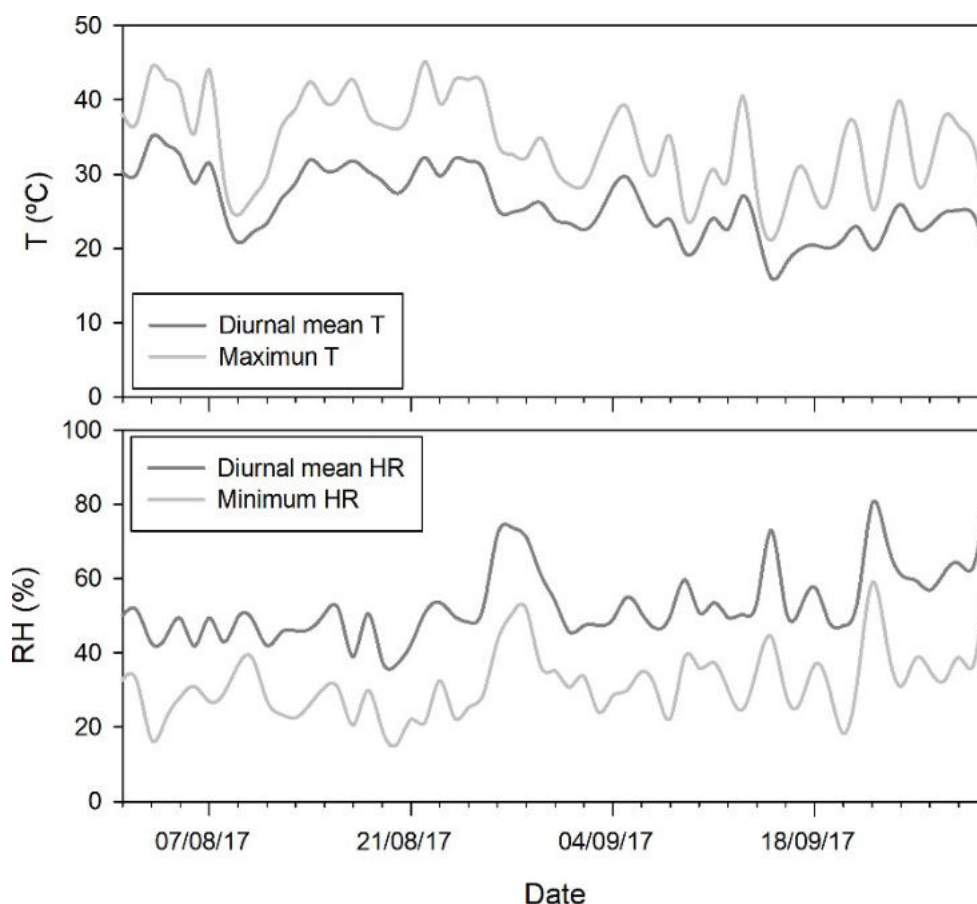


Figura 3.1 Condiciones climáticas del lugar durante el experimento.

3.2.2. Mediciones del potencial hídrico

Los potenciales hídricos foliares antes del amanecer y al mediodía (Ψ_{PD} y Ψ_{MD} , -MPa) se midieron en brotes de encina (con las hojas aún unidas a los brotes) con una cámara de presión Scholander siguiendo el procedimiento metodológico descrito por Turner (1988).

3.2.3. Fluorescencia de la clorofila

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila (ChlF) se midieron en las hojas de encina completamente desarrolladas, unidas al brote del año en curso, con un fluorímetro portátil de pulso modulado FMS II (Hansatech Instruments, Norfolk, Reino Unido). La ChlF inicial en la oscuridad (F_0) se midió antes del amanecer encendiendo la luz modulada (0,6 kHz); la densidad del flujo de fotones fotosintéticos en la superficie de la hoja era inferior a $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fluorescencia máxima de Chl en la oscuridad (F_M), se midió antes del amanecer (20 kHz), con un pulso de 0,8 s de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca. La F_0 se midió en presencia de luz roja lejana que oxida completamente el lado aceptor del fotosistema II (PSII) (Belkhodja *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1998). La fluorescencia de Chl en estado estacionario de fotosíntesis (F_S), se midió a media mañana (8 h de tiempo solar), y a mediodía (12 h de tiempo solar), y se utilizó un segundo pulso de luz blanca de alta intensidad, para determinar el máximo de ChlF en el estado adaptado a la luz (F'_M). A continuación, se cubrieron las hojas y se determinó el ChlF mínimo, tras la iluminación en presencia de luz roja lejana ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (F'_0).

El protocolo experimental para el análisis del *quenching* de ChlF fue esencialmente el descrito por Genty *et al.* (1989), con algunas modificaciones. Éstas implicaron las mediciones de F_0 y F'_0 , que se midieron en presencia de luz roja lejana ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para oxidar completamente el lado aceptor del PSII (Belkhdja *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1998). La máxima eficiencia potencial del PSII adaptado a la oscuridad se calculó como F_V/F_M (Morales *et al.*, 1991; Abadía *et al.*, 1999). La eficiencia real (ϕ_{PSII}) e intrínseca (ϕ_{exc}) del PSII se calculó como $(F'_M - F_S)/F'_M$ y F'_V/F'_M , respectivamente (Genty *et al.*, 1989; Harbinson *et al.*, 1989). El *quenching* fotoquímico (qP) se calculó como $(F'_M - F_S) / F'_V$ según van Kooten y Snel (1990). El NPQ se calculó como $(F_M/F'_M) - 1$ (Bilger y Björkman, 1990).

3.2.4. Reflectancia espectral

La reflectancia de la hoja se midió a media mañana (8 h de tiempo solar), y a mediodía (12 h de tiempo solar), en las hojas de encina completamente desarrolladas unidas al brote del año en curso, con un espectrorradiómetro visible/infrarrojo cercano USB-2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). Se conectó un cable de fibra óptica bifurcado al espectrorradiómetro en un extremo y a una fuente de luz halógena de tungsteno LS-1-LL (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) en el otro extremo. La reflectancia de la hoja se expresó como reflectancia espectral después de la normalización con el estándar blanco (Spectralon, Labsphere, North Sutton, NH, USA). El tiempo de integración fue de 200 ms. El índice de reflectancia fisiológico (PRI) se calculó como $(R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$, donde R_{531} y R_{570} representan, respectivamente, la reflectancia a 531 y 570 nm (Peguero-Pina *et al.*, 2008, 2013; Gamon *et al.*, 1997). El índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) se calculó como $(R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705})$, donde R_{750} y R_{705} representan, respectivamente, la reflectancia a 750 y 705 nm (Gitelson y Merzlyak, 1994; Richardson y Berlyn, 2002). El índice de agua (WI) se calculó como R_{970} / R_{900} , donde R_{970} y R_{900} representan, respectivamente, la reflectancia a 970 y 900 nm (Peñuelas *et al.*, 1993, 1996). La primera derivada de los espectros, se utilizó para estudiar la longitud de onda de la posición de la frontera del rojo (*red-edge*) (Filella y Peñuelas, 1994; Gitelson *et al.*, 1996).

3.2.5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias $\pm$ error estándar de al menos cinco mediciones individuales, cada una de ellas realizada en una planta diferente. Se utilizaron pruebas t de Student para comparar los valores medidos en plantas bien regadas antes del periodo de sequía y los medidos 7 días después de que las plantas fueran regadas de nuevo. Los valores se consideraron estadísticamente diferentes cuando los valores p eran inferiores a 0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con la versión 8.0 de SAS (SAS, Cary, NC, USA).

3.3. Resultados

3.3.1. Potencial hídrico

Las plantas comenzaron el periodo de déficit hídrico con un valor medio de potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{PD}) de $-0,1 \pm 0,0$ MPa. En este estado bien regado, el valor medio del potencial hídrico del mediodía (Ψ_{MD}) fue de $-2 \pm 0,2$ MPa. Al final del periodo de sequía, las plantas alcanzaron valores medios de Ψ_{PD} y Ψ_{MD} de $-7,0 \pm 0,2$ y $-7,5 \pm 0,2$ MPa respectivamente. Siete días después de la rehidratación de la planta, Ψ_{PD} y Ψ_{MD} volvieron a valores medios de Ψ menos negativos, es decir, $-0,6 \pm 0,2$ y $-1,7 \pm 0,4$ MPa respectivamente, recuperando el estado de plantas con buen riego.

3.3.2. Parámetros de fluorescencia de la clorofila

La eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M) tuvo un valor medio inicial de $0,81 \pm 0,00$ que se mantuvo constante desde $\Psi_{PD} = -0,1$ a $-3,0$ MPa (**Figura 3.2**). Por debajo de $-3,0$ MPa, F_V/F_M comenzó a disminuir hasta alcanzar un valor medio de $0,48 \pm 0,04$ a $\Psi_{PD} = -7$ MPa. Tras el rehidratado de las plantas, el valor medio de F_V/F_M aumentó hasta $0,75 \pm 0,01$, valor que fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$), al medido al principio del periodo seco, cuando las plantas tenían una $\Psi_{PD} = -0,1$ MPa.

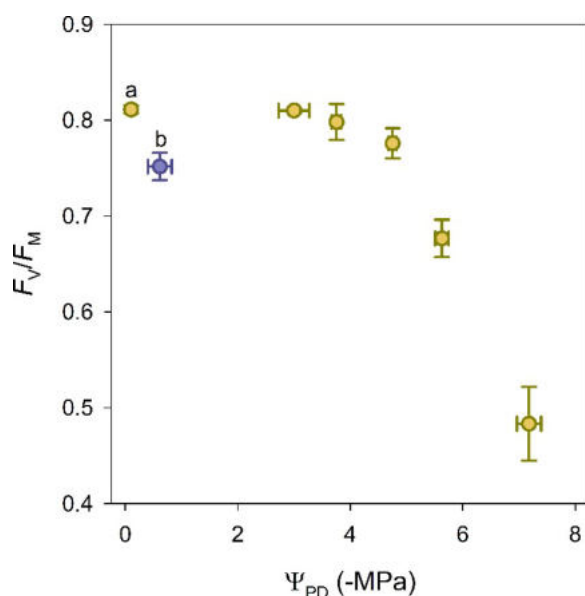


Figura 3.2 Relación del potencial hídrico de los brotes antes del amanecer (Ψ_{PD}) con la eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M). Los círculos amarillos y violetas son los valores medios $\pm$ error estándar ($n \geq 5$), medidos durante el periodo de déficit hídrico, y después del nuevo riego, respectivamente. Las letras minúsculas sobre los primeros puntos de valores medios amarillos y violetas, indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student, $p < 0,05$).

Los valores medios de la eficiencia real (ϕ_{PSII}) e intrínseca (ϕ_{exc}) del PSII y del *quenching* fotoquímico (qP), medidos a media mañana fueron constantes entre $\Psi_{PD} = -0,1$ y $-3,0$ MPa. De $-3,0$ MPa a $-7,0$ MPa, los tres parámetros disminuyeron: ϕ_{PSII} disminuyó de $0,48 \pm 0,05$ a $0,06 \pm 0,01$, ϕ_{exc} de $0,56 \pm 0,06$ a $0,21 \pm 0,02$ y qP disminuyó de $0,84 \pm 0,03$ a $0,31 \pm 0,04$ (**Figura 3.3**). Al mediodía, la relación entre Ψ_{MD} y estos parámetros, mostró una disminución continua de sus valores medios a lo largo del rango de potencial hídrico observado (de -2 a $-7,5$ MPa): ϕ_{PSII} disminuyó de $0,51 \pm 0,00$ a $0,08 \pm 0,00$, ϕ_{exc} de $0,59 \pm 0,02$ a $0,16 \pm 0,03$ y qP disminuyó de $0,87 \pm 0,02$ a $0,48 \pm 0,04$ (**Figura 3.3**). Los valores medios de ϕ_{PSII} y qP se incrementaron tras la rehidratación, tanto a media mañana como a mediodía, alcanzando valores medios superiores a $0,2$ y $0,5$, respectivamente. Por el contrario, ϕ_{exc} no mostró ninguna recuperación. En cuanto a las relaciones entre Ψ y el *quenching* no fotoquímico (NPQ), tampoco hubo cambios en los valores medios de NPQ en las primeras secciones de las curvas (de $\Psi_{PD} = -0,1$ a $-3,0$ MPa y de $\Psi_{MD} = -2,0$ a $-4,0$ MPa), tanto medidos a media mañana como a mediodía. En las segundas secciones (por debajo de $\Psi_{PD} = -3,0$ MPa y de $\Psi_{MD} = -4,0$ MPa), los valores medios de NPQ aumentaron de $1,2 \pm 0,3$ a $4,9 \pm 0,6$ a media mañana y de $3,1 \pm 0,0$ a $6,1 \pm 0,8$ a mediodía. Tras el rehidratado de la planta, los valores medios de NPQ bajaron a $4,3 \pm 0,3$ a media mañana y a $5,0 \pm 0,7$ a mediodía (**Figura 3.3**). Los valores de recuperación de estos parámetros de fluorescencia (excluyendo el qP medido a mediodía), fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), a los medidos al inicio del experimento (**Figura 3.3**).

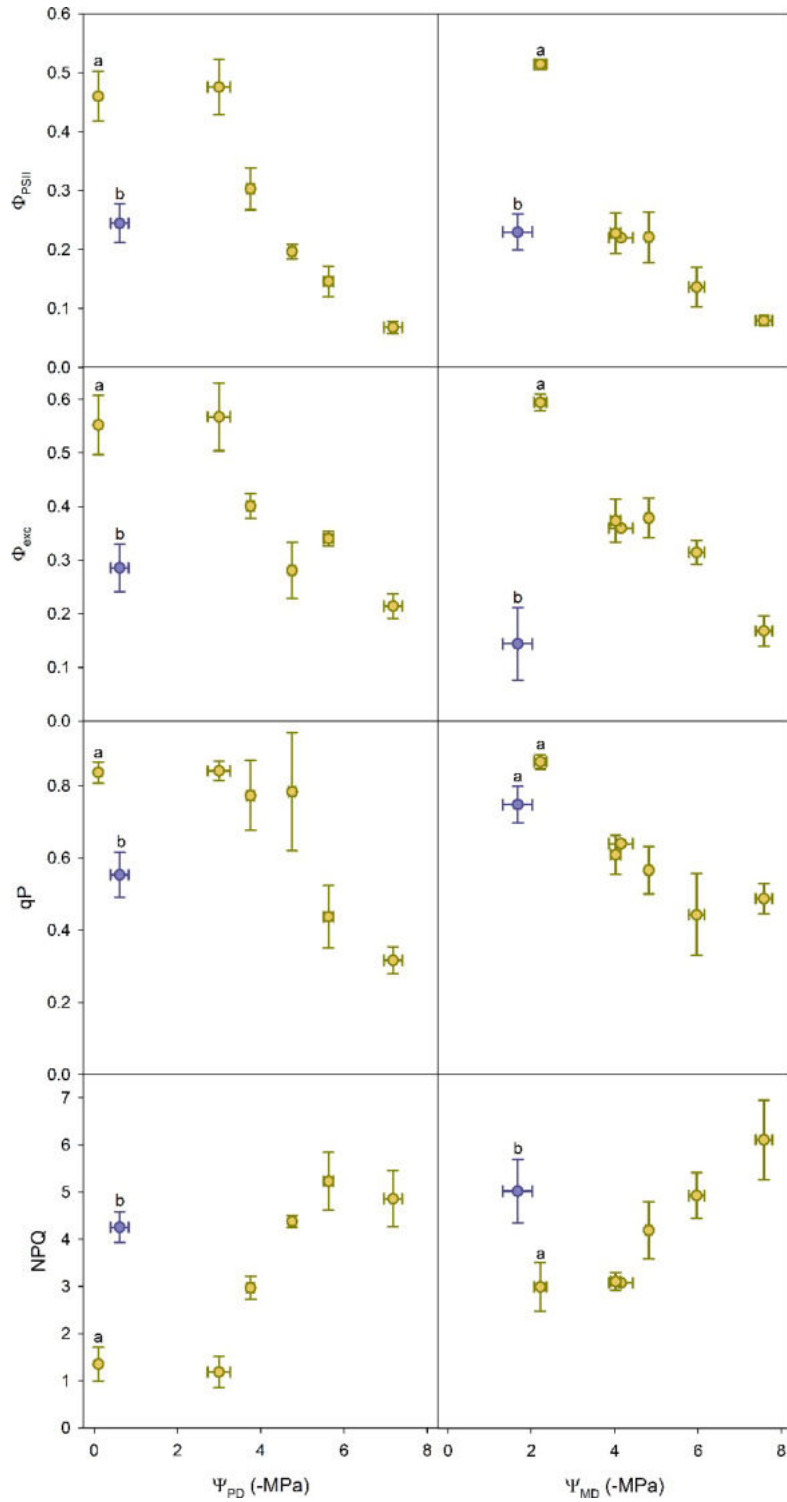


Figura 3.3 Relaciones del potencial hídrico de los brotes antes del amanecer y del mediodía (Ψ_{PD} , Ψ_{MD}) con los parámetros de fluorescencia de la clorofila (ChlF): eficiencia real (Φ_{PSII}) e intrínseca (Φ_{exc}) del PSII, *quenching* fotoquímico (qP) y *quenching* no fotoquímico (NPQ). Los parámetros de ChlF medidos a media mañana se asociaron a Ψ_{PD} , mientras que los medidos a mediodía se relacionaron con Ψ_{MD} . Los círculos amarillos y violetas son los valores medios $\pm$ error estándar ($n \geq 5$), medidos durante el periodo de déficit hídrico del suelo, y después del rehidratado, respectivamente. Las letras minúsculas sobre los primeros puntos de valores medios amarillos y violetas, indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student, $p < 0,05$).

3.3.3. Índices de reflectancia

El índice de reflectancia fisiológico (PRI), medido a media mañana, se mantuvo constante desde un estado bien hidratado ($\Psi_{PD} = -0,1$ MPa), hasta un valor de Ψ_{PD} aproximadamente $-3,0$ MPa. Por debajo de este valor de Ψ_{PD} , el PRI medido a media mañana, descendió de $0,01 \pm 0,00$ a $-0,02 \pm 0,00$, valor que se mantuvo constante a valores más negativos de Ψ_{PD} . El PRI medido a mediodía, siguió un patrón similar: un valor medio constante de $0,01 \pm 0,01$ de $-2,0$ a $-4,0$ MPa y un descenso a aproximadamente $-0,04 \pm 0,01$ a $\Psi_{MD} = -7,5$ MPa (**Figura 3.4**). Tras el rehidratado de la planta, los valores medios del PRI a media mañana y a mediodía, fueron de $-0,02 \pm 0,01$, valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) a los medidos al inicio del periodo seco.

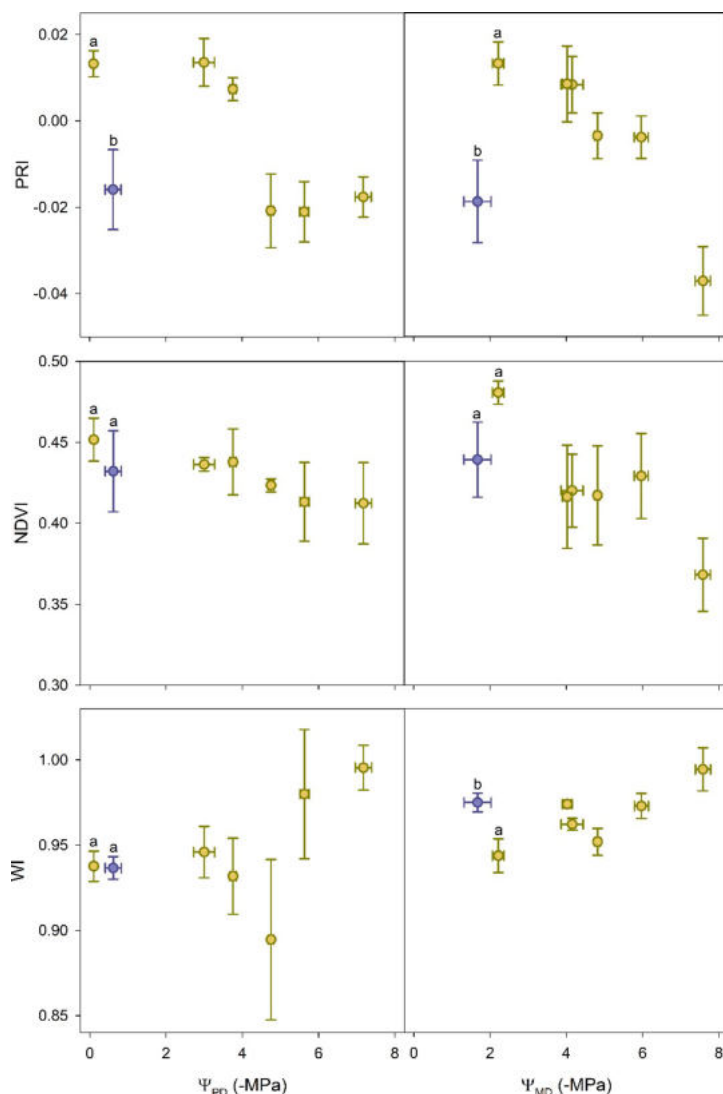


Figura 3.4 Relaciones del potencial hídrico de los brotes antes del amanecer y al mediodía (Ψ_{PD} , Ψ_{MD}) con los índices de reflectancia: índice de reflectancia fisiológico (PRI), índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) e índice de agua (WI). Los índices de reflectancia medidos a media mañana se asociaron a Ψ_{PD} , mientras que los medidos a mediodía se relacionaron con Ψ_{MD} . Los círculos amarillos y violetas son los valores medios $\pm$ error estándar ($n \geq 5$), medidos durante el periodo de déficit hídrico del suelo, y después del rehidratado, respectivamente. Las letras minúsculas sobre los primeros puntos de valores medios amarillos y violetas, indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student, $p < 0,05$).

El índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) a media mañana disminuyó ligeramente de un valor medio de $0,45 \pm 0,01$ (a $\Psi_{PD} = -0,1$ MPa) a $0,41 \pm 0,02$ (a $\Psi_{PD} = -7,0$ MPa). La disminución al mediodía, fue un poco más notable, pasando de $0,48 \pm 0,01$ a $0,37 \pm 0,02$. Los valores medios tras el rehidratación, alcanzaron $0,43 \pm 0,02$ tanto a media mañana como a mediodía (**Figura 3.4**). Estos valores no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) a los medidos al inicio del periodo seco.

El valor medio del índice hídrico (WI) aumentó ligeramente a medida que descendía Ψ , desde $0,94 \pm 0,01$ hasta $0,99 \pm 0,01$, tanto a media mañana como a mediodía. Tras el rehidratado de la planta, los valores medios del WI fueron $0,94 \pm 0,01$ a media mañana (no es estadísticamente diferente de la medida a $\Psi_{PD} = 0,1$), y $0,97 \pm 0,01$ a mediodía (estadísticamente diferente a la medida en $\Psi_{PD} = 0,1$, $p < 0,05$).

Finalmente, la posición del *red-edge* no mostró ninguna variación con los cambios en el potencial hídrico (datos no mostrados).

3.4. Discusión

3.4.1. Respuesta al déficit hídrico

Los niveles elevados de déficit hídrico en el suelo impuestos en este estudio causaron una severa reducción del potencial hídrico de los brotes, tanto antes del amanecer (Ψ_{PD}) como al mediodía (Ψ_{MD}), alcanzando valores cercanos a los encontrados en rodales naturales durante la sequía estival (Limousin *et al.*, 2010). Esta reducción se ha relacionado con éxito con la variación de varios parámetros de fluorescencia de la clorofila (ChlF) (eficiencia potencial máxima del PSII (F_V/F_M); la eficiencia real (ϕ_{PSII}) e intrínseca (ϕ_{exc}) del PSII; *quenching* fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ)), confirmando resultados similares a los encontrados en estudios anteriores (Zhang *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017). Como estos parámetros de fluorescencia pueden ser considerados como un proxy de la capacidad fotosintética (Horton *et al.*, 1996; Krause *et al.*, 1991), el valor de Ψ_{PD} a partir del cual los parámetros comenzaron a cambiar (aproximadamente -3 MPa), podría ser el umbral a partir del cual las tasas de asimilación de CO_2 de *Quercus ilex*, podrían disminuir significativamente, reduciendo la productividad primaria e induciendo anomalías en los flujos de CO_2 árbol-atmósfera (Reichstein *et al.*, 2013; Frank *et al.*, 2015). De hecho, Peguero-Pina *et al.* (2009), midieron tasas de asimilación de CO_2 insignificantes a -3 MPa para *Quercus ilex*, mostrando también resultados similares en F_V/F_M , ϕ_{PSII} y qP. Este umbral, obtenido con parámetros de fluorescencia, fue también detectado en *Robinia pseudoacacia* y *Amorpha fruticosa* (Yan *et al.*, 2017), cuya disminución inicial en F_V/F_M , también coincidió con el comienzo de las tasas de asimilación de CO_2 insignificantes. Sin embargo, F_V/F_M en *Quercus suber* no mostró una clara variación con Ψ_{PD} (Peguero-Pina *et al.*, 2009), lo que implica que no siempre los parámetros de fluorescencia de Chl funcionan como proxy de la capacidad de fotosíntesis.

Los cambios en ChlF también se han relacionado con cambios en los índices de reflectancia en estudios anteriores (Peguero-Pina *et al.*, 2008, 2013; Peñuelas *et al.*, 1997b; Méthy, 2000). Los resultados de este estudio confirman dicha relación ya que se encontró un aumento en los valores de NPQ con una disminución en el índice de reflectancia fisiológico (PRI) durante el incremento progresivo de la escasez de agua ($R^2 = 0,80$, $p < 0,05$, **Figura 3.5**). Otros trabajos también han encontrado buenas correlaciones entre PRI y NPQ para *Vitis vinifera* (Evain *et al.*, 2004) y *Quercus coccifera* (Peguero-Pina *et al.*, 2008). Esta relación, era esperable porque ambos parámetros reflejan en muchos casos procesos de fotoprotección, relacionados con la generación de un gradiente de pH trans-tilacoidal, y/o la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Peguero-Pina *et al.*, 2013). De hecho, el PRI se ha correlacionado directamente, con diversas

variables relacionadas con la fotosíntesis (Goerner *et al.*, 2008; Garbulsky *et al.*, 2011; Tsonev *et al.*, 2014). La variación de Ψ_{PD} con PRI (**Figura 3.5**), fue similar a las encontradas para los parámetros de ChlF (**Figura 3.4**), incluyendo la detección del mismo punto umbral en $\Psi_{PD} = -3$ MPa. También se han encontrado variaciones, en PRI con cambios en el estado hídrico de la encina, por parte de Tsonev *et al.* (2014) y Zhang *et al.* (2017). Sin embargo, estos autores encontraron que los valores de PRI en condiciones de sequía severa, se mantuvieron bastante estables. Los resultados del presente estudio confirmaron parcialmente esta afirmación, ya que los valores de PRI medidos a media mañana, se mantuvieron constantes por debajo de aproximadamente $\Psi_{PD} = -4,5$, mientras que el PRI medido a mediodía siguió disminuyendo (**Figura 3.4**). Los otros índices de reflectancia utilizados en este estudio (índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI); índice de agua (WI); posición del *red-edge*), mostraron relaciones más débiles y ruidosas con Ψ . Además, estos índices no mostraron correlaciones con los parámetros de fluorescencia (datos no mostrados), indicando una peor relación con la capacidad de fotosíntesis. De hecho, estudios previos en encina, mostraron que el WI no era muy sensible a los cambios en el contenido de agua de la hoja, durante las primeras etapas del proceso de secado (Peñuelas *et al.*, 1997), y el NDVI, no estaba correlacionado con las tasas de fotosíntesis neta a nivel de hoja (Zhang *et al.*, 2017; Garbulsky *et al.*, 2013). Por el contrario, la posición del *red-edge*, medida en pino, estaba fuertemente correlacionada con la concentración de clorofila (Curran *et al.*, 1995), y era capaz de distinguir los pinos sanos de los que estaban en decaimiento (Zarco-Tejada *et al.*, 2018). A pesar de que el NDVI y la posición del *red-edge* están altamente relacionados con los cambios en la concentración de clorofila (Filella y Peñuelas, 1994; Gitelson *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2008), la falta de cambios inducidos por la sequía en la concentración de clorofila mostrada por *Quercus ilex*, (tal y como describe Peguero-Pina *et al.*, 2009) puede ayudar a explicar la falta de relación entre el NDVI, y la posición del *red-edge*, con los parámetros de fluorescencia.

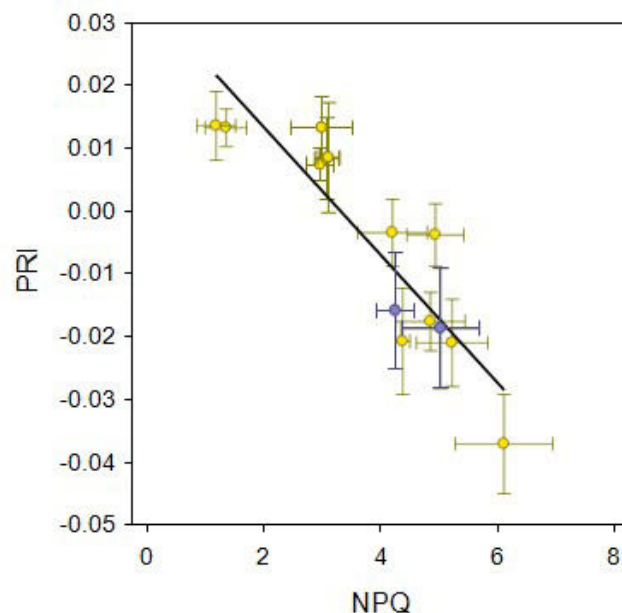


Figura 3.5 Relación entre los valores medios ($\pm$ error estándar) del *quenching* no fotoquímico (NPQ) y el índice de reflectancia fisiológico (PRI), medidos a lo largo del periodo de déficit hídrico del suelo (amarillo) y después del rehidratado (violeta). Se incluyen los valores medios de media mañana y mediodía.

3.4.2. Recuperación después de la escasez de agua

El nivel de estrés por sequía impuesto en este estudio, puede inducir en *Quercus ilex* una pérdida del 80% de la conductividad del xilema (Peguero-Pina *et al.*, 2014). A pesar de esta posible pérdida, el Ψ después de un nuevo riego, indicó una completa recuperación del estado hídrico de la planta, lo cual coincide con lo publicado previamente para otras especies (Yan *et al.*, 2017; Peguero-Pina *et al.*, 2014; Gallé *et al.*, 2007; Martorell *et al.*, 2014). Por el contrario, la capacidad fotosintética, estimada a través de los parámetros de fluorescencia de Chl, no mostró una recuperación completa, indicando una posible reducción en las tasas de fijación de CO₂ tras el estrés hídrico. Con respecto a esto, Galmés *et al.* (2007), también mostraron una recuperación parcial de la fotosíntesis neta en otras 10 especies de plantas mediterráneas, después de una sequía severa. En cuanto a los índices de reflectancia, la recuperación parcial del PRI, fue similar a la recuperación parcial del NPQ, lo que respalda la relación encontrada en la **Figura 3.5**. Los otros índices de reflectancia (NDVI, WI, *red-edge*), mostraron en la mayoría de los casos una recuperación completa, probablemente debido a su menor cambio, confirmando de nuevo, la falta de relación con los parámetros de fluorescencia de Chl encontrada previamente durante el periodo de sequía.

La no recuperación de la actividad de ChlF después de un evento de estrés hídrico intenso en la especie perennifolia *Quercus ilex*, podría implicar, no sólo una reducción de la productividad primaria durante el evento de estrés, sino, también una reducción después del evento de estrés, cuando las plantas se rehidrataron. La eficiencia en el uso del agua del ecosistema en estos casos, sería muy baja, y el flujo de entrada del CO₂ a la planta, se reduciría hasta un nuevo crecimiento de las hojas.

3.5. Conclusiones

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila, como estimadores de la capacidad fotosintética, variaron con la disminución del potencial hídrico durante un periodo de sequía en *Quercus ilex*. Uno de estos parámetros, el *quenching* no fotoquímico (NPQ), se correlacionó con el índice de reflectancia fisiológico (PRI), cuyos valores también cambiaron con el aumento de la escasez de agua. Ambos parámetros tenían un punto umbral alrededor de -3 MPa, que podría indicar el comienzo de tasas de fotosíntesis netas insignificantes. Después de volver a regar, el estado hídrico de la planta se restableció por completo, mientras que los parámetros de fluorescencia, y el PRI, no recuperaron los valores iniciales. Es decir, las sequías intensas y el estrés térmico, no sólo podrían reducir la capacidad fotosintética de la encina durante el periodo de estrés, sino que también podrían afectar a la capacidad fotosintética una vez recuperado el estado hídrico de la planta. Teniendo en cuenta que el PRI mostró la misma tendencia que los parámetros de fluorescencia de clorofila (ChlF), y que la medición del PRI es mucho más fácil de manejar que la de ChlF, se propone utilizar el PRI para detectar el nivel de capacidad de fotosíntesis en *Quercus ilex*, y de esta manera, complementar las mediciones de Ψ durante los eventos de sequía.

3.6. Bibliografía

- Abadía, J., Morales, F., Abadía, A., 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil*, 215, 183–192.
- Asner, G.P., Carlson, K.M., Martin, R.E., 2005. Substrate age and precipitation effects on Hawaiian forest canopies from spaceborne imaging spectroscopy. *Remote. Sens. Environ.*, 98, 457–467.
- Barrs, H.D., 1968. Determination of water deficits in plant tissues. In *Water Deficits and Plant Growth*; Kozlowski, T.T., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA; Volume 1, pp. 235–368.

- Belkhodja, R., Morales, F., Quílez, R., López-Millán, A.F., Abadía, A., Abadía, J. 1998. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res.*, 56, 265–276.
- Bilger, W., Björkman, O., 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.*, 25, 173–185.
- Briantais, J.M., Verrotte, C., Picaud, M., Krause, G.H., 1979. A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 548, 128–138.
- Chaves, M.M., Santos, T.P., Souza, C.R., Ortuño, M.F., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2007. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Ann. Appl. Biol.*, 150, 237–252.
- Ciais, P., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogee, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchmann, N., Bernhofer, C., Carrara, A., et al., 2005. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, 437, 529–533.
- Curran, P.J., Dungan, J.L., Gholz, H.L., 1995. Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll concentration in slash pine leaves. *Tree Physiol.*, 15, 203–206.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., 2006. Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.*, 172, 11–21.
- De Rigo, D., Caudullo, G., 2016. *Quercus ilex* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*; San-Miguel-Ayán, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., Eds.; Publication Office of the European Union: Luxembourg, 2016; pp. 130–131. ISBN 978-92-79-36740-3.
- Dobrowski, S.Z., Pushnik, J.C., Zarco-Tejada, P.J., Ustin, S.L. 2005. Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sens. Environ.*, 97, 403–414.
- Evain, S., Flexas, J., Moya, I., 2004. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Remote Sens. Environ.*, 91, 175–185.
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33, 317–345.
- Filella, I., Peñuelas, J., 1994. The red edge position and shape as indicators of plant chlorophyll content, biomass and hydric status. *Int. J. Remote Sens.*, 15, 1459–1470.
- Frank, D., Reichstein, M., Bahn, M., Frank, D., Mahecha, M.D., Smith, P., Thonicke, K., van der Velde, M., Vicca, S., Babst, F., et al., 2015. Effects of climate extremes on the terrestrial carbon cycle: concepts, processes and potential future impacts. *Glob. Change Biol.*, 2, 2861–2880.
- Gallé, A., Haldimann, P., Feller, U., 2007. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New Phytol.*, 174, 799–810.
- Galmés, J., Medrano, H., Flexas, J., 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol.*, 175, 81–93.
- Gamon, J.A., Serrano, L., Surfus, J.S., 1997. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia*, 112, 492–501.

- Garbulsky, M.F., Peñuelas, J., Ogaya, R., Filella, I., 2013. Leaf and stand-level carbon uptake of a Mediterranean forest estimated using the satellite-derived reflectance indices EVI and PRI. *Int. J. Remote Sens.*, 34, 1282–1296.
- Garbulsky, M.F., Peñuelas, J., Gamon, J.A., Inoue, Y., Filella, I., 2011. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies: A review and meta-analysis. *Remote Sens. Environ.*, 115, 281–297.
- García-Mozo, H., Mestre, A., Galán, C., 2010. Phenological trends in southern Spain: A response to climate change. *Agric. For. Meteorol.*, 150, 575–580.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 87–92.
- Gil-Pelegrín, E., Saz, M.A., Cuadrat, J.M., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017a. Oaks under mediterranean-type climates: functional response to summer aridity. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L.*, 1st ed.; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland; pp. 137–194. ISBN 978-3-319-69098-8.
- Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017b. Oaks and people: a long journey together. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L.*, 1st ed.; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland; pp. 1–11. ISBN 978-3-319-69098-8.
- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., Lichtenthaler, H.K., 1996. Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm. *J. Plant Physiol.*, 148, 501–508.
- Gitelson, A., Merzlyak, M.N., 1996. Signature analysis of leaf reflectance spectra: algorithm development for remote sensing of chlorophyll. *J. Plant. Physiol.*, 148, 494–500.
- Gitelson, A., Merzlyak, M.N., 1994. Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves: spectral features and relation to chlorophyll estimation. *J. Plant Physiol.*, 143, 286–292.
- Goerner, A., Reichstein, M., Rambal, S., 2008. Estimation of photosynthetic light use efficiency in semi-arid ecosystems with the MODIS-derived photochemical reflectance index. In *Proceedings of the 2008 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium*, Boston, MA, USA, 7–11 July; Volume 3, pp. 756–758.
- Harbinson, J., Genty, B., Baker, N.R., 1989. Relationship between the quantum efficiencies of Photosystems I and II in pea leaves. *Plant Physiol.*, 90, 1029–1034.
- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G., 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 655–684.
- Huang, Z., Turner, B.J., Dury, S.J., Wallis, I.R., Foley, W.J., 2004. Estimating foliage nitrogen concentration from HYMAP data using continuum removal analysis. *Remote. Sens. Environ.*, 93, 18–29.
- Iglesias, A., Garrote, L., Flores, F., Moneo, M., 2007. Challenges to manage the risk of water scarcity and climate change in the Mediterranean. *Water Resour. Manag.*, 21, 775–788.
- Krause, G., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313–349.
- Limousin, J.M., Longepierre, D., Huc, R., Rambal, S., 2010. Change in hydraulic traits of Mediterranean *Quercus ilex* subjected to long-term throughfall exclusion. *Tree Physiol.*, 30, 1026–1036.
- Martorell, S., Diaz-Espejo, A., Medrano, H., Ball, M.C., Choat, B., 2014. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant Cell Environ.*, 37, 617–626.

- Méthy, M., 2000. Analysis of photosynthetic activity at the leaf and canopy levels from reflectance measurements: A case study. *Photosynthetica*, 38, 505–512.
- Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J., 1998. Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron deficient sugar beet leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, 403–412.
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.*, 97, 886–893.
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.*, 94, 607–613.
- Moreno, A., Maselli, F., Gilabert, M.A., Chiesi, M., Martínez, B., Seufert, G., 2012. Assessment of MODIS imagery to track light-use efficiency in a water-limited Mediterranean pine forest. *Remote Sens. Environ.*, 123, 359–367.
- Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., Morales, F., 2013. Three pools of zeaxanthin in *Quercus coccifera* leaves during light transitions with different roles in rapidly reversible photoprotective energy dissipation and photoprotection. *J. Exp. Bot.*, 64, 1649–1661.
- Peguero-Pina, J.J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., Moya, I., 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia*, 156, 1–11.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Barrón, E., Camarero, J.J., Vilagrosa, A., Gil-Pelegrín, E., 2014. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.*, 114, 301–313.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Martín, P., Saz, M.A., Gea-Izquierdo, G., Cañellas, I., Gil-Pelegrín, E., 2015. Evidence of vulnerability segmentation in a deciduous Mediterranean oak (*Quercus subpyrenaica* E. H. del Villar). *Trees*, 29, 1917–1927.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.*, 36, 453–462.
- Peñuelas, J., Filella, I., Serrano, L., Savé, R., 1996. Cell wall elasticity and Water Index (R970 nm/R900 nm) in wheat under different nitrogen availabilities. *Int. J. Remote Sens.*, 17, 373–382.
- Peñuelas, J., Filella, I., Biel, C., Serrano, L., Savé, R., 1993. The reflectance at the 950–970 nm region as an indicator of plant water status. *Int. J. Remote Sens.*, 14, 1887–1905.
- Peñuelas, J., Llusia, J., Pinol, J., Filella, I., 1997a. Photochemical reflectance index and leaf photosynthetic radiation-use-efficiency assessment in Mediterranean trees. *Int. J. Remote Sens.*, 18, 2863–2868.
- Peñuelas, J., Piñol, J., Ogaya, R., Filella, I., 1997b. Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970). *Int. J. Remote Sens.*, 18, 2869–2875.
- Porcar-Castell, A., 2011. A high-resolution portrait of the annual dynamics of photochemical and non-photochemical quenching in needles of *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.*, 143, 139–153.
- Reichstein, M., Bahn, M., Ciais, P., Frank, D., Mahecha, M.D., Seneviratne, S.I., Zscheischler, J., Beer, C., Buchmann, N., Frank, D.C., et al., 2013. Climate extremes and the carbon cycle. *Nature*, 500, 287–295.
- Reyna, S., García-Barreda, S., 2014. Black truffle cultivation: A global reality. *For. Syst.*, 23, 317–328.
- Richardson, A.D., Berlyn, G.P., 2002. Spectral reflectance and photosynthetic properties of *Betula papyrifera* (*Betulaceae*) leaves along an elevational gradient on Mt. Mansfield, Vermont, USA. *Am. J. Bot.*, 89, 88–94.

- Rodríguez-Calcerrada, J., Sancho-Knapik, D., Martin-StPaul, N.K., Limousin, J.M., McDowell, N.G., Gil-Pelegrín, E., 2017. Drought-induced oak decline-Factors involved, physiological dysfunctions, and potential attenuation by forestry practices. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*, 1st ed.; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland; pp. 419–451. ISBN 978-3-319-69098-8.
- Rodríguez-Estevez, V., Sanchez-Rodríguez, M., Arce, C., García, A.R., Perea, J.M., Gomez-Castro, A.G., 2012. Consumption of acorns by finishing iberian pigs and their function in the conservation of the Dehesa Agroecosystem. In *Agroforestry for Biodiversity and Ecosystem Services—Science and Practice*; Kaonga, M., Ed.; IntechOpen: London, UK; pp. 1–22. ISBN 978-953-51-0493-3.
- Ruban, A.V., Young, A.J., Horton, P., 1993. Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. *Plant Physiol.*, 102, 741–750.
- Sancho-Knapik, D., Gómez Álvarez-Arenas, T., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2010. Air-coupled broadband ultrasonic spectroscopy as a new non-invasive and non-contact method for the determination of leaf water status. *J. Exp. Bot.*, 61, 1385–1391.
- Sancho-Knapik, D., Medrano, H., Peguero-Pina, J.J., Mencuccini, M., Fariñas, M.D., Gómez Álvarez-Arenas, T., Gil-Pelegrín, E., 2016. The application of leaf ultrasonic resonance to *Vitis vinifera* L. suggests the existence of a diurnal osmotic adjustment subjected to photosynthesis. *Front. Plant Sci.*, 7, 1601.
- Sancho-Knapik, D., Sanz, M.A., Peguero-Pina, J.J., Niinemets, Ü., Gil-Pelegrín, E., 2017. Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Ann. For. Sci.*, 74, 24.
- Slavík, B., 1974. *Methods of Studying Plant Water Relations*; Springer: Berlin, Germany; ISBN 3-540-06686-1.
- Sun, P., Wahbi, S., Tsonev, T., Haworth, M., Liu, S., Centritto, M., 2014. On the use of leaf spectral indices to assess water status and photosynthetic limitations in *Olea europaea* L. during water-stress and recovery. *PLoS ONE*, 9, e105165.
- Tsonev, T., Wahbi, S., Sun, P., Sorrentino, G., Centritto, M., 2014. Gas exchange, water relations and their relationships with photochemical reflectance index in *Quercus ilex* plants during water stress and recovery. *Int. J. Agric. Biol.*, 16, 335–341.
- Turner, N.C., 1988. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.*, 9, 289–308.
- van Kooten, O., Snel, J.H.F., 1990. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. *Photosynth. Res.*, 25, 147–150.
- Verhoeven, A., 2014. Sustained energy dissipation in winter evergreens. *New Phytol.*, 201, 57–65.
- Vicca, S., Balzarolo, M., Filella, I., Granier, A., Herbst, M., Knohl, A., Longdoz, B., Mund, M., Nagy, Z., Pintér, K., et al., 2016. Remotely-sensed detection of effects of extreme droughts on gross primary production. *Sci. Rep.*, 6, 1–13.
- Von Buttlar, J., Zscheischler, J., Rammig, A., Sippel, S., Reichstein, M., Knohl, A., Jung, M., Menzer, O., Altaf Arain, M., Buchmann, N., et al., 2018. Impacts of droughts and extreme-temperature events on gross primary production and ecosystem respiration: A systematic assessment across ecosystems and climate zones. *Biogeosciences*, 15, 1293–1318.
- Wu, C., Niu, Z., Tang, Q., Huang, W., 2008. Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation. *Agric. For. Meteorol.*, 148, 1230–1241.
- Yan, W., Zheng, S., Zhong, Y., Shangguan, Z., 2017. Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. *Sci. Rep.*, 7, 1–12.

- Zarco-Tejada, P.J., Hornero, A., Hernández-Clemente, R., Beck, P.S.A., 2018. Understanding the temporal dimensión of the red-edge spectral region for forest decline detection using high-resolution hyperspectral and Sentinel-2a imagery. *J. Photogramm. Remote Sens.*, 137, 134–148.
- Zhang, C., Preece, C., Filella, I., Farré-Armengol, G., Peñuelas, J., 2017. Assessment of the response of photosynthetic activity of mediterranean evergreen oaks to enhanced drought stress and recovery by using PRI and R690/R630. *Forests*, 8, 386.

CAPÍTULO 4

**El déficit de presión de vapor de agua
limita la transpiración y la fotosíntesis
en *Quercus ilex* L.:
una comparación de tres métodos
durante la sequía estival.**

Resumen Capítulo 4

Las altas tasas de déficit de presión de vapor de agua (DPV, en inglés *vapor pressure deficit*, VPD) pueden disminuir gravemente la productividad de las plantas al reducir la conductancia estomática, lo que podría agravarse durante los periodos estivales en climas mediterráneos debido al déficit hídrico del suelo. En este estudio, se monitoriza la respuesta de *Quercus ilex*, el arquetipo de árbol mediterráneo, a los cambios en el VPD durante el verano para evaluar los efectos y consecuencias de ambos estreses hídricos (atmosférico y edáfico) en el intercambio de gases. Para ello se realizaron mediciones en árboles de una plantación experimental durante dos veranos consecutivos con déficit hídrico moderado, utilizando tres métodos diferentes: a nivel de hoja con un analizador de gases, utilizando una cámara de planta entera para un seguimiento a corto plazo a nivel de árbol, y midiendo la temperatura de la copa para un seguimiento a largo plazo. Los tres métodos proporcionaron relaciones negativas entre el VPD y la conductancia foliar con discrepancias probablemente asociadas a la escala de medición. En general, los resultados mostraron que el estrés hídrico atmosférico y el del suelo tenían un efecto aditivo. Bajo un óptimo estado hídrico del suelo, un aumento del VPD se vio parcialmente compensado por una reducción de la conductancia estomática, lo que dio lugar a un ligero aumento de las tasas de transpiración. Con déficit hídrico en el suelo, la respuesta al VPD se tradujo en una mayor disminución de la conductancia estomática, reduciendo la transpiración como estrategia de ahorro de agua. La disminución de la conductancia en respuesta al VPD fue transitoria, recuperándose los valores iniciales tan pronto como el VPD disminuyó, tanto en óptimas condiciones hídricas del suelo como en sequía. Debido a esta alta sensibilidad a la sequía atmosférica, las tasas máximas de ganancia de carbono de la encina se vieron restringidas a un rango ambiental reducido, lo que podría modular su rendimiento fisiológico y su distribución natural.

4.1. Introducción

La atmósfera de la Tierra está experimentando un aumento global de la sequedad como resultado de un aumento de la demanda atmosférica de evaporación o el llamado déficit de presión de vapor de agua (en inglés *vapor pressure deficit*, VPD, kPa), que se prevé que aumente aún más a medida que se intensifique el cambio climático (Jung *et al.*, 2010; Ficklin y Novick, 2017; Dai *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021). Brevemente, el VPD está determinado por dos componentes: i) la capacidad de retención de vapor de agua del aire (presión de vapor de saturación), que es proporcional a la temperatura, y ii) la presión de vapor, que es la cantidad real de vapor de agua en la atmósfera (Barkhordarian *et al.*, 2019). Esta dependencia de dos variables climáticas estándar, hace que el VPD sea un parámetro clave que determine la transpiración de las plantas y la productividad de los ecosistemas (Seager *et al.*, 2015; Ficklin y Novick, 2017; López *et al.*, 2021). Valores altos de VPD pueden reducir el crecimiento de la vegetación (Ding *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019), aumentar el declive de los bosques (Carnicer *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2013; Restaino *et al.*, 2016), disminuir el rendimiento de los cultivos (Lobell *et al.*, 2014), aumentar la incidencia de los incendios forestales (Williams *et al.*, 2014; Seager *et al.*, 2015) o afectar al ciclo de los ecosistemas del agua y del carbono (McDowell y Allen, 2015). Además, estos efectos negativos son especialmente relevantes en ambientes áridos y semiáridos como las zonas mediterráneas, ya que las plantas en este tipo de clima no solo tienen que hacer frente regularmente a valores de VPD superiores a 4 kPa, sino también a sequías estivales que promueven el déficit hídrico del suelo durante la estación cálida (Iglesias *et al.*, 2007; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017; Peguero-Pina *et al.*, 2020).

La base mecanicista que explica la reducción de la productividad desencadenada por el aumento del VPD, ya sea solo o en combinación con el déficit hídrico del suelo, se ha asociado a las limitaciones fotosintéticas resultantes de la disminución de la conductancia estomática (g_s) (Mediavilla y Escudero, 2003, 2004; McDowell y Allen, 2015; Grossiord *et al.*, 2020). Esta capacidad de modificar g_s con cambios en el VPD también se ha considerado la forma predominante de regulación del intercambio de gases durante el día (McAdam y Brodribb, 2015, 2016). En entornos con limitaciones hídricas, donde la diferencia de VPD entre las primeras horas de la mañana y el mediodía puede ser superior a 2 kPa (Bellot *et al.*, 2002; Barradas *et al.*, 2004), la capacidad de cerrar los estomas al mediodía podría considerarse una estrategia de ahorro de agua para evitar la pérdida excesiva de agua por transpiración, pero a costa de reducir la ganancia de carbono (Tatarinov *et al.*, 2016; Peguero-Pina *et al.*, 2020).

Para evaluar la transpiración y la ganancia de carbono de las plantas ante un determinado estrés se están utilizando diferentes métodos como el uso de analizadores de gases infrarrojos (von Caemmerer y Farquhar, 1981), la termometría por infrarrojos (Jones, 1999) o métodos gravimétricos (Capítulo 2 de la presente Tesis). Entre estos métodos, la medición de la respuesta de intercambio de gases de hojas individuales con un sistema analizador de gases por infrarrojos (IRGA) es una de las técnicas más utilizadas por su sencillez y facilidad de manejo (Alonso-Forn *et al.*, 2021; López *et al.*, 2021). Sin embargo, presenta algunas desventajas. En primer lugar, las condiciones en el interior de la cámara suelen ser diferentes a las del exterior, por lo que para monitorizar las respuestas ambientales de la planta, las mediciones deben realizarse a los pocos segundos de cerrar la cámara de hojas. Incluso utilizando un sistema IRGA con control ambiental completo dentro de la cámara, no es sencillo imitar las condiciones externas. En segundo lugar, las mediciones se realizan en una sola hoja y requieren múltiples réplicas para ser extrapoladas a toda la copa. Estos problemas pueden resolverse utilizando una cámara para toda la planta (Liu *et al.*, 2000; Sancho-Knapik *et al.*, 2016) que monitoriza la respuesta de toda la copa, pudiendo diferir de la respuesta a escala foliar (Bonan *et al.*, 2021). El mayor inconveniente de este sistema es su complejidad a la hora de

monitorizar árboles de gran tamaño o su portabilidad en sitios de difícil acceso. Finalmente, otro conjunto de técnicas incluye la estimación de la respuesta de las plantas al estrés mediante teledetección cerca de la superficie (Sancho-Knapik *et al.*, 2010; Capítulo 3 de la presente Tesis, y referencias en los mismos). Entre estas otras técnicas, el uso de la termometría por infrarrojos para monitorizar la temperatura del dosel puede ser utilizado para la estimación de la conductancia estomática (Andrews *et al.*, 1992; Jones, 1992; Sepulcre-Canto *et al.*, 2007). Este método se basa en la disminución de la disipación de energía de la hoja y el consiguiente aumento de la temperatura de la hoja, provocado por el cierre estomático que se produce cuando las plantas están sometidas a estrés hídrico (Jones, 1999). El método se ha utilizado en gran medida para controlar los campos de cultivo y en la programación del riego. Su principal limitación es la necesidad de medir o estimar otras variables ambientales (Hippes *et al.*, 1985). En particular, la diferencia de temperatura entre la hoja y el aire no sólo depende del efecto refrigerante de la transpiración, sino también de la velocidad del viento, la rugosidad de la superficie y la radiación neta (Jones, 1999).

En este estudio se investiga la respuesta del intercambio de gases a la sequía en la encina (*Quercus ilex* L.), una especie clave de hoja perenne en el paisaje de la cuenca mediterránea. La encina se considera una especie tolerante a la sequía, pero destaca por una estrategia de ahorro de agua en respuesta al estrés hídrico, tanto edáfico como atmosférico, en comparación con otros robles, lo que resulta en un alto control estomático de las pérdidas de agua, como se evidencia en escalas horarias y estacionales (Tenhunen *et al.*, 1981; Acherar y Rambal 1992; Mediavilla y Escudero, 2003, 2004; Aguadé *et al.*, 2015; Peguero-Pina *et al.*, 2020; Alonso-Forn *et al.*, 2021). Sin embargo, pocos estudios tratan la dinámica a corto plazo de la respuesta estomática al estrés hídrico atmosférico, particularmente con la interacción con el estrés hídrico del suelo. Teniendo en cuenta esto, se plantea la hipótesis de que la respuesta al VPD de la encina, en términos de conductancia estomática, estaría modulada por las condiciones hídricas del suelo. En condiciones de buen riego, la conductancia estomática de la encina se reduciría transitoriamente bajo estrés hídrico atmosférico, contrarrestando el aumento de la transpiración debido a un mayor VPD. Por el contrario, en condiciones de déficit hídrico del suelo, la conductancia estomática (ya limitada por la sequía edáfica) sería comparativamente menos sensible al VPD. Como consecuencia de la respuesta estomática, también se plantea la hipótesis de que la sequía atmosférica por sí misma contribuiría negativamente al balance global de carbono de la encina. Para ello, se han monitorizado árboles de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* creciendo en una plantación experimental (donde los árboles reciben riego y mantenimiento) durante los veranos de 2018 y 2019 utilizando los tres métodos propuestos anteriormente: intercambio de gases a nivel de hoja con una cubeta foliar, intercambio de gases a nivel de árbol medido con una cámara para toda la planta, y termometría infrarroja del dosel. En este capítulo se abordan tres objetivos principales: (1) comparar y evaluar los tres métodos para monitorizar la respuesta de la planta a los cambios en el VPD; (2) evaluar la interacción del estrés hídrico del suelo y atmosférico sobre la conductancia estomática y la transpiración de *Quercus ilex*; y (3) estudiar las consecuencias de ambos estreses sobre la ganancia de carbono.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Condiciones experimentales y material vegetal

El estudio tuvo lugar en una parcela experimental situada en el CITA de Aragón (41°39' N, 0°52' O, Zaragoza, España) durante los veranos de 2018 y 2019, bajo condiciones climáticas mediterráneas (temperatura media anual 15,4 °C, precipitación total anual 298 mm; ver patrones climáticos anuales en la **Figura 4.1**). La parcela experimental es una plantación de encinas destinada en primer lugar a la producción de trufas, donde la

profundidad total del suelo es de unos 60 cm. Los ejemplares de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* utilizados en este estudio tenían 25 años de edad, siendo plantados en 1998 con un marco de 6x6 m. Los árboles se mantienen en buenas condiciones sanitarias, siendo regados con aspersores ($35\text{--}40\text{ L m}^{-2}$) cada semana de abril a septiembre, y podados cada dos años durante el invierno para obtener árboles con copas homogéneas de forma redondeada. La altura de los árboles era de unos 3 m, el diámetro de la proyección ortogonal de la copa oscilaba entre 2,0 y 2,5 m, y el porcentaje de cobertura de la copa sobre la superficie del suelo era de aproximadamente el 14 %. Dos veces al año (a principios del invierno y a principios del verano), la parcela experimental se limpia mecánicamente, eliminando la presencia del estrato herbáceo y arbustivo.

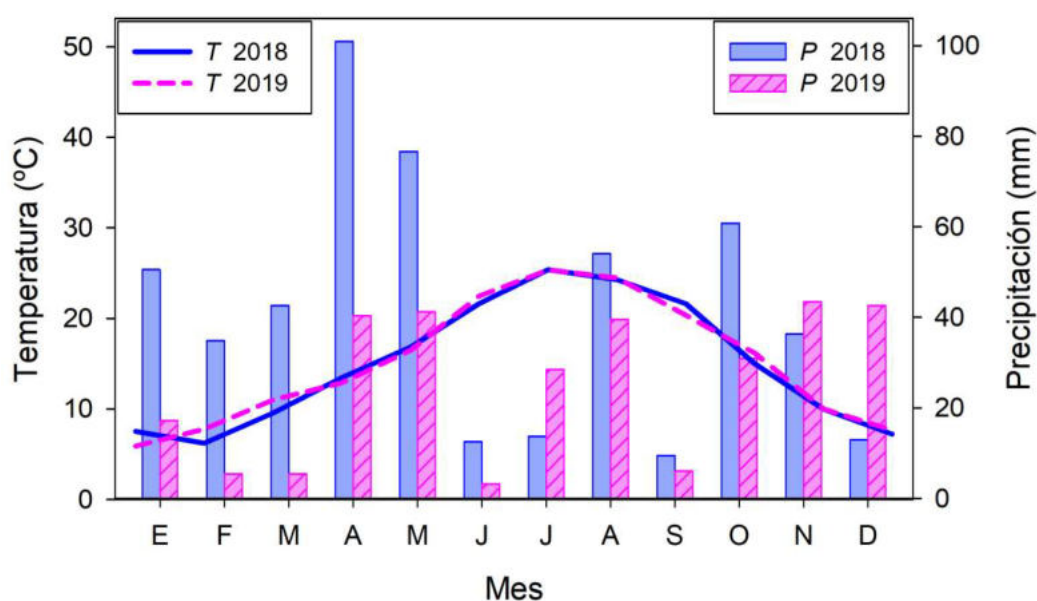


Figura 4.1 Patrones climáticos anuales en 2018 y 2019 de la zona de estudio. T, temperatura; P, precipitación. Datos obtenidos de la estación climática más cercana ($41,722^\circ\text{ N}$, $0,812^\circ\text{ O}$, Zaragoza, España).

En ambos veranos, el riego se interrumpió a mediados de junio (antes del seguimiento) para permitir que se desarrollaran las condiciones de sequía. Durante las semanas siguientes se realizó un seguimiento de la planta a nivel de árbol (con la cámara vegetal) en 2018, y a nivel de hoja (con la cubeta foliar) y de dosel (con la termometría infrarroja) en 2019. No se observaron diferencias en los patrones climáticos estivales entre 2018 y 2019 (**Figura 4.1**). Además, se evaluó el mismo rango de VPD y de condiciones hídricas del suelo.

Durante los experimentos se consideraron dos estados hídricos del suelo: condiciones de buen riego y de déficit hídrico. El umbral de potencial hídrico entre ambos se fijó en $-0,5\text{ MPa}$ ya que a partir de este valor *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* comienza a cerrar los estomas, según Alonso-Forn *et al.* (2021). Así, las condiciones de buen riego del suelo se refieren a los árboles que crecían con un potencial hídrico de la planta medido al amanecer (Ψ_{pd}) o potencial hídrico del suelo (PHS, en inglés *soil water potential*, SWP) entre 0 y $-0,5\text{ MPa}$, mientras que las condiciones de déficit hídrico del suelo (o condiciones de estrés hídrico del suelo) fueron aquellas con un Ψ_{pd} o SWP entre $-0,5$ y $-2,0\text{ MPa}$. Los árboles experimentaron estas condiciones moderadas de déficit hídrico en el suelo durante aproximadamente 3 semanas, tanto en el verano de 2018 como en el de 2019.

4.2.2. Mediciones de intercambio de gases a nivel foliar

Las mediciones de intercambio de gases a nivel foliar se realizaron periódicamente durante el verano de 2019 con un sistema de intercambio de gases abierto (CIRAS-3, PP-Systems, Amesbury, MA, USA) equipado con una cubeta foliar universal automática (PLC6-U, PP-Systems, Amesbury, MA, USA). Al final del experimento, se llegó a un total de 12 días de medición: 6 días en condiciones de buen riego y otros 6 en condiciones de déficit hídrico del suelo. Las mediciones se realizaron por la mañana (entre las 7:30 y las 10:00 h, hora solar) y al mediodía (entre las 11:00 y las 14:00 h), en hojas expuestas al sol, completamente desarrolladas y del año en curso, situadas en la exposición sur del dosel inferior (a unos 1,30 m del suelo). Se seleccionaron al azar entre 3 a 5 hojas por cada uno de los 3 especímenes de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* utilizados en el seguimiento por infrarrojos (véase la sección 2.4 de este capítulo). La concentración controlada de CO₂ en la cubeta fue de 400 mol⁻¹ y la densidad de flujo fotónico fotosintético saturado fue de 1500 μmol m⁻² s⁻¹. El VPD dentro de la cubeta de la hoja se ajustó para que coincidiera con el valor atmosférico. Cabe señalar que el ajuste de los valores de VPD inferiores a 1,5 y superiores a 3,5 KPa, requirió varios minutos y no siempre se alcanzó. Antes de las mediciones de intercambio de gases, se midió el potencial hídrico de la planta antes del amanecer (Ψ_{pd}) con una cámara de presión tipo Scholander siguiendo el procedimiento metodológico descrito por Turner (1988).

4.2.3. Mediciones de intercambio de gases a nivel de toda la planta

Las mediciones a nivel de planta completa se realizaron en 2018 utilizando una cámara de planta completa (descrita a continuación) para monitorizar, uno tras otro, 6 ejemplares diferentes de *Quercus ilex*. En primer lugar, justo después de detener el riego (a mediados de junio), se monitorizaron en las dos semanas siguientes 4 árboles en condiciones de buen riego. Después, tres semanas más tarde (hacia finales de julio), se monitorizaron otros 2 árboles en condiciones de déficit hídrico del suelo. Cada monitorización de árboles duró 24 h. Como resultado, se monitorizaron 6 árboles durante 24 h cada uno. El potencial hídrico de la planta antes del amanecer (Ψ_{pd}) se midió el día anterior a cada monitorización, en brotes de encina con una cámara de presión tipo Scholander. También se registró la radiación fotosintética activa (RFA, en inglés *photosynthetic active radiation*, PAR) con un sensor cuántico QSO (Apogee Instruments, Logan, USA).

La cámara para toda la planta (**Figura 4.2**) consistió en una lámina de teflón FEP (copolímero de etileno-propileno fluorado) enrollada y fijada en un marco cilíndrico de aluminio (diámetro, $d = 200$ cm; altura, $h = 180$ cm) terminado en un cono superior abierto (base $d = 200$ cm, $h = 100$ cm; agujero abierto $d = 50$ cm). Se utilizó teflón FEP por su baja permeabilidad a líquidos y gases y su excelente transmisión (entre el 90 y el 95%) en el rango infrarrojo y visible del espectro solar (Liu *et al.*, 2000). Para facilitar la instalación y la portabilidad, la cámara se construyó en dos mitades que se atornillaron a una base de PVC (220 x 220 cm). Para acomodar el tronco y los tubos de entrada de aire se hicieron 3 agujeros circulares en la base: uno en el centro ($d = 20$ cm) para el tronco, y otros dos ($d = 15$ cm) dispuestos en esquinas opuestas, para cada uno de los tubos de entrada de aire. La base también se cortó por la mitad a través de la abertura del agujero del tronco para poder abrirla y cerrarla en torno al tronco. Se colocó una funda de espuma de celulosa, para realizar el sellado del agujero alrededor del tronco, lo que permitió que la base de la cámara comprimiera la funda y formara un sello hermético alrededor del tronco. Este diseño separa el árbol del suelo para eliminar los efectos de la respiración del suelo y de las raíces en las determinaciones de CO₂ (Miller *et al.*, 1996). Por último, la unión entre la cámara y la base también se selló con una cinta adhesiva de polímero para garantizar la máxima estanqueidad.

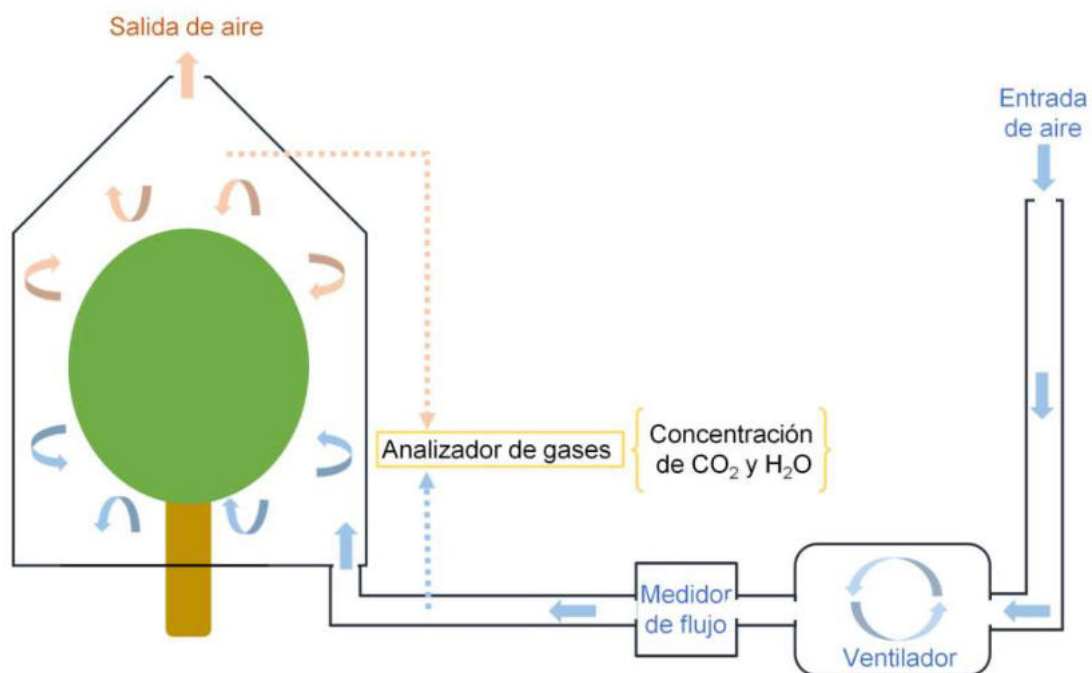


Figura 4.2 Representación esquemática y detalle fotográfico del dispositivo de cámara de planta completa utilizado en este estudio.

El sistema de suministro de aire consistió en un ventilador de aire de tubo semirradial (TD-1300/250 Silent Ecowatt, Soler & Palau, España) con una salida de 20 m³/min, unido a un tubo de aluminio (d = 25 cm) que recogía el aire a 4 m por encima del suelo. La salida del ventilador estaba unido a otro tubo de aluminio (d = 25 cm) que se dividía con un conector en "T" en dos tubos de aluminio de menor sección (d = 15 cm), cada uno de los cuales pasaba a través de cada uno de los dos orificios de la base hacia la cámara. Cada uno de estos dos tubos terminaba en un tubo de aluminio de 1 m (d = 15 cm), colocado horizontalmente en la base dentro de la cámara, y con la parte superior perforada con pequeños orificios (d_{orificio} = 0,5 cm) para una mejor difusión del aire entrante en la cámara (**Figura 4.2**).

Para monitorizar el árbol, se medían simultáneamente la concentración de CO₂ y de vapor de H₂O en el aire antes de entrar en la cámara y justo antes de la salida en la parte superior abierta, utilizando un analizador de gases infrarrojo (CIRAS-3 DC, PP-Systems, Amesbury, MA, USA). Las mediciones se registraban cada 5 minutos. Además, se calculó el VPD dentro de la cámara midiendo la temperatura y la humedad relativa del aire con un registrador de datos Hobo Pro RH/Temp (Onset Computer Bourne, MA, EE.UU.) situado a 1 m por encima de la base. El VPD dentro de la cámara se utilizó para una evaluación posterior de la respuesta de la planta y para el análisis estadístico.

Se calculó la transpiración del árbol (E , mol H₂O s⁻¹ árbol⁻¹) y la conductancia total (g_t , mol H₂O s⁻¹ árbol⁻¹) utilizando las siguientes Ecuaciones (1) y (2) (von Caemmerer y Farquhar, 1981):

$$E = \frac{W \times (e_{out} - e_{in})}{(P - e_{out})} \quad (1)$$

$$g_t = \frac{E \times (P - \frac{e_{leaf} + e_{out}}{2})}{(e_{leaf} - e_{out})} \quad (2)$$

donde W es el flujo másico de aire que entra en la cámara (mol H₂O s⁻¹), e_{in} es la presión parcial de vapor de agua del aire de referencia suministrado a la cubeta (mbar), e_{out} es la presión parcial de vapor de agua en el aire dentro de la cámara (mbar), P es la presión atmosférica (mbar), y e_{leaf} es la presión de vapor de agua saturada dentro de la hoja (mbar). Tras obtener g_t , se eliminó la mayoría de los valores de g_t que coincidían con valores de VPD inferiores a 0,5 kPa, ya que tenían una alta incertidumbre y daban lugar a valores aberrantes. También se calculó la fotosíntesis neta (A_N , mol CO₂ s⁻¹ árbol⁻¹; von Caemmerer y Farquhar, 1981) según la Ecuación (3) como:

$$A_N = (C_{in} \times W) - [C_{out} \times (W + E)] \quad (3)$$

donde C_{in} y C_{out} son las concentraciones de CO₂ del aire que entra y sale de la cámara, respectivamente. Finalmente, la eficiencia en el uso del agua (WUE, mol CO₂ mol⁻¹ H₂O) y la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE, mol CO₂ mol⁻¹ H₂O) se calcularon como $WUE = A_N/E$ e $iWUE = A_N/g_t$, respectivamente.

4.2.4. Termometría por infrarrojos del dosel

Se utilizó la termometría por infrarrojos (IR) para monitorizar tres encinas durante 49 días consecutivos de verano, desde el 20 de junio de 2019 (con condiciones de suelo bien regado) hasta el 8 de agosto de 2019 (con condiciones de déficit hídrico en el suelo). La temperatura del dosel de cada individuo se midió con termómetros infrarrojos (IRT 757-500, TC Ltd, Uxbridge, Reino Unido), calibrados con un termómetro de resistencia de platino de 4 hilos (PT100) en el rango de 5-50°C en un baño de agua de alta precisión (Julabo FP50, Julabo GmbH, Seelbach, Alemania). Los sensores del termómetro IR se situaron a unos 3,5 m de altura

desde el suelo, apuntando hacia el lado sur del dosel superior, en un ángulo de 45°, y a una distancia de 2 m del objetivo, para cubrir 1 m² de la superficie del dosel. La temperatura del aire, la velocidad horizontal del viento y la radiación fotosintética activa (PAR) se registraron, respectivamente, con una sonda PT100 de 4 hilos, un anemómetro de copa (Oche Control y Equipamientos S.L., Cadrete, España) y un sensor cuántico QSO (Apogee Instruments, Logan, EE.UU.). Los datos de los sensores mencionados se registraron cada 30 segundos con un datalogger CR1000 (Campbell Scientifics, Logan, USA). Además, la humedad relativa se registró cada 10 minutos con tres registradores de datos Hobo Pro RH/Temp (U23-001; Onset Computer Corp., Pocasset, MA, USA). El potencial hídrico del suelo (SWP) se registró cada 2 minutos utilizando 3 sensores de potencial hídrico del suelo, conectados a un registrador de datos (Teros 21 / Em50, METER Group, Inc., Pullman, WA, USA), e instalados debajo de la copa de cada árbol a una distancia de 50 cm de cada tronco y a 30 cm por debajo del suelo. La presión atmosférica se obtuvo de una estación meteorológica, situada a 17 km al SO del lugar (Aeropuerto de Zaragoza, 41° 39' 38" N; 1° 0' 15" O, 249 m.s.n.m.).

Para los cálculos, todos los datos se integraron a intervalos de 30 minutos. Se calculó el VPD combinando los registros de temperatura del PT100, que resultó ser el más fiable, y la presión de vapor atmosférica, calculada a partir de los registros de humedad relativa. La depresión de la temperatura del dosel (en inglés *canopy temperature depression*, CTD) se calculó como la diferencia entre la temperatura del aire y la del dosel. CTD es positiva cuando la temperatura del dosel es más fría que la del aire, y negativa cuando la temperatura del dosel es más alta que la del aire (es decir, calentamiento del dosel), lo que podría ocurrir cuando los árboles reducen o detienen la transpiración. La transpiración foliar (E , mol H₂O m⁻² s⁻¹) se estimó a partir de la diferencia entre la temperatura del dosel medida (T_c) y la temperatura de la hoja modelizada para una superficie seca (T_{dry} , modelizada como en Barbour *et al.*, 2000), siguiendo la siguiente Ecuación (4) de balance energético (Jones, 1992):

$$E = C_p(g_{bH} + g_r)(T_{dry} - T_c)/L \quad (4)$$

donde C_p es la constante de calor específico molar del aire a presión constante (29,2 J mol⁻¹ K⁻¹), g_{bH} y g_r son la conductancia térmica de la capa límite y la conductancia térmica radiativa, respectivamente (en m² s⁻¹ mol⁻¹), y L es el calor molar de vaporización (44012 J mol⁻¹). Para una explicación más detallada del cálculo de E mediante termometría por infrarrojos, véase Apéndices A y B. La conductancia total de la hoja (g_t , mol H₂O m⁻² s⁻¹) se calculó entonces de acuerdo con von Caemmerer y Farquhar (1981) utilizando la Ecuación (2).

4.2.5. Análisis estadístico

Para comparar las mediciones de conductancia obtenidas con los tres métodos diferentes, cada valor individual de conductancia (g^i) fue estandarizado como $(g^i - g_{min}) 100 / (g_{max} - g_{min})$, donde g_{min} y g_{max} son los valores de conductancia mínimo y máximo, respectivamente, medidos con condiciones de suelo bien regado y PAR > 500 μmol m⁻² s⁻¹. A continuación, se exploraron las posibles diferencias entre métodos y condiciones de agua en la relación entre VPD y conductancia estandarizada con un Análisis de Varianza (ANOVA), basado en un modelo lineal que incluía "método" (hoja única, cámara de planta, termometría IR), "agua" (húmeda, seca), valores transformados en logaritmos de VPD ('logVPD'), y sus interacciones (funciones incorporadas de R 'lm' y 'anova'). Utilizamos valores transformados logarítmicamente y modelos de regresión lineal como el enfoque más sencillo para probar las diferencias en las respuestas observadas (no lineales). Los modelos alternativos, por ejemplo el uso de variables sin transformar o distribuciones alternativas, no mejoraron la normalidad de los residuos y condujeron a resultados similares (datos no mostrados).

Posteriormente, se ajustaron regresiones no lineales entre VPD y g (tanto los valores medidos como los estandarizados) utilizando la función 'drm' del paquete drc 3.0-1 (Ritz *et al.*, 2015). Después de probar diversos modelos alternativos (por ejemplo, decaimiento exponencial, logístico, log-logístico), se identificó la función log-logística con cuatro parámetros (función de auto-arranque 'LL.4' en 'drm') como la función que mejor describía la respuesta esperada en todas las combinaciones de datos. La ventaja de utilizar esta función es que se obtuvieron estimaciones de parámetros con significado biológico, que podían compararse directamente. En concreto, para LL.4, estos parámetros fueron la pendiente (VPD frente a g), los límites superior e inferior de g y la dosis efectiva 50 (ED50, es decir, el VPD que provoca una reducción del 50% de g).

Para caracterizar las conexiones entre las variables ambientales y de la planta y determinar su importancia relativa en el control de la conductancia de la hoja, se utilizaron el conjunto de datos del dosel de IR para hacer un análisis del camino (en inglés *Path Analysis*, PA) (Li, 1975). Este análisis utiliza una estructura de trayectorias que consiste en realizar conexiones potenciales entre variables de interés, donde las conexiones se basan en conocimientos previamente bien establecidos. A partir de las variables y las conexiones, se construye un conjunto de modelos de regresión lineal múltiple, y los coeficientes de regresión parcial se definen como valores de trayectoria que indican el poder causal de cada conexión (Kimm *et al.*, 2020). Los modelos de ecuaciones estructurales para el análisis del camino, se ajustaron utilizando la función "sem" del paquete Lavaan 0.6-10 (Rosseel, 2012), y se representaron con la función "semPath" (paquete semPlot 1.1.2; Epskamp, 2015). El modelo incluía la presión de vapor de agua atmosférica (V_p), la radiación fotosintética activa (PAR) y el potencial hídrico del suelo (SWP) como variables exógenas, y la temperatura del aire (T_{air} , en función de PAR), el déficit de presión de vapor atmosférico (VPD, en función de T_{air} y V_p), la conductancia total (g_t , en función de VPD, PAR y SWP) y la transpiración (E , en función de g_t y VPD) como variables endógenas. Para tener en cuenta las variaciones temporales de los factores ambientales, se realizaron análisis del camino considerando los datos durante todo el día (de 6:00 a 18:00 h de tiempo solar), los datos sólo de la mañana (de 6:00 a 10:00 h), sólo del mediodía (de 10:00 a 14:00 h), y sólo de la tarde (de 14:00 a 18:00 h).

4.3. Resultados

4.3.1. Evolución de la transpiración y la conductancia estomática

4.3.1.1. Escala Foliar

El seguimiento del intercambio gaseoso a nivel foliar mostró que en condiciones de buen riego (potencial hídrico antes del amanecer, $\Psi_{pd} > -0,5\text{MPa}$), un aumento del VPD de 2 a 4 kPa entre la mañana y el mediodía implicó una reducción de la conductancia estomática (g_s) de 0,35 a 0,15 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sin apenas variación de la transpiración foliar (E , **Figura 4.3**). Con condiciones de déficit hídrico ($-0,5 > \Psi_{pd} > -2,0\text{MPa}$), los valores medidos de g_s y E se hicieron más bajos (**Figura 4.3**). Además, incrementos en el VPD menores a 1 kPa entre la mañana y el mediodía, implicaron reducciones en g_s de aproximadamente 0.15 a cerca de cero $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y reducciones en E de aproximadamente 3 a 1 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**Figura 4.3**).

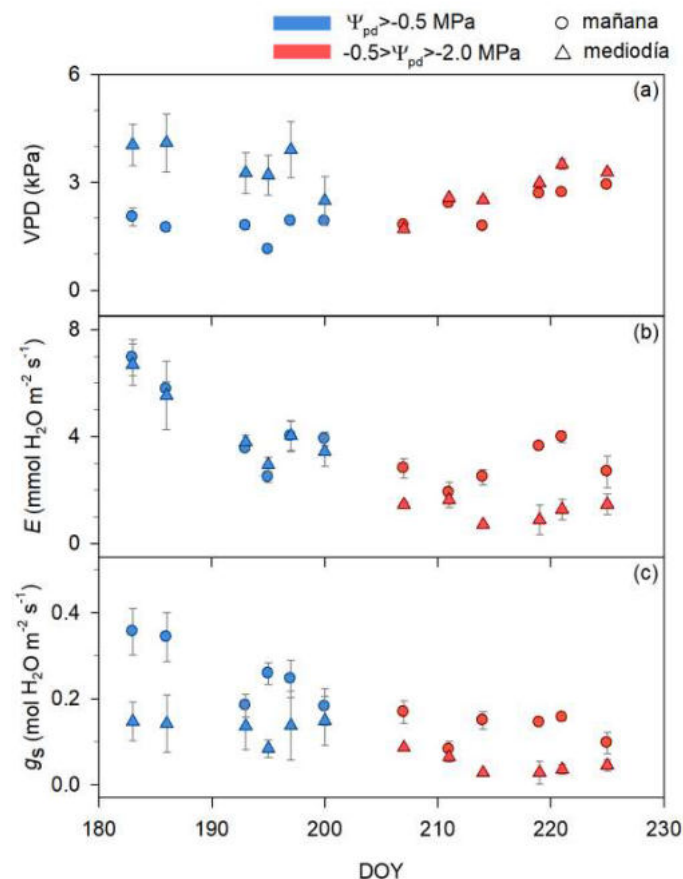


Figura 4.3 Ejemplo de la monitorización del intercambio de gases a nivel de hoja en un ejemplar de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. (a) Déficit de presión de vapor (VPD), (b) transpiración (E), (c) conductancia estomática (g_s). Los datos son media $\pm$ error estándar (n entre 3 y 6). Las formas azules corresponden a condiciones de buen riego (potencial hídrico antes del amanecer, $\Psi_{pd} > -0,5\text{MPa}$), mientras que las rojas corresponden a condiciones de déficit hídrico ($-0,5 > \Psi_{pd} > -2,0\text{MPa}$). Los círculos y triángulos son mediciones realizadas por la mañana (8:00 a 10:00 hora solar) y al mediodía (11:00 a 14:00), respectivamente.

4.3.1.2. Planta Entera

La monitorización de *Quercus. ilex* con la cámara de planta entera se realizó en días con un VPD y una temperatura del aire dentro de la cámara que superaban los 4 kPa (**Figura 4.4a**) y los 35°C, respectivamente, durante algún momento del día. Cabe destacar que al comparar las condiciones en el interior de la cámara con las condiciones externas, se constató un efecto significativo de calentamiento del aire en el interior de la cámara durante la tarde (de 13:00 a 18:00 h hora solar; **Tabla 4.1**). En cualquier caso, considerando las condiciones experimentales dentro de la cámara, los árboles bien regados (con un $\Psi_{pd} > -0,5\text{ MPa}$) mostraron tasas de transpiración (E) en torno a $0,02\text{ mol H}_2\text{O s}^{-1}\text{ árbol}^{-1}$, que se mantuvieron casi constantes entre las 7:30 y las 16:00 hora solar, coincidiendo con una radiación fotosintéticamente activa (PAR) superior a $500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Fuera de este marco de tiempo, el PAR pareció ser el factor limitante, ya que E disminuyó bruscamente hasta cero con la reducción del PAR (**Figura 4.4b**, **Figura 4.5**). Es destacable que, a pesar del fuerte incremento del VPD (de aproximadamente 3 a 5 kPa), sólo se encontró un ligero incremento en E durante la tarde. Por el contrario, la conductancia total (g_t) de los árboles bien regados disminuyó durante el día desde los valores máximos registrados a primera hora de la mañana (aprox. 7:30 h hora solar; **Figura 4.4c**). En cuanto a los árboles con estrés hídrico (con un Ψ_{pd} entre -0,5 y -2 MPa), se registraron valores

claramente más bajos de E y g_t que para los árboles bien regados (**Figura 4.4**). Además, y a diferencia de los árboles bien regados, E en los árboles con estrés hídrico no se mantuvo constante, mostrando un valor máximo de aproximadamente $0,01 \text{ mol H}_2\text{O s}^{-1} \text{ árbol}^{-1}$ a las 10:00 h con un VPD=2kPa que disminuyó a $0,005 \text{ mol H}_2\text{O s}^{-1} \text{ árbol}^{-1}$ para un aumento del VPD hacia 5 kPa (**Figuras 4.4 a y b**). Sin embargo, g_t en los árboles con estrés hídrico también disminuyó como en los árboles bien regados, experimentando una fuerte reducción desde las primeras horas de la mañana hasta el mediodía y permaneciendo casi constante durante la tarde hasta $\text{PAR}=500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 4.4c**).

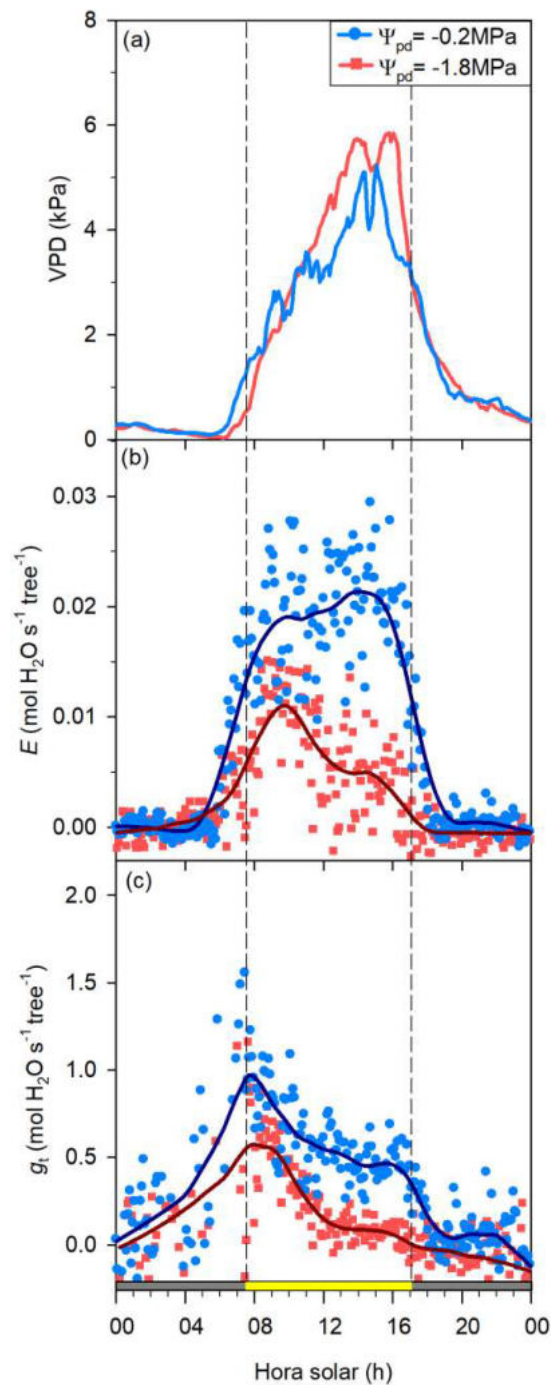


Figura 4.4 Ejemplos de monitorización de un día de dos árboles diferentes de *Quercus ilex subsp. rotundifolia* utilizando una cámara de planta entera. (a) Déficit de presión de vapor (VPD), (b) transpiración (E), (c)

conductancia total (g_t). Las líneas son un suavizado de los datos individuales. Las líneas y círculos azules corresponden a un árbol bien regado (potencial hídrico antes del amanecer, $\Psi_{pd}=-0,2\text{MPa}$) medido a mediados de junio, mientras que las líneas y los cuadrados rojos corresponden a un árbol con estrés hídrico ($\Psi_{pd}=-1,8\text{MPa}$) medido a finales de julio. Las barras amarillas y grises del eje x corresponden a los periodos con una radiación activa fotosintética superior e inferior a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Las líneas discontinuas definen este periodo de intervalo de radiación a través de los gráficos.

Tabla 4.1 Comparación de las condiciones de temperatura (T, °C) y déficit de presión de vapor (VPD, kPa) entre el exterior de la cámara (fuera) y el interior de la cámara (dentro), mostrando los efectos del Teflón FEP a lo largo del día.

Solar time	T out	T inside	VPD out	VPD inside
6:00-7:00	18.6±0.5a	17.5±0.5b	0.4±0.1a	0.2±0.0b
8:00-9:00	25.2±0.4a	25.7±0.2a	1.4±0.1a	1.4±0.0a
10:00-12:00	28.9±0.7a	33.9±0.5b	2.1±0.1a	3.3±0.1b
13:00-15:00	33.4±0.6a	40.1±0.8b	3.6±0.2a	5.5±0.4b
16:00-18:00	28.3±0.7a	34.1±1.1b	2.2±0.2a	3.2±0.3b

Los datos son la media $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el exterior y el interior de la cámara (test t de Student, $P<0,05$).

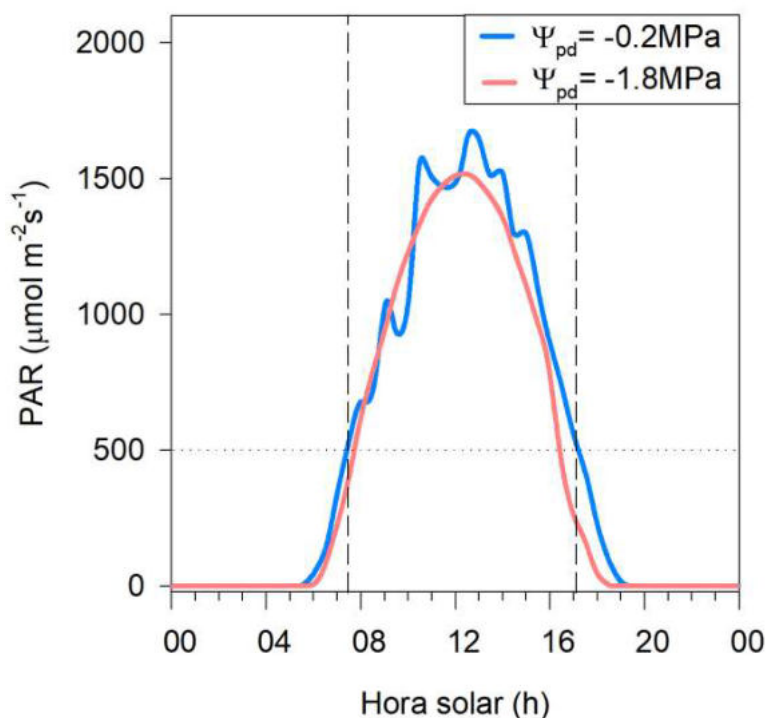


Figura 4.5 Evolución de la radiación fotosintética activa (PAR) a lo largo del día monitorizada para una encina en condiciones de buen riego (azul; potencial hídrico antes del amanecer, $\Psi_{pd}=-0,2 \text{ MPa}$) y en otro espécimen en condiciones de sequía (rojo; $\Psi_{pd}=-1,8 \text{ MPa}$), correspondiente al gráfico mostrado en la **Figura 4.4**. Las líneas discontinuas definen el intervalo de tiempo con PAR superior a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.3.1.3. Infrarrojos

El uso de termometría por infrarrojos para monitorizar las copas de las encinas durante el verano mostró que la depresión de la temperatura de la copa (CTD) variaba a lo largo del día y con la progresión de la sequía. Durante el día, los valores más bajos de CTD se registraron normalmente al mediodía (12h de tiempo solar; **Figura 4.6**), mientras que los valores más altos se registraron generalmente durante la tarde (15-18 h de tiempo solar; **Figura 4.6**) coincidiendo con los valores máximos de VPD (**Figura 4.7a**). Sin embargo, cabe destacar que en algunos días, especialmente en los que se dieron condiciones de déficit hídrico en el suelo, los valores de CTD durante la tarde fueron menores que durante las primeras horas de la mañana (6-9 h de tiempo solar), y por tanto, los valores máximos de CTD en esos días se encontraron durante las primeras horas de la mañana (**Figuras 4.7b, 4.6**). A lo largo del periodo estival, el CTD varió de acuerdo con los cambios en el SWP (**Figura 4.6**). Al principio del periodo monitorizado (del día del año 170 al 190, fase "bien regada"), el SWP se mantuvo cerca de cero, y el CTD se mantuvo positivo la mayor parte del tiempo (es decir, la temperatura del aire fue consistentemente mayor que la temperatura del dosel, **Figura 4.8**). A esta fase le siguió un fuerte descenso en el SWP desde el día 190 hasta el 210 (fase de "secado del suelo"), llegando hasta un valor bajo de SWP que permaneció desde el día 210 hasta el 220 (fase de "sequía"). A medida que el suelo se secaba y el SWP se volvía más negativo, los valores negativos de CTD (ocurridos cuando la temperatura del aire era inferior a la del dosel, **Figura 4.8**) se hicieron más frecuentes (**Figura 4.6**). Por ejemplo, cuando el SWP era de -0,9 MPa, el CTD se mantuvo siempre negativo al mediodía, alcanzando valores de hasta -3 °C (**Figura 4.7b**).

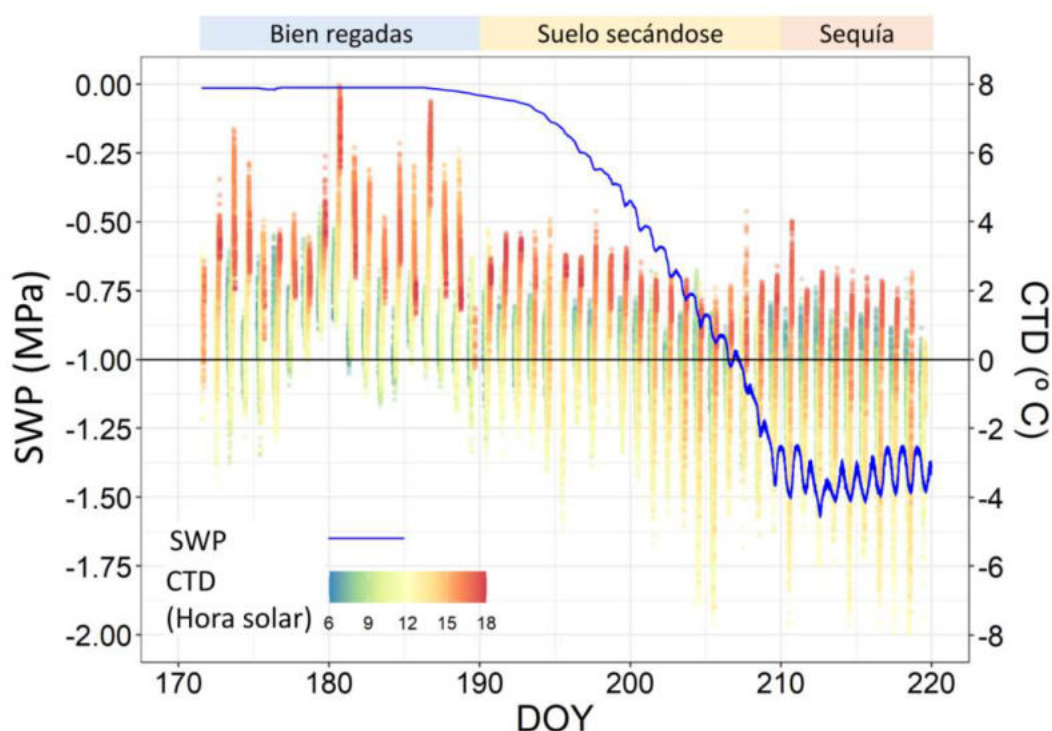


Figura 4.6 Ejemplo de la evolución del potencial hídrico del suelo (SWP) y de la depresión de la temperatura del dosel (CTD), medidos en una encina a lo largo de un verano mediterráneo. DOY (*Day Of Year*), día del año. Los diferentes colores del CTD indican la hora solar del día, desde las 6:00 hasta las 18:00 h. Como referencia, se indican las tres fases principales en la evolución del SWP.

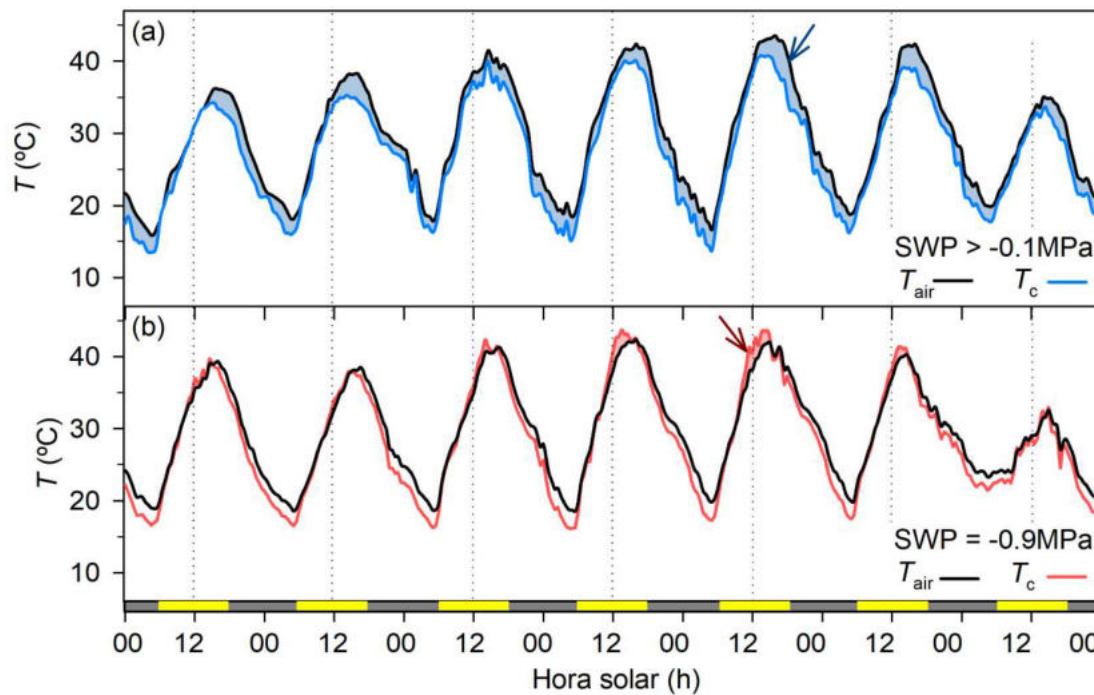


Figura 4.8 Temperaturas del aire (T_{air}) y del dosel (T_c) monitorizadas en un ejemplar de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* utilizando el método de termometría por infrarrojos. (a) corresponde a un periodo de 7 días (día del año 176 a 182) con condiciones de buen riego (potencial hídrico del suelo, $\text{SWP} > -0,1 \text{ MPa}$) y (b) corresponde a otro periodo de 7 días (día del año 201 a 207) con condiciones de déficit hídrico del suelo ($\text{SWP} = -0,9 \text{ MPa}$). Las barras amarillas y grises en el eje x corresponden a periodos con una radiación activa fotosintética superior e inferior a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. La flecha azul indica un momento en el que T_c es inferior a T_{air} durante las condiciones de buen riego. La flecha roja indica un momento en el que T_c es mayor que T_{air} durante las condiciones de déficit hídrico del suelo.

Los valores máximos de E estimados con el método IR se registraron cada día después del mediodía, coincidiendo con los valores máximos de VPD (**Figura 4.7c**). Al principio del experimento, con condiciones de suelo bien regado, los árboles mostraron valores máximos de E entre 5 y $8 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A medida que el SWP se hizo más negativo, los valores máximos de E disminuyeron progresivamente hasta un rango entre 3 y $5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 4.7c**). En cuanto a la conductancia total (g_t), sorprendentemente se observaron valores máximos de g_t alrededor del amanecer (aproximadamente entre las 4:30 a 5:30 h, con $\text{PAR} < 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), probablemente debido a los bajos valores de VPD medidos a esa hora del día (entre 0,5 y 1,0 kPa; **Figura 4.7**) que aumentan el error de estimación del método. Por otra parte, el g_t estimado con IR cuando la PAR era superior a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ siguió un patrón similar al del g_t monitorizado con la cámara de planta completa, con valores altos registrados generalmente a primera hora de la mañana (7:30 h de tiempo solar), que fueron disminuyendo a medida que avanzaba el día (**Figura 4.4d**). A medida que el suelo se fue secando, los valores de g_t alcanzaron valores más bajos durante todo el día (**Figura 4.7d**). Cabe destacar que en la **Figura 4.7**, también se señalan tres días consecutivos (indicados con flechas), con diferentes valores de g_t obtenidos al mediodía (84, 123 y $160 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), asociados a tres niveles diferentes de VPD (6,5, 4,4 y 3,2 kPa, respectivamente), y de temperatura del aire (41, 37 y 33°C , respectivamente), registrados a la misma hora, mostrando un aumento de g_t en concordancia con una disminución del VPD.

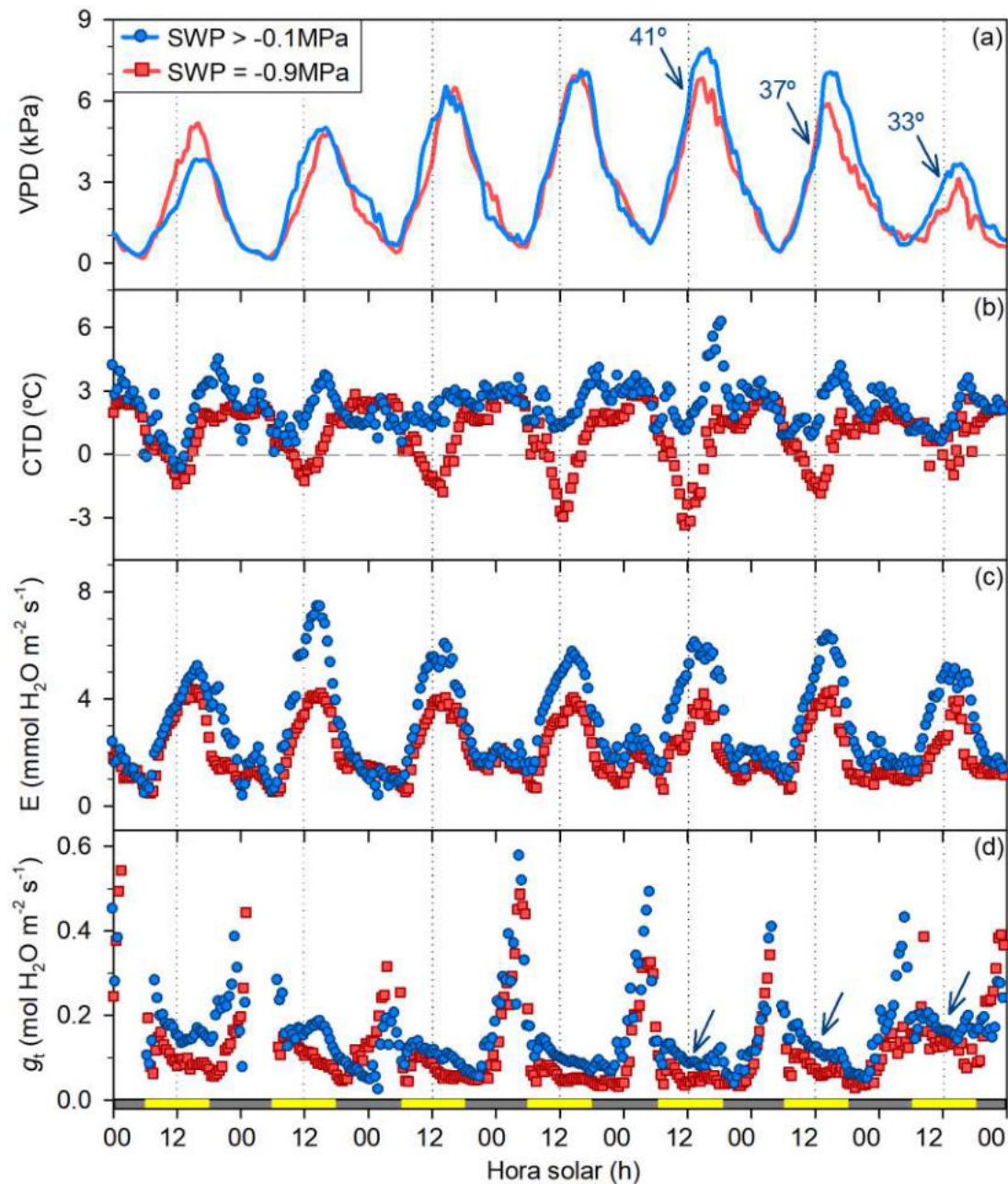


Figura 4.7 Detalle de la monitorización de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* mediante el método de termometría por infrarrojos del dosel durante dos olas de calor que difieren en las condiciones hídricas del suelo. (a) Déficit de presión de vapor (VPD), (b) depresión de la temperatura del dosel (CTD), (c) transpiración de la planta (E), (d) conductancia total (g_t). Las líneas y los círculos azules corresponden a un periodo de 7 días (día del año 176 a 182) de un árbol bien regado (potencial hídrico del suelo, $SWP > -0,1$ MPa, **Figura 4.6**), mientras que las líneas y los cuadrados rojos corresponden a otro periodo de 7 días (día del año 201 a 207) del mismo árbol en condiciones de déficit hídrico del suelo ($SWP = -0,9$ MPa, **Figura 4.6**). Las barras amarillas y grises en el eje x corresponden a periodos con una radiación activa fotosintética superior e inferior a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Las flechas azules indican tres días consecutivos que difieren en VPD y g_t , registrados al mediodía para condiciones bien regadas; la temperatura del aire asociada a estos momentos se indica sobre las flechas en (a).

4.3.2. Respuesta de la conductancia estomática a la VPD y al déficit hídrico del suelo.

El ANOVA exploratorio, que evalúa la respuesta general de la conductancia estomática (g estandarizada) al VPD transformado logarítmicamente, mostró diferencias significativas entre los métodos de seguimiento y las condiciones hídricas, así como interacciones complejas (**Tabla 4.2**). En particular, el intercepto obtenido utilizando la cámara de hoja, fue significativamente inferior, que con los otros dos métodos ($P=0,036$), mientras que la pendiente (negativa) en respuesta al VPD fue significativamente mayor con el método IR ($P=0,040$). Como se esperaba, el intercepto fue mayor en las plantas bien regadas ($P<0,001$), pero la pendiente en respuesta al VPD fue más negativa ($P<0,001$). Además de estos patrones generales, los términos de interacción altamente significativos ('método:agua', $P=0,002$; 'método:agua:logVPD', $P<0,001$), indicaron que tanto el intercepto como la pendiente, difieren para cada combinación 'método x agua'.

Tabla 4.2 Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los efectos de la técnica de medición (MÉTODO: cubeta de hoja, cámara de planta, termometría IR), el déficit hídrico del suelo (AGUA: bien regado / seco), y los valores transformados logarítmicamente del déficit de presión de vapor (logVPD) sobre la conductancia estandarizada. En donde Sum Sq es la suma de cuadrados, Media Sq es la media de cuadrados y F es el valor estadístico de contraste. En negrita valores de $P < 0.05$

	Df	Sum Sq	Media Sq	Valores F	Valores P
METHOD	2	0.477	0.238	13.6	<0.001
Agua	1	12.397	12.397	706.3	<0.001
logVPD	1	84.173	84.173	4795.5	<0.001
Método:agua	2	0.211	0.105	6.0	0.002
Método:logVPD	2	0.662	0.331	18.9	<0.001
Agua:logVPD	1	0.087	0.087	4.9	0.026
Método:Agua:logVPD	2	0.793	0.396	22.6	<0.001
Residuales	4073	71.492	0.018		

Cuando se relacionó el VPD con la conductancia de la planta (considerando sólo aquellos valores con $VPD > 0,5$ kPa y $PAR > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se encontraron relaciones consistentes para los tres métodos utilizados (**Figura 4.9**). Para los árboles bien regados, un incremento del VPD de 1 a 5 kPa indujo una reducción de la conductancia estomática (g_s) medida con el método de la cubeta foliar de aproximadamente 0,35 a 0,05 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**Figura 4.9a**). El mismo incremento en el VPD también resultó en una disminución de la g_t medida con los otros dos métodos: de aproximadamente 0,95 a 0,28 $\text{mol H}_2\text{O s}^{-1} \text{árbol}^{-1}$ medida con la cámara de planta completa, y de 0,38 a 0,15 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la termometría IR (**Figuras 4.9a, b**). Para las condiciones de déficit hídrico del suelo, los valores de conductancia obtenidos con los tres métodos fueron menores que en condiciones de buen riego, para cada valor de VPD (**Figura 4.9**).

Cuando la conductancia fue estandarizada por medio de los valores máximos y mínimos registrados para condiciones de buen riego, las ecuaciones ajustadas de los tres diferentes métodos, compartieron valores similares, aunque con patrones ligeramente diferentes (**Figura 4.9d, Tabla 4.3**). Los valores obtenidos con el método de termometría IR y el método a escala de hoja, en condiciones de sequía, mostraron una forma cuasi-exponencial, con una disminución progresiva de la conductancia, a partir de valores relativamente bajos de VPD (**Figura 4.9d, ver también Figuras 4.9a, c**). Por el contrario, una meseta en la conductancia

hasta VPD $\approx$ 2 kPa, seguida de un descenso más pronunciado, fue evidente para el método de la cámara de planta completa, así como para el método a escala de hoja en condiciones bien regadas (**Figura 4.9d**, véase también **Figura 4.9a, b**).

Los parámetros estimados para las curvas log-logísticas (**Tabla 4.3**) confirmaron que la ED50 (es decir, el valor del VPD en el que la conductancia se reduce a la mitad) estaba en el rango entre 1 y 3kPa, independientemente del método y de las condiciones de agua. Considerando la incertidumbre de los parámetros, las estimaciones más altas para la ED50 (2,5-3,0 kPa), y la pendiente (6,1-6,2% kPa⁻¹) se encontraron para el método de la cámara de planta completa, siendo significativamente más altas que para la termometría IR (ED50= 1,4-1,7 kPa; pendiente= 1,8-3,0 % kPa⁻¹). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la ED50 y la pendiente entre las condiciones de buen riego y de sequía. Sólo para el método de la cámara de planta completa, los límites superior e inferior estimados (indicativos de la conductancia máxima y mínima), fueron significativamente mayores en condiciones de buen riego, que en condiciones de sequía. Para el método a escala de hoja, las incertidumbres fueron generalmente grandes, particularmente en condiciones de sequía, impidiendo así una comparación estadística adecuada, pero aun así las estimaciones más significativas se encontraron en el rango de los otros métodos.

Tabla 4.3 Estimaciones de los parámetros de las curvas log-logísticas que describen la relación entre el déficit de presión de vapor (VPD) y la conductancia estandarizada (como se muestra en la **Figura 4.9d**) para los diferentes métodos y condiciones hídricas. Ψ se refiere al potencial hídrico antes del amanecer (hoja única y cámara de planta completa) o al potencial hídrico del suelo (termometría IR). En negrita los P valores < 0,05. Los parámetros que difieren estadísticamente (es decir, donde los intervalos de confianza no se superponen), esta indicados con un asterisco (entre condiciones de riego y estrés), y con letras (entre métodos).

		Condiciones de buen riego ($\Psi > -0.5$ MPa)		Condiciones de sequía ($-0.5 > \Psi > -2.0$ MPa)	
		Estimate (95% confidence interval)	P-value	Estimate (95% confidence interval)	P-value
Escala de hoja	Pendiente	6.7 (2.3, 11.1) ^{ab}	0.003	7.3 (-1.2, 15.7) ^a	0.090
	Límite inferior	13.8 (4.1, 23.4) ^a	0.005	14.6 (11.1, 18.1) ^a	<0.001
	Límite superior	66.8 (56.7, 76.9) ^a	<0.001	481 (-6202, 7165) ^{ab}	0.886
	ED50	2.4 (2.1, 2.6) ^{ab}	<0.001	1.1 (-1.5, 3.7) ^{ab}	0.412
Cámara de planta entera	Pendiente	6.1 (4.5, 7.6) ^a	<0.001	6.2 (2.4, 10) ^a	0.001
	Límite inferior*	16.2 (13.4, 19) ^a	<0.001	1.8 (-4.1, 7.7) ^b	0.542
	Límite superior*	67.4 (63.7, 71.1) ^a	<0.001	35.4 (30.4, 40.5) ^a	<0.001
	ED50	2.5 (2.4, 2.6) ^a	<0.001	3 (2.7, 3.4) ^b	<0.001
Termometría IR	Pendiente	1.8 (0.9, 2.6) ^b	<0.001	3 (1.9, 4) ^a	<0.001
	Límite inferior	4.9 (-5.1, 14.7) ^a	0.341	5 (1, 9) ^b	0.015
	Límite superior	92.9 (62, 123.8) ^a	<0.001	74.3 (52.5, 96.6) ^b	<0.001
	ED50	1.7 (1.2, 2.3) ^b	<0.001	1.4 (1.1, 1.7) ^a	<0.001

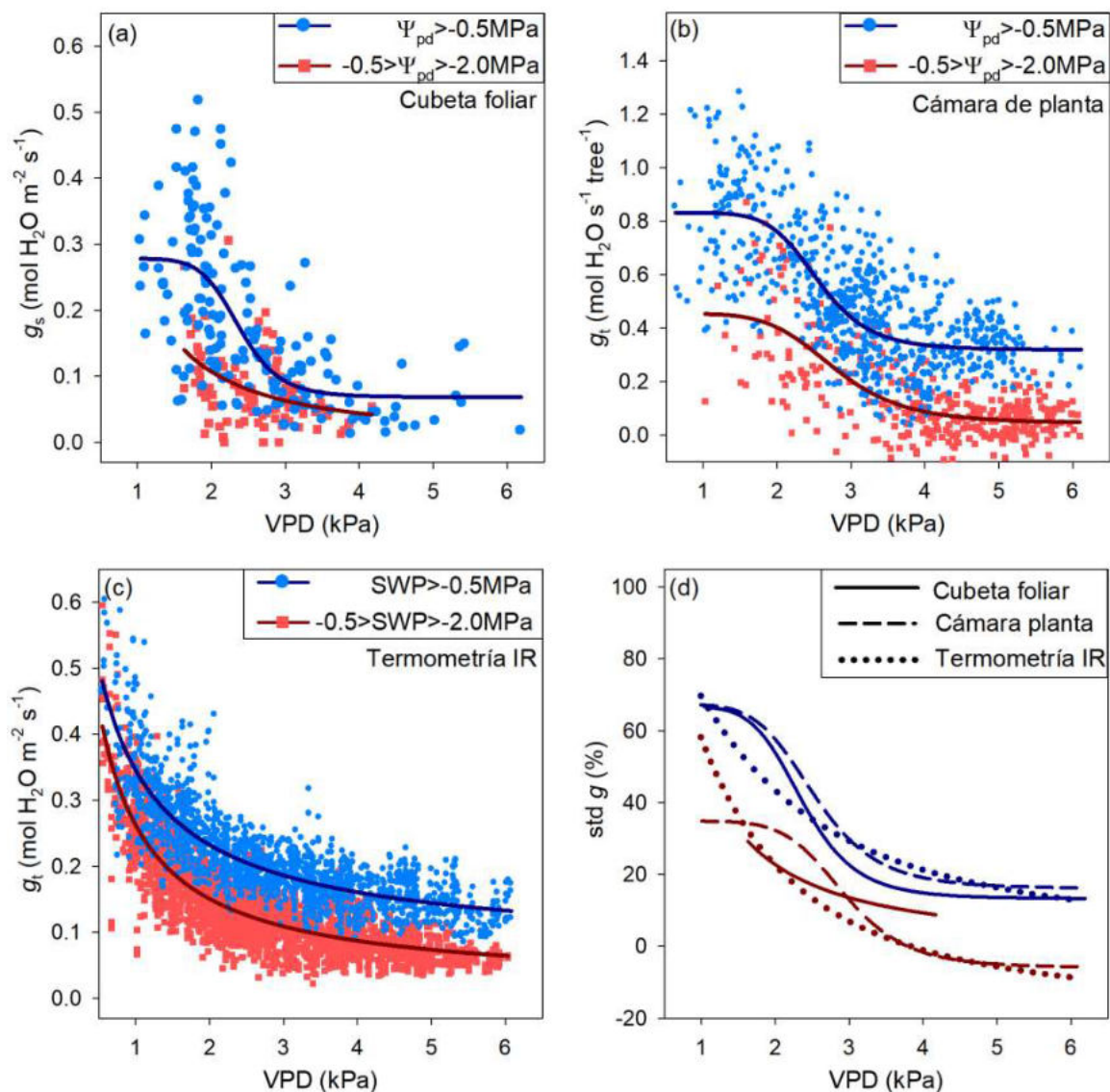


Figura 4.9 Relación entre el déficit de presión de vapor (VPD) y la conductancia estomática (g_s) o la conductancia total (g_t) para *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* utilizando: (a) una cubeta de una sola hoja ($n=3$ árboles, 12 días), (b) una cámara para toda la planta ($n=4$ árboles, 1 día, para condiciones bien regadas; $n=2$ árboles, 1 día, para condiciones de déficit hídrico), y (c) la termometría por infrarrojos (IR) del dosel ($n=3$ árboles, 49 días). La relación entre la VPD y la conductancia foliar estandarizada (std g) para los tres métodos se muestra en (d). Las líneas y círculos azules corresponden a condiciones de buen riego (potencial hídrico antes del amanecer, Ψ_{pd} , o potencial hídrico del suelo, $SWP > -0,5$ MPa), mientras que las líneas y los cuadrados rojos corresponden a condiciones de déficit hídrico del suelo ($-0,5 > \Psi_{pd}$ o $SWP > -2,0$ MPa).

Un análisis más detallado de la respuesta a lo largo del tiempo durante tres olas de calor (asociadas a un alto VPD), evidenció que la respuesta al VPD fue transitoria y muy dinámica, independientemente de las condiciones hídricas del suelo (**Figura 4.10**). El primer evento (días del año 176 a 183), bajo condiciones bien regadas (círculos/líneas sólidas; **Figura 4.10**), mostró una disminución y recuperación casi lineal en g_t . Sin embargo, este descenso en la g_t media diurna no fue suficiente para compensar el aumento del VPD, y la E media diurna aumentó de unos 3,5 a 4,5 mmol m⁻² s⁻¹. En el segundo evento (días del año 199 a 207), durante la fase de secado del suelo (diamantes/líneas discontinuas; **Figura 4.10**), el aumento del VPD

coincidió con un progresivo descenso de la SWP, resultando en una disminución más brusca de g_t , y un ligero descenso de E . Sin embargo, después del evento de alto VPD, los valores de g_t se recuperaron hasta valores similares a los anteriores al evento. Finalmente, durante la fase de sequía constante (días del año 219 a 224; cuadrados/líneas punteadas), encontramos un descenso más débil de g_t , que resultó en una E casi constante. Es destacable que, los valores de g_t después del evento (cuadrado blanco; **Figura 4.10**), fueron incluso mayores que los de g_t antes del evento (cuadrado negro), aunque esto podría atribuirse a las condiciones bastante nubladas antes del evento (sólo 6,4 horas con $PAR > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, frente a las 9-10 horas de los días siguientes), que pueden haber causado una ligera limitación de luz.

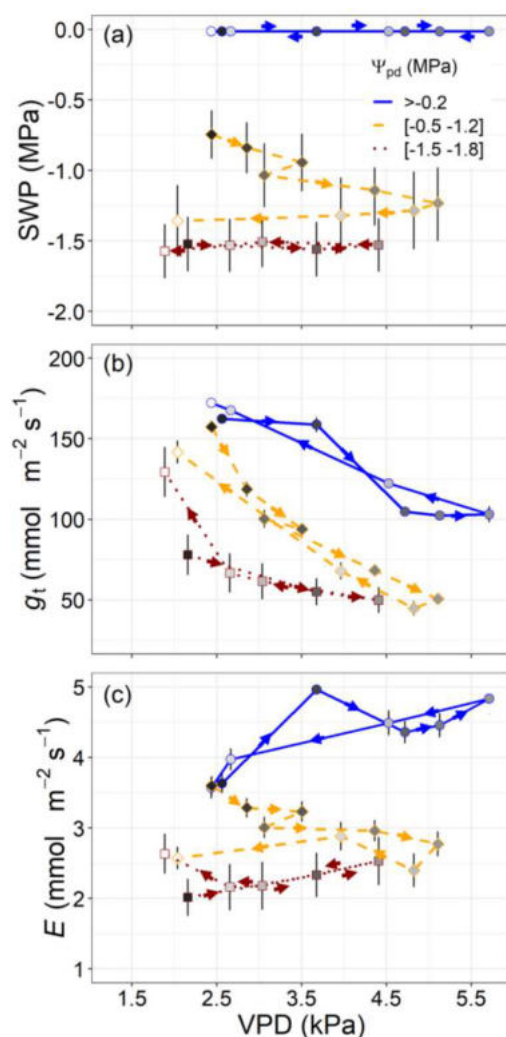


Figura 4.10 Evolución del promedio diario ($PAR > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) del potencial hídrico del suelo (SWP), conductancia total derivada de termometría IR (g_t) y transpiración (E) durante tres olas de calor (asociadas a $VPD > 4 \text{ kPa}$). Las flechas y la intensidad del gris indican el momento dentro de cada evento de alto VPD, y los valores en negro y blanco corresponden a las condiciones previas y posteriores al evento, respectivamente ($VPD \leq 2,5 \text{ kPa}$). Las barras de error indican el error estándar de la media, integrando la variabilidad diaria y entre árboles mediante la propagación del error. Los círculos / líneas sólidas, los diamantes / líneas discontinuas, y los cuadrados / líneas punteadas, denotan los tres eventos, ocurridos durante las fases de buen riego (días del año, días del año 176-183), secado del suelo (días del año 199-207) y sequía (días del año 219-224) mostradas en la **Figura 4.6**. Como referencia incluimos en la leyenda los valores de potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{pd}) durante cada evento.

4.3.3. Respuesta de la fotosíntesis y de la eficiencia en el uso del agua al VPD y al déficit hídrico del suelo

Se registró con el método de planta entera una reducción en la fotosíntesis neta (A_N) a lo largo del día asociada al incremento en VPD, tanto en los árboles bien regados como en los sometidos a estrés hídrico (**Figuras 4.11a, b**). Esta reducción de la A_N para los árboles bien regados comenzó en un valor de VPD de aproximadamente 2,5 kPa, valor a partir del cual se empezaron a registrar valores de A_N cercanos a cero para los árboles con estrés hídrico (**Figura 4.11b**). En cuanto a la eficiencia en el uso del agua, la **Figura 4.11c** muestra una disminución de este parámetro con el aumento del VPD. De forma similar, la eficiencia intrínseca del uso del agua en los árboles con estrés hídrico disminuyó ligeramente con el aumento del VPD (**Figura 4.11d**). Sin embargo, la eficiencia intrínseca del uso del agua en los árboles bien regados, se mantuvo constante para la mayoría de los valores de VPD, aunque se detectó un aumento para valores de VPD entre 1 a 2 kPa.

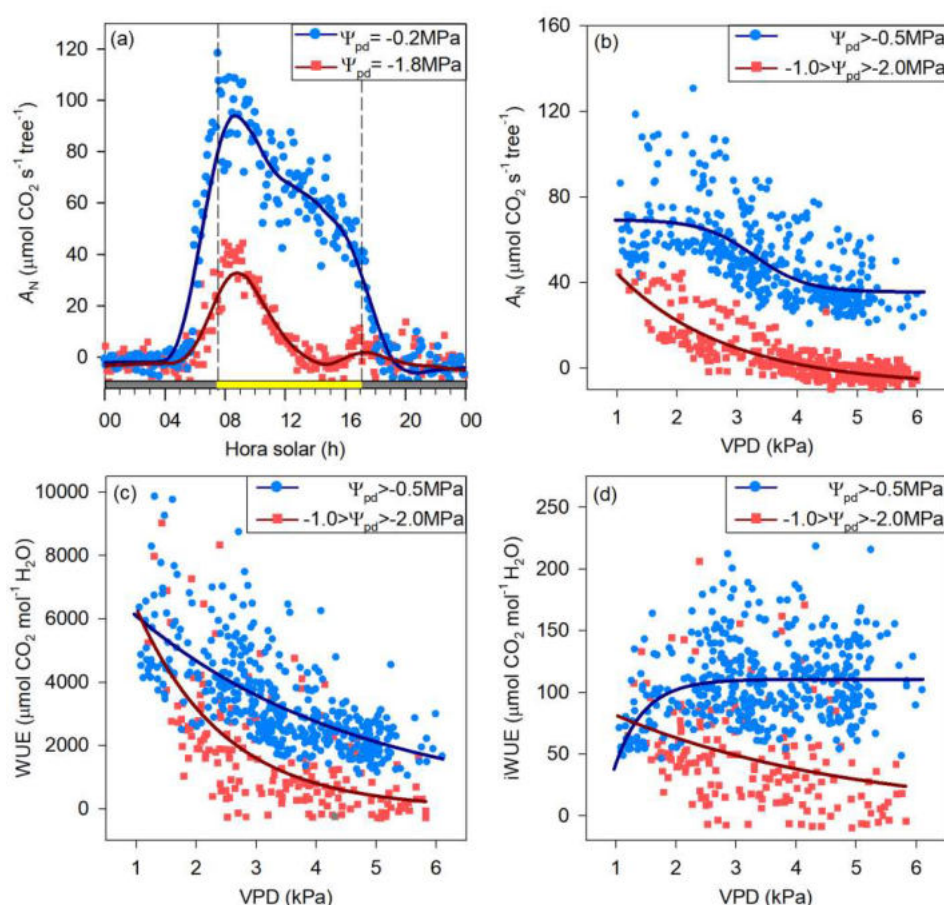


Figura 4.11 Evolución de la fotosíntesis neta (A_N) a lo largo del día, monitorizada con una cámara de planta entera en una encina en condiciones de buen riego (azul; potencial hídrico antes del amanecer, $\Psi_{pd} = -0.2$ MPa) y en otro espécimen en condiciones de sequía (rojo; $\Psi_{pd} = -1.8$ MPa) (a). Relación entre el déficit de presión de vapor (VPD) y A_N (b), eficiencia en el uso del agua (WUE) (c) y eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE) (d). Las líneas y los círculos azules en (b), (c) y (d) corresponden a dos encinas en condiciones de buen riego ($\Psi_{pd} > -0.5$ MPa), mientras que las líneas y los cuadrados rojos corresponden a otras dos encinas en condiciones de estrés hídrico ($-0.5 > \Psi_{pd} > -2.0$ MPa). Las barras amarillas y grises en (a) corresponden a periodos con una radiación activa fotosintética superior e inferior a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

4.3.4. Factores que regulan la respuesta a la VPD y al déficit hídrico del suelo

El análisis del camino mostró que tanto el SWP como el VPD tuvieron un efecto similar sobre g_t cuando se consideran los datos de todo el día (**Figura 4.12**). Sin embargo, el efecto de la VPD sobre g_t fue ligeramente superior al efecto del SWP durante la mañana y la tarde, mientras que fue ligeramente inferior durante el mediodía (**Figura 4.12**). Sólo se encuentra un débil efecto del PAR sobre g_t , durante la mañana y la tarde, coincidiendo con los periodos con condiciones parcialmente limitadas de luz. Como era de esperar, tanto VPD como g_t contribuyeron a E, pero con proporciones variables durante el día, aumentando el peso relativo de g_t de la mañana a la tarde (**Figura 4.12**). En cuanto a la relación entre los diferentes factores ambientales, las variaciones de VPD fueron impulsadas en gran medida por T_{air} , con una contribución menor de las variaciones de V_p , especialmente durante la mañana. A su vez, las variaciones de T_{air} durante la mañana estaban fuertemente acopladas al aumento de la PAR, pero esta asociación fue débil durante el mediodía, cuando la PAR era casi constante, y la tarde, cuando T_{air} disminuía mucho más lentamente que la PAR. Las tres variables exógenas del modelo (V_p , PAR y SWP) fueron independientes y no mostraron ninguna asociación clara entre ellas.

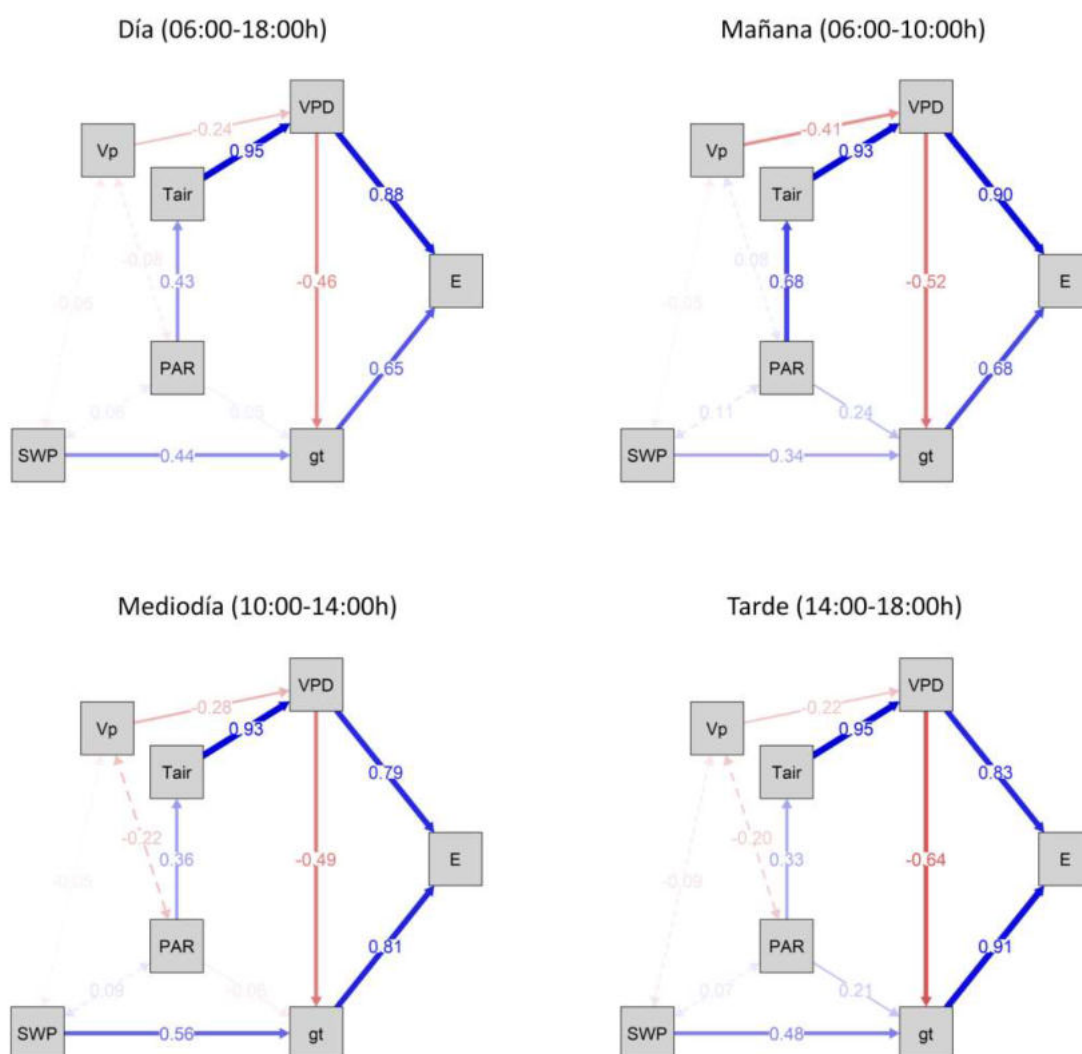


Figura 4.12 Análisis de trayectorias considerando los datos infrarrojos de todo el día y de cada período del día (mañana, mediodía y tarde). VPD, déficit de presión de vapor atmosférico; SWP, potencial hídrico del

suelo; g_t , conductancia total; E , transpiración; T_{air} , temperatura del aire; V_p , presión de vapor de agua atmosférico; PAR, radiación activa fotosintética. Las correlaciones azules son positivas y las rojas negativas. El grosor de la línea es proporcional a la estimación del parámetro estandarizado (también se muestran los valores numéricos). Las líneas discontinuas bidireccionales indican asociaciones entre variables exógenas (V_p , PAR y SWP). Las líneas sólidas unidireccionales indican las asociaciones "causales" incluidas en el modelo estructural.

4.4. Discusión

4.4.1. Evaluación de los métodos para controlar la respuesta de las plantas al VPD

En general, la conductancia foliar se relacionó negativamente con el aumento del VPD, pero la variabilidad a nivel local del VPD fue diferente en los tres métodos utilizados (cubeta de una hoja, cámara de planta entera y termometría por infrarrojos (IR) del dosel), principalmente asociada a la escala de medición. La conductancia foliar obtenida con la termometría IR, disminuyó exponencialmente para todo el rango de VPD evaluado, mientras que la conductancia foliar total obtenida con la cámara de planta entera, se mantuvo constante para valores de VPD inferiores a 2 kPa y superiores a 4 kPa, disminuyendo principalmente de 2 a 4 kPa (**Figura 4.7**). Esta discrepancia podría explicarse por la diferente zona del árbol medida por cada método (Jones, 1992; Rey-Sánchez *et al.*, 2016). Por un lado, el método IR monitorizó la exposición sur del dosel superior, es decir, la zona con mayor demanda evaporativa durante el día y, por tanto, la zona potencialmente más sensible a los cambios en el VPD. Por otro lado, la respuesta dada por la cámara de toda la planta resultó de la suma de las diferentes partes del árbol, donde la respuesta de las partes de exposición sur, podría suavizarse con la respuesta de las zonas del norte, y de la parte inferior del dosel (Tenhunen *et al.*, 1990; Bonan *et al.*, 2021). En cuanto a la cubeta foliar, la variación de la conductancia estomática a los cambios en el VPD, dio lugar a una respuesta intermedia entre los otros dos métodos. Esto podría deberse también a la ubicación de las hojas medidas con esta técnica, que era la exposición sur de la parte inferior del dosel, que podría tener una demanda evaporativa menor que la zona superior con exposición sur, pero aún mayor que la exposición norte.

En cuanto a la comparación de procedimientos entre los métodos, cada uno de ellos tiene algunas ventajas y otras desventajas teniendo en cuenta su complejidad, invasividad y grado de suposición. En primer lugar, la cubeta foliar permite fácilmente la medición de cualquier hoja individual debido a su portabilidad, pero apenas permite un seguimiento continuo debido a su mayor invasividad. De hecho, establecer valores de VPD inferiores a 1,5 y superiores a 3,5 KPa, requería varios minutos y no siempre se alcanzaban. Esto dio lugar a que se midieran pocos valores a altos VPD, especialmente durante las condiciones de déficit hídrico del suelo, en las que no se pudieron obtener mediciones a VPD superiores a 4,5 kPa. En cualquier caso, la tendencia de la regresión mostrada en la **Figura 4.9a**, para las condiciones de déficit hídrico del suelo indica que los valores de $VPD > 4,5$ kPa podrían producir valores de g_s cercanos a la conductancia mínima.

En segundo lugar, la cámara de planta completa puede monitorizar la respuesta de todo el árbol con un mínimo de suposición, pero con la mayor complejidad metodológica. En este estudio se usaron unidades de conductancia para este método por árbol en lugar de por m^2 , teniendo en cuenta que los valores absolutos, no son comparables con los valores obtenidos con los otros métodos. Alternativamente, se podría estimar el área foliar total del árbol utilizando diferentes modelos y supuestos como la estimación a partir de las transmitancias del haz solar (Lang y McMurtriebm, 1992.) o utilizando escáner láser terrestre (Hu *et al.*,

2018). Otra cuestión a destacar, en el uso de la cámara de planta completa, es el importante efecto de calentamiento encontrado durante la tarde, que aumentó el VPD en comparación con las condiciones externas. Esto limita la duración de las campañas de monitorización, y debería tenerse en cuenta a la hora de escalar los resultados a nivel de plantación.

Por último, la técnica de infrarrojos registra la respuesta de una zona determinada de la copa, lo que permite realizar mediciones no invasivas, sin modificar las condiciones microclimáticas que rodean al árbol. Sin embargo, la utilización del método IR, requiere un mayor grado de suposición, por ejemplo, hay que estimar la radiación incidente que llega a la superficie de la hoja (Apéndice B), la entrada de la velocidad del viento o el cálculo de la conductancia de la capa límite (véase el Apéndice A para más detalles). Además, la incertidumbre del método aumenta con valores bajos de VPD, lo que implica valores cercanos a cero en el denominador de la Ecuación A6. De hecho, a valores de VPD inferiores a 1 kPa (encontrados alrededor del amanecer), la conductancia estomática estimada puede dar lugar a valores demasiado altos y erráticos.

Resumiendo, los tres métodos tienen sus ventajas e inconvenientes, proporcionando relaciones similares entre la conductancia foliar y el estrés por sequía, pero con peculiaridades que se complementan entre sí (Figura 4.13).

	Cubeta foliar	Cámara planta	Termometría IR
Escala de medida	—	++	+
Complejidad metodológica	+	—	++
Invasividad	—	—	++
Grado de asunción	+	+	—

— Desventaja
+ Ligera ventaja
++ Gran ventaja

Figura 4.13 Resumen de las principales ventajas e inconvenientes de los tres métodos probados en este estudio. —: desventaja; +: ligera ventaja; ++: gran ventaja

4.4.2. Efecto del VPD y del déficit hídrico del suelo en *Q. ilex*

En los árboles bien regados de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*, un aumento del VPD se vio compensado por una reducción de la conductancia estomática, tal y como se había informado previamente en esta misma especie (Mediavilla y Escudero, 2003; Aguadé *et al.*, 2015). En el presente estudio, un aumento de 2 a 4 kPa resultó en una reducción de aproximadamente el 25% en la conductancia, independientemente de las condiciones del suelo (Figura 4.7d). Cuando un aumento del a 4 kPa se combinó con el déficit hídrico del suelo, la respuesta de *Quercus ilex* a ambos estreses resultó en una disminución adicional de aproximadamente 20% en la conductancia estomática. Así, el estrés hídrico del suelo y el atmosférico tienen un efecto aditivo, con la desecación del suelo causando una disminución general de *g*, pero sin afectar al umbral crítico en respuesta al VPD (aproximadamente 2kPa; ver ED50 en Tabla 4.3). En consecuencia, se mantiene una respuesta similar de *g* al VPD independientemente de las condiciones hídricas del suelo, rechazando la primera hipótesis.

En general, nuestros resultados confirman que el VPD es un regulador sustancial de la respuesta estomática y por tanto, de la transpiración (Novick *et al.*, 2016, 2019; Grossiord *et al.*, 2020). En condiciones de buen riego, la reducción de *g* compensó solo parcialmente el aumento de la transpiración con el VPD, tanto a escala horaria como diaria. En este sentido, la respuesta de ahorro de agua de *Quercus ilex* frente al VPD fue

menos efectiva que en especies mediterráneas más isohídricas (Tatarinov *et al.*, 2016). Por el contrario, en condiciones de déficit hídrico del suelo, el efecto combinado del estrés hídrico atmosférico y del suelo disminuyó la pérdida de agua al reducir aún más la conductancia estomática. Esto podría ser una estrategia eficaz para reducir la tensión del xilema impulsada por la transpiración y prevenir la embolia inducida por la sequía (Martin-StPaul *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2020; Capítulo 2 de la presente Tesis). Además, esta estrategia de ahorro de agua junto con la alta resistencia del xilema a la cavitación inducida por la sequía que muestra *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* tanto en los tallos (50% de pérdida de conductividad hidráulica, PLC₅₀, aproximadamente -6,0 MPa) como en los brotes (PLC₅₀ aproximadamente -6,5 MPa; Alonso-Forn *et al.*, 2021), supone un amplio margen de seguridad para evitar el embolismo masivo (Vilagrosa *et al.*, 2003). Adicionalmente, cabe considerar el diferente comportamiento que podría tener *Quercus ilex* en poblaciones de Francia o Italia, donde la otra subespecie, *Quercus ilex* subsp. *ilex*, mostró una sensibilidad similar al VPD y al déficit hídrico del suelo, pero con una menor tolerancia a la tensión del xilema (Tognetti *et al.*, 1998), y por tanto, un menor margen de seguridad. La existencia de diferentes ecotipos dentro de este paradigma de árbol mediterráneo (Peguero-Pina *et al.*, 2014) debe ser tenida en cuenta en cuanto a su interpretación ecológica.

El análisis de trayectorias mostró que, en general, el déficit de agua en el suelo y la demanda evaporativa son factores importantes para explicar el cierre estomático, pero su peso relativo varía a lo largo del día. Durante la mañana, el SWP tuvo el menor efecto sobre la g_t , en parte debido a las condiciones ambientales más favorables (menor VPD), y al papel de las limitaciones de luz durante este periodo. Al mediodía, cuando la luz no es limitante, y el VPD aún no alcanza su máximo diario, el SWP muestra el mayor efecto sobre el g_t . Finalmente, durante la tarde, coincidiendo con la mayor demanda evaporativa, el VPD muestra el mayor efecto sobre g_t . Esto implica que la disminución de la conductancia estomática por la tarde debido al elevado VPD, sigue desempeñando un papel importante en condiciones de buen riego y, como se discute más adelante, se convierte en crítico para la fotosíntesis, incluso en condiciones de sequía moderada, como es el caso nuestro estudio. En términos de balance hídrico, sin embargo, la estrategia de ahorro de agua es exitosa, permitiendo mantener tasas de transpiración casi constantes durante el día bajo condiciones bien regadas, e incluso disminuyendo bajo sequía (Alonso-Forn *et al.*, 2021).

4.4.3. Consecuencias de un mayor VPD en la ganancia de carbono

La encina es muy sensible a la sequía, como se ha demostrado en este estudio o en otros anteriores (Mediavilla y Escudero, 2003, 2004; Aguadé *et al.*, 2015; Alonso-Forn *et al.*, 2021; Capítulo 3 de la presente Tesis). Este hecho hace que la máxima productividad de la encina (medida como ganancia de carbono) se restrinja a una estrecha ventana de condiciones ambientales, es decir, $VPD < 2$ KPa y $SWP > -0,5$ MPa, en este experimento usualmente registradas para árboles bien regados durante sólo dos horas al día en promedio, desde aproximadamente 7:30 a 9:30 h hora solar (**Figura 4.10**). Además, independientemente del VPD, los valores de temperatura de la hoja por encima de 30 °C también podrían inducir una reducción de las tasas fotosintéticas máximas (Gratani *et al.*, 2000) debido a limitaciones en el metabolismo (Haldimann *et al.*, 2008), lo que podría contribuir a una reducción de la WUE. Por tanto, la ganancia real de carbono de la encina puede ser mucho menor que su potencial, volviéndose menos eficiente en el uso de los recursos hídricos, lo que puede amenazar la productividad, el crecimiento y la supervivencia a largo plazo de esta especie, de acuerdo con la segunda hipótesis.

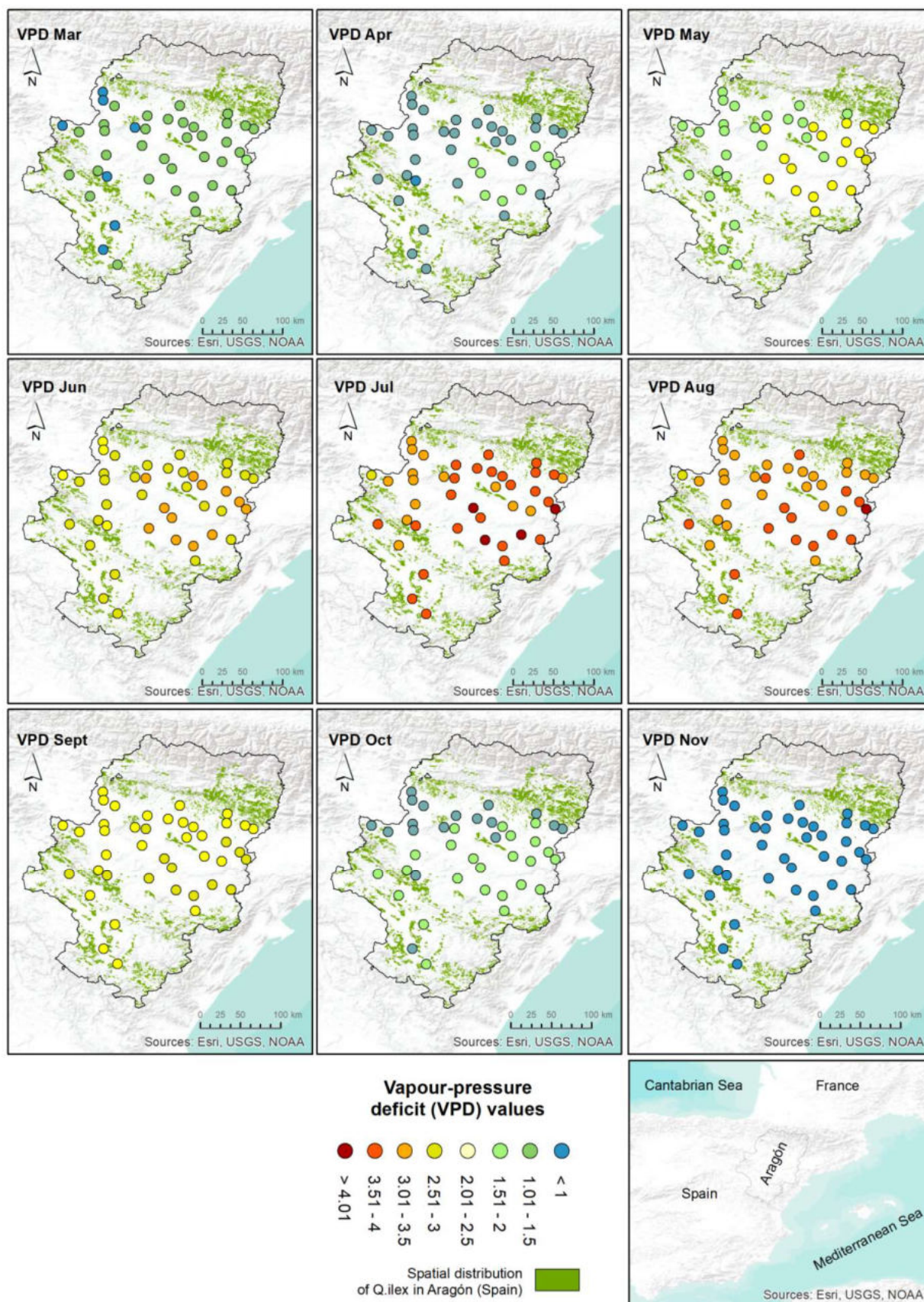


Figura 4.14 Mapa superpuesto de la distribución espacial natural de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (sombreado en verde) y los valores del rango de VPD a lo largo del periodo vegetativo, de marzo a

noviembre (círculos de color) en Aragón (noreste de España). Cada círculo corresponde a una estación meteorológica. El VPD se ha calculado como el valor medio mensual de un periodo de 10 años, de 2010 a 2020. Datos climáticos obtenidos del SIAR-Sistema de Información Agroclimática para el regadío www.siar.es (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente).

En la práctica, al evaluar las condiciones ambientales de verano registradas durante la monitorización de IR, encontramos que sólo el 14,7% de las horas de luz con $\text{PAR} > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ son propensas a alcanzar las máximas tasas de ganancia de carbono. Sin embargo, como árbol perenne, *Quercus ilex* podría estar ganando carbono también durante el resto del periodo vegetativo (Corcuera *et al.*, 2005; Alonso-Forn *et al.*, 2022), donde la ventana de condiciones óptimas podría ser mayor (**Figura 4.1**), y por tanto, compensando la estación estival del clima mediterráneo. Esto puede conllevar implicaciones en la productividad a nivel de ecosistema, pero también para la gestión de las plantaciones de árboles. La encina se utiliza en plantaciones para la producción de trufa, donde el déficit hídrico del suelo se elimina con programas de riego bien diseñados (Águeda *et al.*, 2010). Si este hubiera sido el caso del presente estudio y no se hubiera interrumpido el riego, manteniendo así las condiciones de buen riego del suelo durante todo el periodo experimental (desde el día del año 171 hasta el 220), el porcentaje de horas en los que la encina habría alcanzado las tasas máximas de fotosíntesis durante el periodo estudiado, sólo habría aumentado hasta el 29,6% de las horas de luz. Por lo tanto, el estrés hídrico atmosférico por sí solo puede impedir alcanzar condiciones óptimas de funcionamiento a pesar de eliminar el déficit de agua en el suelo. Esto sugiere que los programas de riego que mantienen continuamente los suelos a capacidad de campo podrían estar obsoletos, ya que provocarían un desperdicio en el agua de riego, si el VPD ya limita las tasas máximas de fotosíntesis.

Dada la importancia del VPD en la determinación de las ganancias de carbono de la encina, cabría esperar que la distribución natural de esta especie también dependiera del rango de valores de VPD a lo largo del periodo vegetativo. Efectivamente, al analizar la distribución natural de la encina en una región del noreste de España (**Figura 4.14**), se ha observado que la distribución natural de la encina coincide prácticamente con las áreas con menor VPD durante el periodo vegetativo (de marzo a noviembre), sugiriendo un papel relevante del VPD, en la conformación de la vegetación, similar a otros factores como las propiedades del suelo, o los patrones geográficos de las precipitaciones.

4.5. Conclusión

Los métodos utilizados en este estudio para monitorizar el VPD se complementan entre sí, con la cámara de planta entera proporcionando una visión global de la respuesta de todo el árbol, y la termometría IR, proporcionando una monitorización a lo largo de todo el periodo de sequía estival de forma no invasiva. En comparación con las mediciones a escala foliar, los tres métodos proporcionaron relaciones negativas similares entre el VPD y la conductancia, con discrepancias asociadas a la escala de medición. Los resultados mostraron que el estrés hídrico atmosférico y del suelo tenían un efecto aditivo. En condiciones de buen riego, un aumento del VPD se compensó parcialmente con una reducción de la conductancia estomática, lo que dio lugar a un ligero aumento de las tasas de transpiración. Con déficit hídrico en el suelo, la respuesta al VPD, se tradujo en una mayor disminución de la conductancia estomática, reduciendo la transpiración como estrategia de ahorro de agua. Finalmente, esta alta sensibilidad a la sequía, hace que las tasas máximas de ganancia de carbono de la encina, se restrinjan a condiciones ambientales particulares, que puedan modular su rendimiento fisiológico y su distribución natural.

4.6. Apéndice A. Cálculo de la conductancia foliar

La transpiración de la hoja (E , en $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se estimó a partir de la diferencia entre la temperatura del dosel medida (T_c), y la temperatura de la hoja modelada para una superficie seca (T_{dry}), según las ecuaciones de balance de energía (Jones, 1992):

$$E = C_p(g_{bH} + g_r)(T_{dry} - T_c)/L \quad (\text{A1})$$

donde C_p es la constante de calor específico molar del aire a presión constante ($29,2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), g_{bH} y g_r son la conductancia térmica (sensible) de la capa límite y la conductancia térmica radiativa, respectivamente (en $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$), y L es el calor molar de vaporización (44012 J mol^{-1}). g_{bH} y g_r se calcularon siguiendo Ball *et al.* (1988), y Jones (1992), respectivamente:

$$g_{bH} = 1/(3.8LA^{1/4}u^{-1/2}) \quad (\text{A2})$$

$$g_r = (4\sigma\epsilon_l T_{air}^2)/C_p \quad (\text{A3})$$

donde LA es el área foliar (en m^2), u es la velocidad del viento (en m s^{-1}), σ es la constante de Stefan-Boltzmann ($5,67 \cdot 10^{-8} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$), y ϵ_l es la emisividad de onda larga de la hoja (0,98). La T_{dry} se estimó utilizando el modelo de temperatura de la hoja descrito en Barbour *et al.* (2000), tras eliminar el término evaporativo ($L \cdot D$, donde D es el déficit de concentración de vapor de agua (mol^{-1})):

$$T_{dry} = \frac{(g_{bH} + g_r)(Q_0 * r_t)}{C_p(r_t + (sL/C_pP)(g_{bH} + g_r))} + T_{air} \quad (\text{A4})$$

donde Q_0 es la radiación neta isotérmica (en W m^{-2} , para los cálculos véase el Apéndice B), r_t es la resistencia total de la hoja al vapor de agua (estomática + capa límite, en $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$), s es la pendiente de la curva que relaciona la temperatura con la presión de vapor saturado (en kPa K^{-1}), y P es la presión en kPa . La pendiente s se ha calculado de la siguiente manera (Barbour *et al.*, 2000; Postl y Bolhàr-Nordenkamp, 1983):

$$s = a \left\{ \frac{[(T_{air} + b)(c - 2 \frac{T_{air}}{d}) - T_{air}(c - \frac{T_{air}}{d})]}{(T_{air} + b)^2} \right\} * \exp\{T_{air}[\frac{(c - \frac{T_{air}}{d})}{(T_{air} + b)}]\} \quad (\text{A5})$$

donde $a=6,13753$, $b=255,57$, $c=18,564$ y $d=254,4$.

La conductancia foliar total (g_t , en $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se calculó según von Caemmerer y Farquhar (1981):

$$g_t = E \frac{[1 - (w_i + w_a)/2]}{(w_i - w_a)} \quad (\text{A6})$$

donde w_i y w_a representan las fracciones mol de vapor de agua dentro de la hoja y en el aire circundante, respectivamente. La resistencia total de la hoja ($r_t = 1/g_t$) se utilizó como variable de entrada en la ecuación **A4**, por lo que los cálculos se hicieron de forma iterativa, estableciendo un valor inicial para $g_t = 0,2 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y recalculando con las ecuaciones **A1-A6** hasta que los valores de entrada y salida convergieron a una diferencia absoluta media $< 0,0001 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.7. Apéndice B. Cálculo de la radiación neta isotérmica

La radiación horizontal (Q_{sensor}) se determinó a partir de las mediciones locales de la radiación fotosintéticamente activa (en inglés photosynthetically active radiation, PAR) (sensor cuántico QSO, Apogee Instruments, Logan, EE.UU.), asumiendo una relación típica entre la radiación de onda corta y la PAR de $0,5 \text{ MJ mol}^{-1}$ (Jones, 1992). Estimamos la fracción de radiación difusa (K_{diff}) a partir de la fracción transmitida (K_t), según Boland *et al.* (2008):

$$K_{\text{diff}} = 1/[1 + \exp(8.6K_t - 5)] \quad (\text{B1})$$

donde K_t se calcula como la relación entre la radiación horizontal medida y la radiación solar horizontal máxima teórica, determinada a partir de la constante solar (1370 W m^{-2}) y la elevación solar (para más detalles, véase el Apéndice 7 de Jones, 1992). A partir de K_{diff} , calculamos la radiación difusa (Q_{diff}) y directa (Q_{dir}) que llega al sensor. Siguiendo la ley del coseno de Lambert, determinamos la radiación directa incidente en la superficie del dosel ($Q_{\text{dir-dosel}}$) multiplicando Q_{dir} por la relación entre el coseno del ángulo entre la superficie y el sol ($\cos \xi$), para el dosel y el sensor, respectivamente (Jones, 1992):

$$\cos \xi = \frac{[(\sin \lambda \cos h)(-\cos \alpha \sin \chi) - \sin h (\sin \alpha \sin \chi) + (\cos \lambda \cos h) \cos \chi] \cos \delta + [\cos \lambda (\cos \alpha \sin \chi) + \sin \lambda \cos \chi] \sin \delta}{\cos \lambda \cos h} \quad (\text{B2})$$

donde λ es la latitud, h es el ángulo horario del sol, α y χ son el ángulo cenital y el acimut de la superficie, respectivamente, y δ es la declinación. δ y h se determinaron utilizando las funciones declinación y ángulo horario, disponibles en el paquete R insol 1.2. Para el sensor, $\chi=0$ (superficie horizontal) y α resulta irrelevante. Para la cubierta, $\chi=45^\circ$ y $\alpha=189,2^\circ$. Finalmente, la radiación neta isotérmica total (Q_0) que llega al dosel se calculó como la suma de Q_{diff} y $Q_{\text{dir-dosel}}$, multiplicada por un coeficiente de absorción foliar medio de 0,5 (Jones, 1992), y una eficiencia de recolección de luz, que tiene en cuenta el autosombreado dentro del dosel, de 0,62 en *Q. ilex* (Esteso-Martínez *et al.*, 2006).

4.8. Bibliografía

- Acherar, M., Rambal, S. 1992. Comparative water relations of four Mediterranean oak species. *Vegetatio* 99–100, 177–184. <https://doi.org/10.1007/BF00118224>
- Aguadé, D., Poyatos, R., Rosas, T., Martínez-Vilalta, J., 2015. Comparative drought responses of *Quercus ilex* L. and *Pinus sylvestris* L. in a montane forest undergoing a vegetation shift. *Forests* 6, 2505–2529. <https://doi.org/10.3390/f6082505>
- Águeda, B., Fernández-Toirán, L.M., de Miguel, A.M., Martínez-Peña, F. 2010. Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation. *For. Syst.* 19(1), 89–97. <https://doi.org/10.5424/fs/2010191-01170>
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., Mencuccini, M., Mendoza-Herrer, Ó., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2021. Contrasting functional strategies following severe drought in two Mediterranean oaks with different leaf habit: *Quercus faginea* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* 41, 371–387. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa135>
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., García-Plazaola, J.I., Martín-Sánchez, R., Niinemets, U., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E. 2022. Cell-level anatomy explains leaf age-dependent declines in mesophyll conductance and photosynthetic capacity in the evergreen Mediterranean oak *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* Tpac049. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpac049>

- Andrews, P.K., Chalmers, D.J., Moremong, M., 1992. Canopy-air temperature differences and soil water as predictors of water stress of apple trees grown in a humid, temperate climate. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(3), 453-458. <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.3.453>
- Ball, M.C., Cowan, I.R., Farquhar, G.D., 1988. Maintenance of leaf temperature and the optimization of carbon gain in relation to water loss in a tropical mangrove forest. *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 263-276. <https://doi.org/10.1071/PP988026310.1071/pp9880263>.
- Barbour, M.M., Fischer, R.A., Sayre, K.D., Farquhar, G.D., 2000. Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27, 625–637. <https://doi.org/10.1071/PP99041> doi:10.1071/pp99041.
- Barkhordarian, A., Saatchi, S.S., Behrangi, A., Loikith, P.C., Mechoso, C.R., 2019. A recent systematic increase in vapor pressure deficit over tropical South America. *Sci. Rep.* 9, 15331. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51857-8>.
- Barradas, V.L., Ramos-Vázquez, A., Orozco-Segovia, A., 2004. Stomatal conductance in a tropical xerophilous shrubland at a lava substratum. *Int. J. Biometeorol.* 48(3), 119-27. <https://doi.org/10.1007/s00484-003-0195-x> doi: 10.1007/s00484-003-0195-x
- Bellot, J., Urbina, A.O., Bonet, A., Sanchez-Montahud, J.R. 2002. The effects of treeshellter on the growth of *Quercus coccifera* L. seedlings in semiarid environment. *Forestry* 75(1), 89. <https://doi.org/10.1093/forestry/75.1.89>
- Bonan, G.B., Patton, E.G., Finnigan, J.J., Baldocchi, D.D., Harman, I.N. 2021. Moving beyond the incorrect but useful paradigm: reevaluating big-leaf and multilayer plant canopies to model biosphere-atmosphere fluxes – a review. *Agric. For. Meteorol.* 306, 108435. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108435>
- Boland, J., Ridley, B., Brown, B. 2008. Models of diffuse solar radiation. *Renew. Energy* 33, 575-584. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2007.04.012>
- Carnicer, J., Barbeta, A., Sperlich, D., Coll, M., Peñuelas, J., 2013. Contrasting trait syndromes in angiosperms and conifers are associated with different responses of tree growth to temperature on a large scale. *Front. Plant Sci.* 4, 409. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00409>
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A., Gil-Pelegrín, E., 2005. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* subsp. *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian peninsula. *Tree Physiol.* 25:599–608. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.5.599>
- Dai, A., Zhao, T., Chen, J., 2018. Climate change and drought: A precipitation and evaporation perspective. *Curr. Clim. Change Rep.* 4(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s40641-018-0101-6>
- Ding, J., Yang, T., Zhao, Y., Liu, D., Wang, X., Yao, Y., Peng, S., Wang, T., Piao, S., 2018. Increasingly important role of atmospheric aridity on Tibetan alpine grasslands. *Geophys. Res. Lett.* 45, 2852–2859. <https://doi.org/10.1002/2017GL076803>
- Epskamp, S., 2015. semPlot: Unified visualizations of structural equation models. *Struct. Equ. Model.* 22(3), 474–483. <https://doi.org/10.1080/10705511.2014.937847>
- Esteso-Martínez, J., Valladares, F., Camarero, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2006. Crown architecture and leaf habit are associated with intrinsically different light-harvesting efficiencies in *Quercus* seedlings from contrasting environments. *Ann. For. Sci.* 63, 511-518. <http://dx.doi.org/10.1051/forest:200603310.1051/forest:2006033>.
- Ficklin, D.L., Novick, K.A., 2017. Historic and projected changes in vapor pressure deficit suggest a continental-scale drying of the United States atmosphere. *J. Geophys. Res. Atmos.* 122(4), 2061–2079. <https://doi.org/10.1002/2016jd025855>

- Gil-Pelegrín, E., Saz, M.A., Cuadrat, J.M., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017. Oaks under mediterranean-type climates: functional response to summer aridity. In: Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., eds. Oaks physiological ecology. Exploring the functional diversity of genus *Quercus* L. Cham, Switzerland: Springer International, 137–193.
- Gratani, L., Pesoli, P., Crescente, M.F., Aichner, K., Larcher, W. 2000. Photosynthesis as a temperature indicator in *Quercus ilex* L. Global Planet. Change 24, 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0921-8181\(99\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0921-8181(99)00061-2)
- Grossiord, C., Buckley, T.N., Cernusak, L.A., Novick, K.A., Poulter, B., Siegwolf, R. T.W., Sperry, J.S., McDowell, N.G., 2020. Plant responses to rising vapor pressure deficit. New Phytol. 226(6), 1550–1566. <https://doi.org/10.1111/nph.16485>
- Haldimann, P., Gallé, A., Feller, U. 2008. Impact of an exceptionally hot dry summer on photosynthetic traits in oak (*Quercus pubescens*) leaves. Tree Physiol. 28, 785–795. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.5.785>
- Hipps, L.E., Ashrar, G., Kanemasu, E.T., 1985. A theoretically based normalization of environmental effects on foliage temperature. Agric. Forest Meteorol. 35, 113–122. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(85\)90078-4](https://doi.org/10.1016/0168-1923(85)90078-4)
- Hu, R., Bournez, E., Cheng, S., Jiang, H., Nerry, F., Landes, T., Saudreau, M., Kastendeuch, P., Najjar, G., Colin, J., Yan, G. 2018. Estimating the leaf area of an individual tree in urban areas using terrestrial laser scanner and path length distribution model. ISPRS J. Photogramm. Remote Sens. 144, 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2018.07.015>
- Iglesias, A., Garrote, L., Flores, F., Moneo, M., 2007. Challenges to manage the risk of water scarcity and climate change in the Mediterranean. Water Resour. Manag. 21, 775–788. <https://doi.org/10.1007/s11269-006-9111-6>
- Jones, H. G., 1992. Plants and Microclimate; Cambridge University Press: Cambridge, U.K.; Vol. 2nd. Ed. ISBN 9780511845727.
- Jones, H.G., 1999. Use of infrared thermometry for estimation of stomatal conductance as a possible aid to irrigation scheduling. Agric. Forest Meteorol. 95, 139–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(99)00030-1)
- Jung, M., Reichstein, M., Ciais, P., Seneviratne, S. I., Sheffield, J., Goulden, M. L., Bonan, G., Cescatti, A., Chen, J., de Jeu, R., Dolman, A.J., Eugster, W., Gerten, D., Gianelle, D., Gobron, N., Heinke, J., Kimball, J., Law, B.E., Montagnani, L., Zhang, K.E., 2010. Recent decline in the global land evapotranspiration trend due to limited moisture supply. Nature 467(7318), 951–954. <https://doi.org/10.1038/nature09396>
- Kimm, H., Guan, K., Gentile P., Wu J., Bernacchi C.J., Sulman, B.N., Griffis T.J., Link C., 2020. Redefining droughts for the U.S. Corn Belt: The dominant role of atmospheric vapor pressure deficit over soil moisture in regulating stomatal behavior of Maize and Soybean. Agric. Forest Meteorol. 287, 107930. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.107930>
- Lang, A.R.G., McMurtriebm, R.E., 1992. Total leaf areas of single trees of *Eucalyptus grandis* estimated from transmittances of the sun's beam. Agric. Forest Meteorol. 58:79–92. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(92\)90112-H](https://doi.org/10.1016/0168-1923(92)90112-H)
- Li, C.C., 1975. Path Analysis – a primer. Pacific Grove. The Boxwood Press, California.
- Li, M., Yao, J., Guana, J., Zhenga, J. 2021. Observed changes in vapor pressure deficit suggest a systematic drying of the atmosphere in Xinjiang of China. Atmos. Res. 248, 105199. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2020.105199>

- Liu, L., Hoogenboom, G., Ingram, K.T., 2000. Controlled-environment sunlit plant growth chambers. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 19, 347–375. <https://doi.org/10.1080/07352680091139268doi:10.1080/07352680091139268>
- Lobell, D.B., Roberts, M.J., Schlenker, W., Braun, N., Little, B.B., Rejesus, R.M., Hammer, G.L., 2014. Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the U.S. Midwest. *Science* 344, 516–519. <https://doi.org/10.1126/science.1251423>
- López, J., Way, D.A., Sadok, W., 2021. Systemic effects of rising atmospheric vapor pressure deficit on plant physiology and productivity. *Glob. Change Biol.* 27, 1704–1720. <https://doi.org/10.1111/gcb.15548>
- Martin-StPaul, N., Delzon, S., Cochard, H., 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol. Lett.* 20, 1437–1447. <https://doi.org/10.1111/ele.12851>
- McAdam, S.A., Brodribb, T.J., 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* 167, 833–843. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252940>
- McAdam, S.A., Brodribb, T.J., 2016. Linking Turgor with ABA Biosynthesis: Implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. *Plant Physiol.* 171, 2008–2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00380>
- McDowell, N.G., Allen, C.D., 2015. Darcy’s law predicts widespread forest mortality under climate warming. *Nat. Clim. Chang.* 5 (7), 669–672. <https://doi.org/10.1038/nclimate2641>
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiol.* 23, 987–996. <https://doi:10.1093/treephys/23.14.987>.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2004. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *For. Ecol. Manag.* 187, 281–294. <https://doi:10.1016/j.foreco.2003.07.006>
- Miller, D.P., Howell, G.S., Flore, J.A. 1996. A whole-plant, open, gas-exchange system for measuring net photosynthesis of potted woody plants. *Hortoscience* 31, 944–946. <https://doi:10.21273/HORTSCI.31.6.944>
- Novick K.A., Miniat, C.F., Vose, J.M. 2016. Drought limitations to leaf-level gas exchange: results from a model linking stomatal optimization and cohesion–tension theory. *Plant Cell Environ.* 39, 583–596. <https://doi.org/10.1111/pce.12657>
- Novick K.A., Konings, A.G., Gentine, P., 2019. Beyond soil water potential: An expanded view on isohydricity including land–atmosphere interactions and phenology. *Plant Cell Environ.* 42, 1802–1815. <https://doi.org/10.1111/pce.13517>
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Barrón, E., Camarero, J.J., Vilagrosa, A., Gil-Pelegrín, E. 2014. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.* 114(2), 301–13. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu108>.
- Peguero-Pina, J.J., Vilagrosa, A., Alonso-Forn, D., Ferrio, J.P., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2020. Living in drylands: functional adaptations of trees and shrubs to cope with high temperatures and water scarcity. *Forests* 11, 1028. <https://doi.org/10.3390/f11101028>
- Postl, W.F., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., 1983. ‘GASEX’: a program to study the influence of data variations on calculated rates of photosynthesis and transpiration. In *Photosynthesis and production in a changing environment*; Hall, D.O., Scurlock, J.M.D., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R. C., Long, S. P., Eds.; Chapman and Hall: London, 1983; pp. 448–455

- Restaino, C.M., Peterson, D.L., Littell, J., 2016. Increased water deficit decreases Douglas fir growth throughout western US forests. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9557–9562. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602384113>
- Rey-Sánchez, A.C., Slot, M., Posada, J.M., Kitajima, K., 2016. Spatial and seasonal variation in leaf temperature within the canopy of a tropical forest. *Clim. Res.* 2016, 71, 75-89. <https://doi.org/10.3354/cr01427>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. *Plos One*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rosseel, Y. 2012. Lavaan: An R Package for Structural Equation Modeling. *Journal of Statistical Software*, 48(2), 1-36. URL <http://www.jstatsoft.org/v48/i02/>
- Sancho-Knapik, D., Álvarez-Arenas, T.G., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2010. Air-coupled broadband ultrasonic spectroscopy as a new non-invasive and non-contact method for the determination of leaf water status. *J. Exp. Bot.* 61(5), 1385-1391. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq001>
- Sancho-Knapik, D., Medrano, H., Peguero-Pina, J.J., Mencuccini, M., Fariñas, M.D., Álvarez-Arenas, T.G., Gil-Pelegrín, E., 2016. The application of leaf ultrasonic resonance to *Vitis vinifera* L. suggests the existence of a diurnal osmotic adjustment subjected to photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 7, 1601. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01601>
- Seager, R., Hooks, A., Williams, A.P., Cook, B., Nakamura, J., Henderson, N., 2015. Climatology, variability, and trends in the U.S. vapor pressure deficit, an important fire-related meteorological quantity. *J. Appl. Meteorol. Climatol.* 54 (6), 1121–1141. <https://doi.org/10.1175/JAMC-D-14-0321.1>
- Sepulcre-Canto, G., Zarco-Tejada, P.J., Jimenez-Munoz, J.C., Sobrino, J.A., Soriano, M.A., Fereres, E., Vega, V., Pastor, M., 2007. Monitoring yield and fruit quality parameters in open-canopy tree crops under water stress. Implications for ASTER. *Remote Sens. Environ.* 107, 455–470. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2006.09.014>
- Tatarinov, F., Rotenberg, E., Maseyk, K., Ogée, J., Klein, T., Dan Yakir, D. 2016. Resilience to seasonal heat wave episodes in a Mediterranean pine forest. *New Phytol.* 210, 485-496. <https://doi.org/10.1111/nph.13791>
- Taylor, N.J., Smit, T.G., Midgley, S.J.E., Annandale, J.G. 2020. Stomatal regulation of transpiration and photosynthesis in macadamias. *Acta Hortic.* 1281, 463-469. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1281.61>
- Tenhunen, A.J.D., Lange, O.L., Braun, M. 1981. Midday stomatal closure in Mediterranean type sclerophylls under simulated habitat conditions in an environmental chamber: II. Effect of the complex of leaf temperature and air humidity on gas exchange of *Arbutus unedo* and *Quercus ilex*. *Oecologia* 50, 5-11. <https://doi.org/10.1007/BF00378788>
- Tenhunen, A.J.D., Serra, A.S., Harley, P.C., Dougherty, R.L., Reynolds, J.F., 1990. Factors influencing carbon fixation and water use by Mediterranean sclerophyll shrubs during summer drought. *Oecologia* 82, 381-393. <https://doi.org/10.1007/BF00317487>
- Tognetti, R., Longobucco, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1998. Transpiration and stomatal behavior of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. *Plant Cell Environ.* 21, 613–622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00301.x>
- Turner, N.C., 1988. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.* 1988, 9, 289-308. <https://doi.org/10.1007/BF00296704>
- Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V.R., Gil-Pelegrín, E., 2003. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *J. Exp. Bot.* 54(390), 2015-2024. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg221>

- von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 1981, 153, 376–387. <https://doi.org/10.1007/BF00384257>.
- Williams, A.P., Allen, C.D., Macalady, A.K., Griffin, D., Woodhouse, C.A., Meko, D.M., Swetnam, T.W., Rauscher, S.A., Seager, R., Grissino-Mayer, H.D., Dean, J.S., Cook, E.R., Gangodagamage, C., Cai, M., McDowell, N.G., 2013. Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality. *Nat. Clim. Chang.* 3, 292–297. <https://doi.org/10.1038/nclimate1693>
- Williams, A.P., Seager, R., Berkelhammer, M., Macalady, A. K., Crimmins, M. A., Swetnam, T. W., Trugman, A. T., Buening, N., Hryniw, N., McDowell, N. G., Noone, D., Mora, C. I., Rahn, T. 2014. Causes and implications of extreme atmospheric moisture demand during the record-breaking 2011 wild fire season in the southwestern United States. *J. Appl. Meteorol. Climatol.* 53 (12), 2671–2684. <https://doi.org/10.1175/JAMC-D-14-0053.1>
- Yuan, W., Zheng, Y.I., Piao, S., Ciais, P., Lombardozzi, D., Wang, Y., Ryu, Y., Chen, G., Dong, W., Hu, Z., Jain, A.K., Jiang, C., Kato, E., Li, S., Lienert, S., Liu, S., Nabel, J.E.M.S., Qin, Z., Quine, T., Yang, S. 2019. Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Sci. Adv.* 5(8), eaax1396. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1396><https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1396>

CAPÍTULO 5

**Una precipitación de baja intensidad,
que no afecta a las condiciones edáficas,
reduce el estrés por sequía en *Quercus ilex* L.**

Resumen Capítulo 5

La sequía estival que caracteriza al clima mediterráneo incluye tormentas de baja precipitación (por debajo de 1 mm) como una de las formas de precipitación más comunes. Y aunque, estos eventos de baja precipitación se consideran insignificantes en términos del balance hídrico del suelo, podrían desempeñar un importante papel ecofisiológico en los árboles, ya que podrían reducir el estrés de la planta a través de la humectación del dosel y una posterior absorción de agua vía foliar. En este estudio, se monitorizó la respuesta a corto plazo de *Quercus ilex* L., una especie arbórea característica del paisaje mediterráneo, a un evento de baja precipitación ocurrido durante el periodo estival. Para ello se midió el déficit de presión de vapor (DPV; en inglés *vapor pressure deficit*, VPD), el potencial hídrico del suelo y de la planta, la conductancia foliar total (g_t), la máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_v/F_m), y el índice de reflectancia fisiológica (IRF, en inglés *photochemical reflectance index*, PRI). Se detectó que para un evento de lluvia de 0,6 mm, el potencial hídrico del suelo disminuyó 0,34 MPa mientras que el potencial hídrico de la planta antes del amanecer permaneció constante; el VPD máximo diaria disminuyó aproximadamente 3 kPa durante el evento de lluvia induciendo un incremento en g_t de alrededor de $100 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; también se observó una recuperación de los valores medios de F_v/F_m y PRI de aproximadamente 0,1 y 0,01, respectivamente. Así pues, las tormentas de baja precipitación podrían tener una importancia significativa a la hora de considerar el balance hídrico de una especie vegetal concreta al igual que otros fenómenos naturales, como la niebla o el rocío, ya considerados especialmente importantes en entornos sometidos a sequías temporales.

5.1. Introducción

Los bosques que habitan en climas de tipo mediterráneo tienen que hacer frente a un periodo de sequía estival, impuesto por una combinación de bajas precipitaciones, altas temperaturas y elevado déficit de presión de vapor (DPV, en inglés *vapor pressure deficit*, VPD), que ha sido aceptado como una severa limitación ecológica para la vida vegetal (Walter, 1985; Lionello *et al.*, 2006; Gil-Pelegrín *et al.*, 2017; Mediavilla *et al.*, 2003; Nardini *et al.*, 2014; Niinemets y Keenan, 2014; Peguero-Pina *et al.*, 2020). A pesar de una menor precipitación, el total de las precipitaciones de verano constituye el 24% de las precipitaciones de todo el año (refiriéndose a la Península Ibérica; <http://www.aemet.es>), donde las tormentas de corta duración son la forma de precipitación más común, siendo hasta el 100% de la lluvia caída durante julio y agosto (Mosmann *et al.*, 2004). Mientras que la mayor parte del agua caída en las tormentas de verano de alta precipitación podría no estar disponible para las raíces de las plantas debido a la escorrentía de las tormentas, las tormentas de baja precipitación (por debajo de 1 mm), que suponen el 54% de la precipitación total de verano (<http://www.aemet.es>), se consideran insignificantes en términos de balance hídrico del suelo (Allen *et al.*, 2000). Sin embargo, el agua procedente de las tormentas de verano que se deposita sobre la superficie de las hojas de una determinada especie podría desempeñar un papel ecofisiológico importante para el rendimiento de las plantas, similar al de otros fenómenos naturales, como la niebla o el rocío, que ya se consideran especialmente importantes en entornos sometidos a sequías temporales (Breshears *et al.*, 2008; Simonin *et al.*, 2009; Eller *et al.*, 2013, 2016; Dawson y Goldsmith, 2018). Por ejemplo, existen evidencias de la captación de agua vía foliar en desiertos (Martin y von Willert, 2000), bosques de montaña tropicales (Eller *et al.*, 2013, 2016; Gotsch *et al.*, 2014), hábitats de montaña sumergidos en nubes (Berry y Smith, 2012; Berry *et al.*, 2014), o regiones montañosas costeras donde la niebla es un factor climático importante (Simonin *et al.*, 2009; Burgess y Dawson, 2004).

Aunque los mecanismos que implican la captación de agua por vía foliar aún no se conocen del todo (Eichert y Fernández, 2012; Fernández *et al.*, 2017), el agua depositada en la superficie de una hoja puede penetrar a través de los estomas (Burkhardt *et al.*, 2012), la cutícula (Kerstiens, 2006), las estructuras epidérmicas especializadas como los tricomas (Pina *et al.*, 2016; Schreel *et al.*, 2020) y las escamas (Wang *et al.*, 2016), o por la base del tallo (Uematsu *et al.*, 2017). En este sentido, Fernández *et al.* (2014) analizaron en el laboratorio el proceso de captación de agua foliar en *Quercus ilex* L., una especie de roble perennifolio característica del paisaje de la Cuenca Mediterránea, registrando una importante recuperación del potencial hídrico en respuesta a la hidratación vía foliar. Los autores afirmaron que el aumento de la humectabilidad de la cara adaxial (haz) de las hojas de la encina facilitó la rehidratación de la hoja, posiblemente a través de los tricomas y de las cicatrices restantes tras el desprendimiento de los tricomas. Así, la captación directa de agua por parte del follaje de las tormentas de verano puede contribuir positivamente a la economía del agua de la encina durante los veranos secos del Mediterráneo.

Además, cuando se produce una tormenta de verano, los valores máximos de VPD disminuyen bruscamente desde el comienzo de la tormenta (Fernández *et al.*, 2014). Esto implica una disminución de la sequedad atmosférica, proporcionando no sólo condiciones óptimas para la absorción de agua foliar debido a una menor tasa de evaporación de las gotas de agua, sino también mejores condiciones atmosféricas para el crecimiento de las plantas (Ding *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019). Un menor VPD se ha asociado a una menor limitación fotosintética como consecuencia del aumento de la conductancia estomática (McDowell y Allen, 2015; Grossiord *et al.*, 2020; Capítulo 4 de la presente Tesis). Por el contrario, valores más altos de VPD pueden inducir el cierre estomático para evitar la pérdida excesiva de agua por transpiración, pero a costa de reducir la ganancia de carbono (Peguero-Pina *et al.*, 2020; Capítulo 4 de la presente Tesis). Como *Q. ilex*

muestra una alta sensibilidad estomática al VPD (Mediavilla y Escudero, 2003), incluso una tormenta con precipitaciones muy bajas podría ser positiva para su balance de carbono.

Teniendo en cuenta el marco antes mencionado, una tormenta de baja precipitación podría reducir el estrés de la encina impuesto por las condiciones estivales a través de la humectación del dosel y posterior captación de agua vía foliar, y por la disminución de la sequedad atmosférica. Si este es el caso, las tormentas de baja precipitación que son insignificantes en términos de balance hídrico del suelo (Allen *et al.*, 2000), podrían tener una importancia significativa cuando se considera el balance hídrico de la planta, por ejemplo, en los bosques naturales o en plantaciones donde *Q. ilex* desempeña un papel económico importante, como por ejemplo para la producción de trufa negra (García-Barreda y Camarero, 2020). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue monitorizar la respuesta fisiológica a corto plazo de *Q. ilex* a un evento de baja precipitación ocurrido durante el verano. Para alcanzar este objetivo, se monitorizó una plantación de árboles de *Q. ilex* para la producción de trufa antes y después de un evento de baja precipitación, midiendo varios parámetros relacionados con el rendimiento fisiológico de esta especie en respuesta al estrés hídrico (es decir, la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II, el índice de reflectancia fisiológica y la conductancia foliar total) (Sepulcre-Canto *et al.*, 2007; Alonso-Forn *et al.*, 2021; Capítulo 3 de la presente Tesis), así como las condiciones meteorológicas y edáficas. Nuestra hipótesis es que un evento de baja precipitación durante la sequía estival induciría una recuperación parcial en los árboles de *Q. ilex* sometidos a estrés hídrico sin aumentar significativamente la disponibilidad de agua en el suelo.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Condiciones experimentales

El seguimiento de un evento estival de baja precipitación tuvo lugar en una parcela experimental situada en el CITA de Aragón (41°39' N, 0°52' O, Zaragoza, España) durante julio del 2019. El área de estudio presenta un régimen climático mediterráneo con una temperatura media anual de 15,4 °C y una precipitación total anual de 298 mm (Capítulo 3 de la presente Tesis). La parcela experimental es una plantación de encinas destinada en primer lugar a la producción de trufas, donde la profundidad total del suelo es de unos 60 cm. Los árboles de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* de esta parcela tenían 25 años, plantados en 1998 con un patrón de 6x6 m. Los árboles se mantienen en buenas condiciones sanitarias, siendo regados con aspersores cuando es necesario, y podados cada dos años durante el invierno para obtener árboles con copas homogéneas de forma redondeada. La altura de los árboles era de 3 m aproximadamente, el diámetro de la proyección ortogonal de la copa oscilaba entre 2,0 y 2,5 m, y el porcentaje de cobertura de la copa sobre la superficie del suelo era de aproximadamente el 14 %. Dos veces al año (a principios del invierno y a principios del verano), la parcela experimental se limpia mecánicamente, eliminando la presencia del estrato herbáceo y arbustivo. Para el experimento, el riego de la parcela se interrumpió el 20 de junio de 2019. A partir de esta fecha, los árboles sólo recibieron el agua de los eventos de precipitación de verano. Las medidas y el seguimiento se realizaron en 3 ejemplares de *Q. ilex* subsp. *rotundifolia*.

Durante los días 26 y 27 de julio de 2019 se registró una tormenta estival de baja precipitación. La precipitación total, medida con un pluviómetro (Rain Collector II, Davis Instruments, Hayward, Ca, USA), fue de 0,6 mm. De esta cantidad de agua, una fracción de 0,4 mm se registró entre las 17:00 y las 19:30 h hora solar del 26 de julio, mientras que los otros 0,2 mm se registraron al día siguiente entre las 14:00 y las 15:00 h hora solar (**Figura 5.1**). Durante el evento de precipitación, obtuvimos el VPD midiendo cada 30 minutos la

temperatura del aire con una sonda PT100 de 4 hilos, y la humedad relativa del aire, registrada con un data logger Hobo Pro RH/Temp (U23-001; Onset Computer Corp., Pocasset, MA, USA). La velocidad horizontal del viento se registró con un anemómetro de copa (Oche Control y Equi-pamientos S.L., Cadrete, España). También se midió el potencial hídrico del suelo cada 30 minutos durante el experimento (**Figura 5.1**) utilizando 3 sensores de potencial hídrico del suelo (Teros 21, Meter Group Inc., Pullman, WA, USA). Cada uno de los 3 sensores de potencial hídrico se instaló bajo la copa de un árbol a una distancia de 50 cm de cada tronco y a 30 cm por debajo del suelo, en representación del sistema radicular.

Todos los dispositivos comenzaron a registrar el 20 de junio de 2019, coincidiendo con la parada de la irrigación. Las mediciones registradas el 5 de julio (tres semanas antes del evento de precipitación) fueron seleccionadas como control, ya que los árboles estaban todavía bien regados (potencial hídrico del suelo cercano a 0 MPa; **Figura 5.1**), y coincidieron con la primera monitorización de las plantas (ver más abajo).

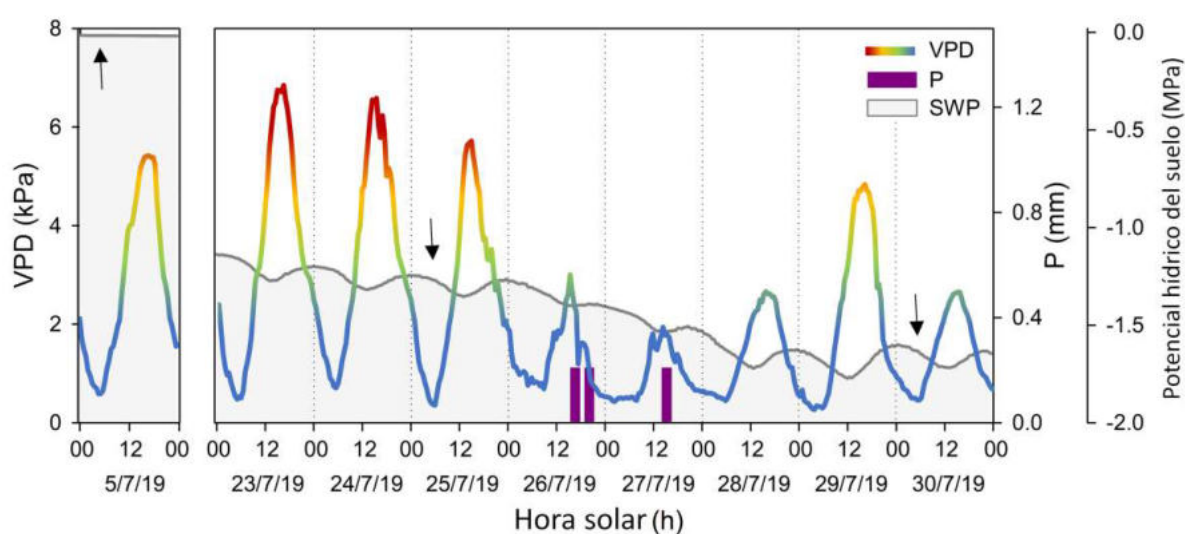


Figura 5.1. Evolución del déficit de presión de vapor (VPD), precipitación (P) y potencial hídrico del suelo (SWP) durante el control -en condiciones de buen riego (5/7/19)-, y durante el evento estival de baja precipitación bajo déficit hídrico del suelo (del 23/7/19 al 30/7/19). Los colores de la curva corresponden a los diferentes niveles de influencia del VPD sobre la conductancia estomática de *Q. ilex* según (Mediavilla y Escudero, 2003): azul, ninguna influencia; verde, 25% de reducción; amarillo, 50% de reducción; y rojo, más del 75% de reducción. La curva de potencial hídrico del suelo es la media de las tres curvas medidas. Las flechas indican el momento en que se midió el potencial hídrico de la planta.

5.2.2. Seguimiento de las plantas durante el evento de baja precipitación

El potencial hídrico de las plantas se midió antes del amanecer (entre las 4:30 y las 5:00 h hora solar) el 5 de julio (condiciones de buen riego), y el 25 y el 30 de julio, antes y después del evento de baja precipitación, respectivamente (**Figura 5.1**). Las mediciones se realizaron en un brote por árbol con una cámara de presión Scholander, siguiendo el procedimiento metodológico descrito por Turner (1988).

Las mediciones de fluorescencia de la clorofila (ChlF) se realizaron con un fluorímetro modulado FMS II (Hansatech Instruments, Norfolk, Reino Unido) antes del amanecer en 3 hojas adheridas del año en curso completamente desarrolladas de cada uno de los 3 ejemplares estudiados de *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* (es decir, tres hojas por árbol). La fluorescencia inicial de Chl en el estado de adaptación a la oscuridad (F_0) se

midio sólo con la luz modulada (0,6 kHz, PPFD <0,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), que evita el transporte de electrones a través del fotosistema II (PSII). La fluorescencia máxima de Chl en el estado adaptado a la oscuridad (F_M) se midió cerrando los centros de reacción con un pulso de 0,8 s de 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca (20 kHz). La F_0 se midió en presencia de luz roja lejana que oxida completamente el lado aceptor del PSII (Belkhdja *et al.*, 1998). La máxima eficiencia cuántica del PSII adaptada a la oscuridad se calculó como F_V/F_M , siendo $F_V = F_M - F_0$ (Abadía *et al.*, 1999). La F_V/F_M se midió el 5 de julio (en condiciones de buen riego), y el 25 y el 30 de julio, antes y después del evento de baja precipitación, respectivamente.

También se monitorizó el índice de reflectancia fisiológica (IRF, en inglés *photochemical reflectance index*, PRI) a escala de dosel en los 3 ejemplares estudiados de *Q. ilex* subsp. *rotundifolia*. Para ello, utilizamos tres sensores SRS-PRI (Field Stop Version, METER Group, Inc., WA, USA) dispuestos sobre mástiles para apuntar hacia el dosel y medir la radiación reflejada por el mismo en las longitudes de onda del PRI con un campo de visión restringido a 20°. Además, colocamos un sensor SRS-PRI (versión hemisférica, METER Group, Inc., WA, EE.UU.) con difusores de teflón apuntando hacia el cielo para realizar mediciones de la radiación solar incidente y usarlas como referencia. Todos los sensores se conectaron a un registrador de datos (Em50, METER Group, Inc., WA, USA) y las mediciones se almacenaron a intervalos de 2 minutos. El PRI se calculó como $(R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$, donde R_{531} y R_{570} representan, respectivamente, la reflectancia a 531 y 570 nm (Gamon *et al.*, 1997; Peguero-Pina *et al.*, 2008; Peguero-Pina *et al.*, 2013). Consideramos los valores medios de PRI entre las 11 y las 12 horas (hora solar) como una herramienta para monitorizar los cambios en el comportamiento fisiológico de esta especie en respuesta al estrés hídrico, tal y como se muestra en el Capítulo 3 de la presente Tesis.

La temperatura del dosel de cada árbol individual también se registró cada 30 segundos con termómetros infrarrojos (IRT 757-500, precisión del 0,5%, TC Ltd, Uxbridge, Reino Unido), calibrados con un PT100 de 4 hilos en el rango de 5-50°C en un baño de alta precisión (Julabo FP50, Julabo GmbH, Seelbach, Alemania). Este método tiene la ventaja de no ser invasivo, de mantener las condiciones del aire que rodea a las hojas y de integrar la información a nivel de la copa. Además, dado que cada árbol experimental tenía un dosel denso y homogéneo, se espera que las mediciones con termómetros infrarrojos (TIR, en inglés *infrared thermometer*, IRT) tengan un rendimiento tan óptimo como el de enfoques más complejos como la termografía (Hackl *et al.*, 2007). Tanto los sensores PRI como los IRT se situaron apuntando al lado sur del dosel superior, en un ángulo de 45°, a una distancia que pretendía cubrir 1 m² de la superficie del dosel. Hay que tener en cuenta que la exposición sur del dosel superior puede ser la zona con mayor demanda evaporativa durante el día, y las mediciones de temperatura y reflectancia obtenidas en esta zona, pueden diferir de otras zonas del dosel del árbol (Niinemets *et al.*, 2014; Rey-Sánchez *et al.*, 2016).

Para el posterior análisis de los datos, se seleccionaron los valores de temperatura del dosel asociados al máximo VPD diario (alcanzado entre las 14:30 y las 15:30 h hora sola). La transpiración de la hoja (E) y la conductancia total de la hoja al vapor de agua (g_t) se calcularon, en base a media hora, a partir de la temperatura del dosel y los datos micrometeorológicos utilizando un modelo de balance energético, siguiendo (Jones, 1992; Barbour *et al.*, 2000) (ver Apéndices A y B del capítulo 4 para más detalles).

5.2.3. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar las variables entre diferentes días. Se realizaron comparaciones múltiples para comparar g_t y E entre días, utilizando la prueba post-hoc de diferencia significativa honesta de Tukey. Se llevaron a cabo comparaciones de muestras emparejadas

utilizando las pruebas t de Student para comparar el potencial hídrico, F_v/F_m y PRI, antes y después del evento de lluvia. Para las comparaciones de potencial hídrico, se seleccionaron aquellos valores de potencial hídrico del suelo que coincidían en el tiempo con las mediciones de potencial hídrico de la planta (es decir, entre las 4:30 y las 5:00 h hora solar). Los valores se consideraron estadísticamente diferentes cuando los valores del P-valor fueron inferiores a 0,05. Todos los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el entorno de software R (versión 4.0.0, R Development Core Team, 2018).

5.3. Resultados

En condiciones de buen riego (potencial hídrico del suelo y de la planta cercano a 0 kPa), los valores medios ($\pm$ error estándar) de transpiración foliar y conductancia total registrados para un déficit de presión de vapor máximo (VPD_{max}) de $5,32 \pm 0,01$ kPa, fueron de $5,93 \pm 0,20$ y 172 ± 8 mmol H_2O $m^{-2} s^{-1}$, respectivamente.

Durante el evento de baja precipitación, registramos una reducción en el VPD_{max} desde aproximadamente 6 kPa a valores por debajo de 3 kPa (**Figura 5.2**) y un aumento significativo en la conductancia foliar total desde aproximadamente 50 a 150 mmol H_2O $m^{-2} s^{-1}$ ($P < 0,05$, **Figura 5.2**). Sin embargo, la transpiración foliar asociada a la VPD_{max} se mantuvo constante con valores entre 3 y 4 mmol H_2O $m^{-2} s^{-1}$ ($P > 0,05$, **Figura 5.2**).

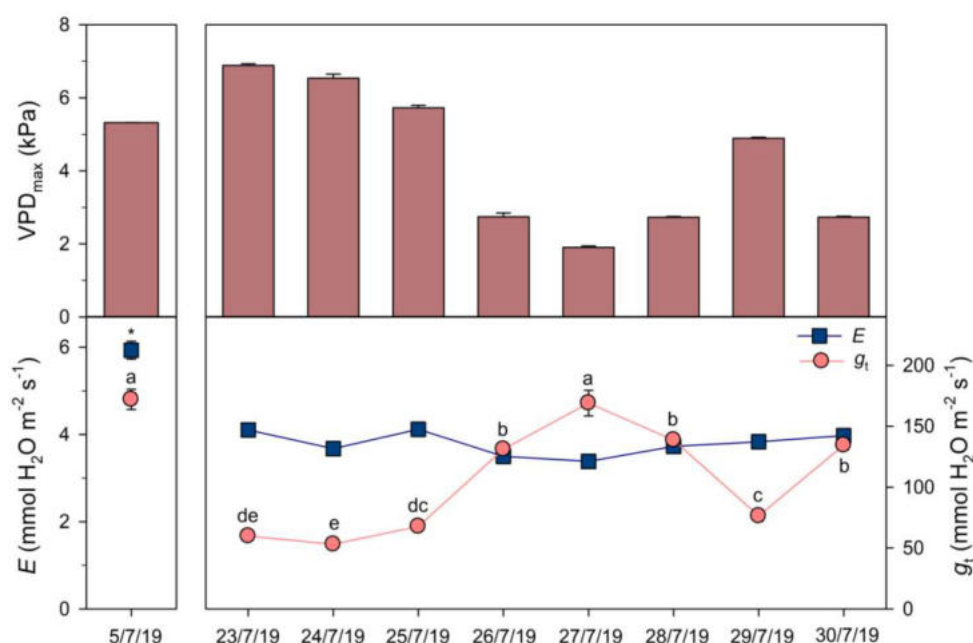


Figura 5.2 Evolución del déficit de presión de vapor máximo (VPD_{max}) para un día concreto y transpiración (E) y conductancia foliar total (g_t) asociadas a ese VPD_{max} . Letras diferentes sobre los valores de g_t indican diferencias significativas entre los días. El asterisco sobre E indica una diferencia significativa entre el 5/7/19 y el resto de los días (prueba de Tukey, $P < 0,05$).

El valor medio del potencial hídrico del suelo medido el 30 de julio después del evento de precipitación ($-1,63 \pm 0,27$ MPa), fue significativamente menor ($P < 0,05$), que el valor medio obtenido el 25 de julio medido antes del evento ($-1,29 \pm 0,23$ MPa). Por el contrario, los valores medios del potencial hídrico de la planta antes del amanecer medidos antes ($-1,25 \pm 0,04$ MPa) y después ($-1,36 \pm 0,17$ MPa) del evento de precipitación no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$; **Figura 5.3**).

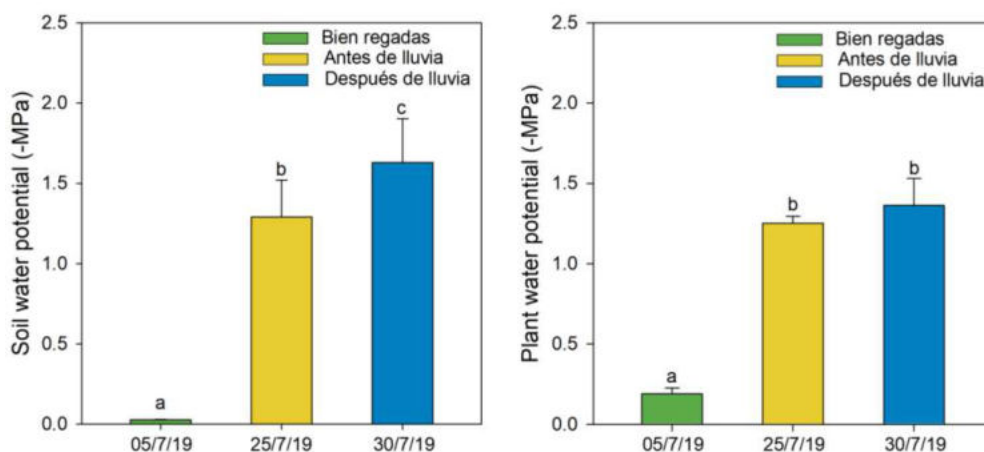


Figura 5.3 Potencial hídrico del suelo y de la planta medidos antes del amanecer para encinas bien regadas (verde), y en árboles con estrés hídrico antes (amarillo), y después (azul), del evento de baja precipitación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre días (prueba t de Student, $P < 0,05$).

La eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_V/F_M) aumentó significativamente ($P < 0,05$) desde $0,62 \pm 0,03$ (obtenido antes del evento de lluvia) a $0,73 \pm 0,02$ (medido después del evento), alcanzando un valor similar al encontrado cuando los árboles estaban bien regados (**Figura 5.4**). La misma tendencia se encontró para el índice de reflectancia fisiológica (PRI), donde el valor medio después del evento de baja precipitación ($0,0189 \pm 0,0101$), fue significativamente mayor, que el valor medio antes del evento ($0,0075 \pm 0,0098$, $P < 0,05$). Sin embargo, el PRI no alcanzó un valor similar al medido cuando los árboles estaban bien regados (**Figura 5.4**).

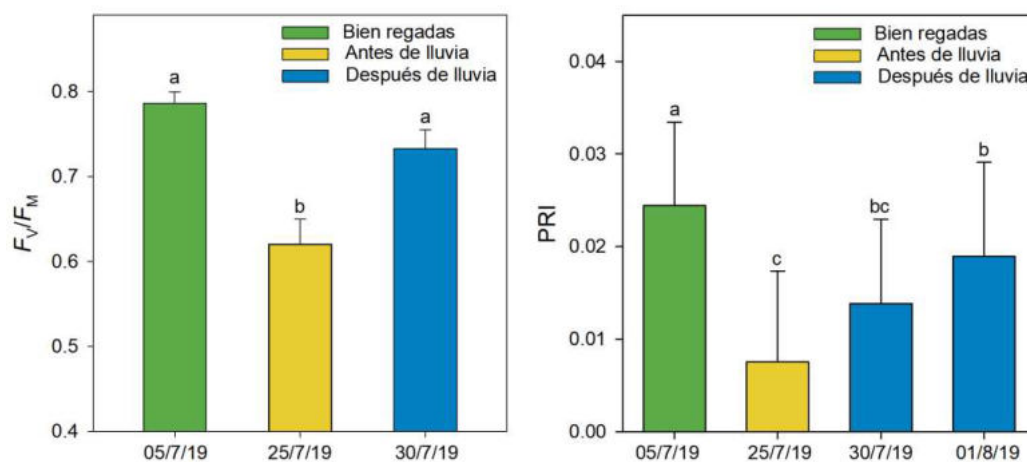


Figura 5.4 La máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_V/F_M) antes del amanecer, y el índice de reflectancia fisiológica (PRI) al mediodía, medidos en encinas bien regadas (es decir, con un potencial hídrico cercano a 0 MPa) (en verde), y en árboles con estrés hídrico antes (en amarillo), y después (en azul), de un evento de baja precipitación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre días (prueba t de Student, $P < 0,05$).

5.4. Discusión y Conclusiones

El evento de baja precipitación de 0.6 mm ocurrido durante la sequía estival en una parcela experimental de *Quercus ilex*, cambió temporalmente las condiciones atmosféricas disminuyendo la sequedad de la atmósfera o el llamado VPD (**Figuras 5.1 y 5.2**). En relación con estudios anteriores (por ejemplo, Mediavilla *et al.*, 2003), una disminución del VPD podría aumentar la conductancia estomática de *Quercus ilex*, lo que estaría en consonancia con el aumento de la conductancia foliar total encontrado en este estudio, incluso antes del comienzo de la lluvia misma. Es decir, el aumento de la conductancia foliar medido antes de la propia lluvia podría ser atribuible exclusivamente a la disminución del VPD. Además, la compensación entre VPD y conductancia foliar total encontrada para *Quercus ilex*, resultó en un mantenimiento de las tasas de transpiración durante el evento de lluvia. Para la disminución del VPD_{max} hasta 3 kPa aproximadamente (**Figura 5.2**), la transpiración debería haber disminuido considerablemente, pero, como *Quercus ilex* respondió abriendo los estomas, los niveles de transpiración se mantuvieron entre 3 y 4 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. Del mismo modo, al final del evento de lluvia, un aumento del VPD debería haber incrementado la transpiración, pero como *Quercus ilex* redujo la conductancia foliar cerrando estomas, los niveles de transpiración se mantuvieron constantes de nuevo. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos durante el evento de precipitación (con un cierto nivel de déficit hídrico en el suelo) con los valores medidos tres semanas antes cuando los árboles estaban bien regados, observamos que para el mayor VPD en condiciones de buen riego, la conductancia total es similar, pero con una transpiración foliar mayor. Es decir, la transpiración en la encina puede aumentar con el incremento en VPD si existe una mayor disponibilidad de agua en el suelo.

El aumento de la conductancia foliar podría conducir a un aumento de la fotosíntesis neta siempre que otros factores como la humedad del suelo y la radiación solar no la limiten (Alonso-Forn *et al.*, 2021; Capítulo 2 de la presente Tesis). En primer lugar, según Alonso-Forn *et al.* (2021), *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* alcanza tasas de fotosíntesis y valores de conductancia estomática insignificantes (es decir, cercanos a cero) a -4 MPa de potencial hídrico antes del amanecer. En nuestro estudio los árboles sólo fueron sometidos a un estrés hídrico moderado (potenciales de suelo en torno a -2MPa) con el que la encina sería capaz de mantener un balance de carbono positivo. En segundo lugar, los datos de radiación revelaron que las plantas podían aprovechar valores de radiación fotosintéticamente activa superiores a 1000 mol de fotones m⁻² s⁻¹ durante el evento de baja precipitación (**Figura 5.5**), lo que no limitó la posibilidad de aumentar la fotosíntesis neta durante este tiempo. Si este fuera el caso y la fotosíntesis neta no estuviera limitada por otros factores, la eficiencia en el uso del agua, calculada como la relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración, podría haber aumentado también durante el evento de baja precipitación, ya que la transpiración se mantuvo constante debido a la regulación estomática (**Figura 5.2**). Por otro lado, otros estudios asumen que el agua interceptada por el dosel podría reducir temporalmente la fotosíntesis debido a la oclusión de los estomas y a la dispersión y refracción de la radiación por el agua superficial (Gerlein-Safdi *et al.*, 2018; Pariyar *et al.*, 2017). Como *Quercus ilex* tiene una superficie abaxial no mojeable (Fernández *et al.*, 2014), la oclusión de los estomas por el agua podría no ocurrir. En cuanto al efecto de la reflexión por el agua superficial, se necesitaría más investigación para estudiar las consecuencias en *Quercus ilex*.

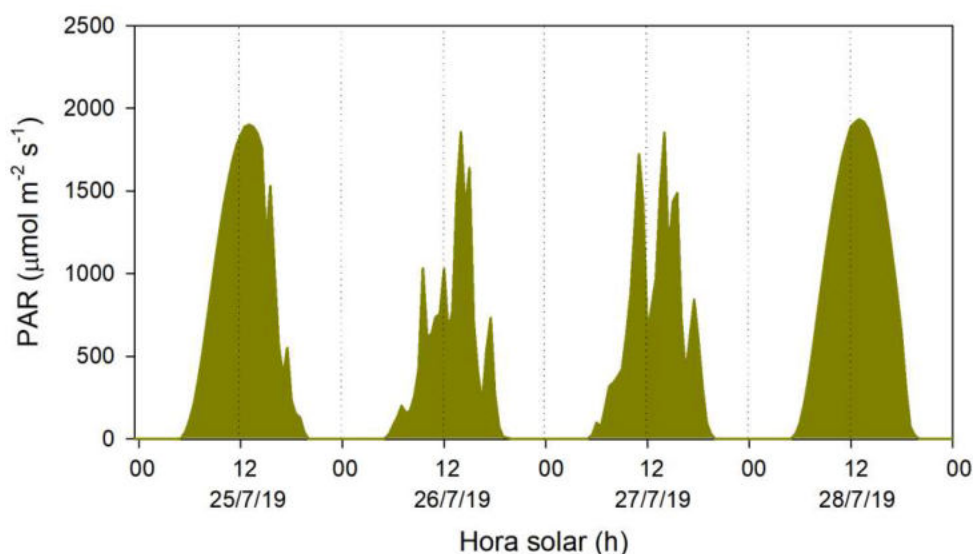


Figura 5.5 La radiación fotosintéticamente activa (PAR), registrada durante el evento de baja precipitación, mediante un sensor quantum QSO (Apogee Instruments, Logan, USA).

Junto con la reducción del VPD, los árboles podrían haber incrementado también su conductancia foliar total con una rehidratación de sus tejidos (Mediavilla y Escudero, 2003; Capítulo 2 de la presente Tesis) una vez iniciada la propia lluvia. En este caso, sería interesante medir en posteriores investigaciones la importancia relativa de cada factor en el aumento de la conductancia foliar. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el potencial hídrico del suelo se volvió más negativo después del evento de precipitación (**Figura 5.3**), por lo que la pequeña cantidad de agua registrada durante la lluvia no fue aparentemente suficiente para alcanzar las capas de las raíces del suelo donde se instalaron los sensores de potencial hídrico del suelo (30 cm de profundidad). En su lugar, el agua interceptada por el follaje y la posterior absorción de agua por las hojas debe ser el mecanismo utilizado por *Quercus ilex* para mantener el estado hídrico de las hojas (Fernández *et al.*, 2014), ya que no se encontraron diferencias en el potencial hídrico de la planta antes y después de la lluvia. De hecho, uno de los árboles monitorizados mostró una ligera recuperación del potencial hídrico de la planta antes del amanecer pasando de -1,24 a -1,10 MPa. La discrepancia entre el potencial hídrico del suelo y el de la planta antes del amanecer debido a la captación foliar de agua se evidenció recientemente en varias especies arbóreas de la Amazonia, donde los autores demostraron que la captación foliar elevaba el estado hídrico de la hoja por encima del valor más alto que podría alcanzarse sólo con la captación de agua del suelo (Binks *et al.*, 2019).

Como consecuencia de la supuesta captación de agua foliar detectada en este estudio, *Quercus ilex* mostró una recuperación de la máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_v/F_m) y una recuperación parcial del índice de reflectancia fisiológica (PRI, **Figura 5.4**), lo que concuerda parcialmente con nuestra hipótesis. La rápida recuperación de F_v/F_m tras el evento de baja precipitación hasta los valores fisiológicos normales podría deberse a la capacidad de esta especie para mantener intacta la maquinaria de pigmentos fotosintéticos, tal y como informaron Peguero-Pina *et al.* (2009). Por lo tanto, tal y como afirman estos autores, las disminuciones de F_v/F_m no se interpretarían como un daño permanente del aparato fotosintético, sino como un mecanismo fotoprotector que permite a esta especie aclimatarse a condiciones más estresantes. La variación en el PRI también se consideraría en estos términos, ya que los cambios en este parámetro están asociados a variaciones en las formas desoxidadas de las moléculas del ciclo de la xantofila (antheraxantina y zeaxantina) (Peguero-Pina *et al.*, 2008, 2013), lo que constituye un mecanismo

eficiente para disipar el exceso de energía lumínica en muchas especies vegetales (Demmig-Adams y Adams, 2006), como *Quercus ilex* (Peguero-Pina *et al.*, 2009). En consecuencia, la recuperación parcial del PRI observada en este estudio podría ser consecuencia de la retención parcial de anteraxantina y zeaxantina, ya que el potencial hídrico de la planta no se recuperó completamente después de la lluvia. De todos modos, el aumento observado del PRI después del evento de baja precipitación indicaría un aumento de la actividad fotosintética de la planta después del evento de baja precipitación. También hay que señalar que para los valores de potencial hídrico registrados en este estudio, los valores de F_V/F_M y PRI no coinciden con los estudios anteriores (Alonso-Forn *et al.*, 2021; Peguero-Pina *et al.*, 2009; Capítulo 3 de la presente Tesis). Esta discrepancia podría deberse a las diferencias en el diseño experimental. En este estudio, las mediciones se realizaron en árboles adultos en condiciones de campo, lo que implicó una disminución más lenta del potencial hídrico antes del amanecer en comparación con los estudios anteriores en plantas en maceta.

Teniendo en cuenta esta recuperación encontrada durante la estación seca, los eventos de baja precipitación deberían ser considerados en la visión clásica de las interacciones planta-atmósfera. Además, otros tipos de fenómenos hídricos, como el rocío debido a la condensación, también deben ser considerados ya que esta precipitación oculta también puede suministrar pequeñas pero esenciales cantidades de agua a lo largo de la estación seca (Binks *et al.*, 2019). De hecho, el rocío se produce aproximadamente en el 20% de los días de verano en las zonas de cultivo de encinas de la Península Ibérica (<http://www.aemet.es>). Durante estos días, el agua derivada del rocío puede ser utilizada para la transpiración matinal, lo que podría ser crucial en la tolerancia del bosque a la sequía. Este tema debería merecer más atención de la comunidad científica en futuras investigaciones.

5.5. Bibliografía

- Abadía, J., Morales, F., Abadía, A., 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil*, 215, 183–192.
- Allen, R.G., Walter, I.A., Elliott, B., Mechan, B., Jensen, M.E., Itentisu, D., Howell, T.A., Snyder, R., Brown, P., Eching, S., et al., 2000. Issues, requirements and challenges in selecting and specifying and standardized ET equation. Proceedings of the 4th Decennial Symposium, Phoenix, Arizona, USA, November 14-16; Evans, R.G.; Benham, B.L.; Trooien, T.P., Eds. American Society of Agricultural Engineers, Saint Joseph, pp 201–204.
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., Mencuccini, M., Mendoza-Herrer, Ó., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2021. Contrasting functional strategies following severe drought in two Mediterranean oaks with different leaf habit: *Quercus faginea* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.*, 41, 371–387 DOI: 10.1093/treephys/tpaa135
- Barbour, M.M., Fischer, R.A., Sayre, K.D., Farquhar, G.D., 2000. Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27, 625–637, doi:10.1071/pp99041.
- Belkhdja, R., Morales, F., Quílez, R., López-Millán, A.F., Abadía, A., Abadía, J., 1998. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res.*, 56, 265–276. DOI: 10.1023/A:1006039917599
- Berry, Z.C., Smith, W.K., 2012. Cloud pattern and water relations in *Picea rubens* and *Abies fraseri*, southern Appalachian Mountains, USA. *Agric. For. Meteorol.*, 162, 27-34. DOI: 10.1016/j.agrformet.2012.04.005

- Berry, Z.C., Hughes, N.M., Smith, W.K., 2014. Cloud immersion: an important water source for spruce and fir saplings in the southern Appalachian Mountains. *Oecologia*, 174, 319-326. DOI: 10.1007/s00442-013-2770-0
- Binks, O., Mencuccini, M., Rowland, L., da Costa, A.C.L., Reis de Carvalho, C.J., Bittencourt, P., Eller, C., Sales Teodoro, G., Maklouf Carvalho, E.J., Azul Soza, A., et al., 2019. Foliar water uptake in Amazonian trees: Evidence and consequences. *Glob. Change Biol.*, 25, 2678-2690. DOI: 10.1111/gcb.14666
- Breshears, D.D., McDowell, N.G., Goddard, K.L., Dayem, K.E., Martens, S.N., Meyer, C.W., Brown, K.M., 2008. Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. *Ecology*, 89, 41-47. DOI: 10.1890/07-0437.1
- Burgess, S.S.O., Dawson, T.E., 2004. The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell Environ.*, 27, 1023-1034. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01207.x
- Burkhardt, J., Basi, S., Pariyar, S., Hunsche, M., 2012. Stomatal penetration by aqueous solutions—an update involving leaf surface particles. *New Phytol.*, 196, 774–787. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04307.x
- Dawson, T.E., Goldsmith, G.R., 2018. The value of wet leaves. *New Phytol.*, 219, 1156–1169. DOI: 10.1111/nph.15307
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., 2006. Photoprotection in an ecological context: the re-markable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.*, 172, 11-21. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x
- Ding, J., Yang, T., Zhao, Y., Liu, D., Wang, X., Yao, Y., Peng, S., Wang, T., Piao, S., 2018. Increasingly important role of atmospheric aridity on Tibetan alpine grasslands. *Geophys. Res. Lett.*, 45, 2852-2859. DOI: 10.1002/2017GL076803
- Eichert, T., Fernández, V., 2012. Uptake and release of mineral elements by leaves and other aerial plant parts. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3rd ed.; Marschner, P., Ed.; Academic Press, pp. 71-84. DOI: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00004-2
- Eller, C.B., Lima, A.L., Oliveira, R.S., 2013. Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). *New Phytol.*, 199, 151-162. DOI: 10.1111/nph.12248
- Eller, C.B., Lima, A.L., Oliveira, R.S., 2016. Cloud forest trees with higher foliar water uptake capacity and anisohydric behavior are more vulnerable to drought and climate change. *New Phytol.*, 211, 489-501. DOI: 10.1111/nph.13952
- Fernández, V., Bahamonde, H.A., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., Sancho-Knapik, D., Gil, L., Goldbach, H.E., Eichert, T., 2017. Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *J. Exp. Bot.*, 68, 5293–5306. DOI: 10.1093/jxb/erx302
- Fernández, V., Sancho-Knapik, D., Guzmán, P., Peguero-Pina, J.J., Gil, L., Karabourniotis, G., Khayet, M., Fasseas, C; Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., Gil-Pelegrín, E., 2014. Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: effect of leaf side and age. *Plant Physiol.*, 166, 168-180. DOI: 10.1104/pp.114.242040
- García-Barreda, S., Camarero, J.J., 2020. Tree ring and water deficit indices as indicators of drought impact on black truffle production in Spain. *For. Ecol. Manag.*, 475, 118438. DOI: 10.1016/j.foreco.2020.118438
- Gamon, J.A., Serrano, L., Surfus, J.S., 1997. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia*, 112, 492–501. DOI: 10.1007/s004420050337

- Gerlein-Safdi, C., Koohafkan, M.C., Chung, M., Rockwell, F.E., Thompson, S., Caylor, K.K., 2018. Dew deposition suppresses transpiration and carbon uptake in leaves. *Agric. For. Meteorol.*, 259, 305–316. DOI: 10.1016/j.agrfor.2018.05.015
- Gil-Pelegrín, E., Saz, M.A., Cuadrat, J.M., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017. Oaks under Mediterranean-type climates: functional response to summer aridity. In: Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D. (Eds.), *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L.* Springer International Publishing, Berlin/Heidelberg, pp. 137–193 DOI: 10.1007/978-3-319-69099-5_5
- Gotsch, S.G., Asbjornsen, H., Holwerda, F., Goldsmith, G.R., Weintraub, A.E., Dawson, T.E., 2014. Foggy days and dry nights determine crown-level water balance in a seasonal tropical Montane cloud forest. *Plant Cell Environ.*, 37, 261–272. DOI: 10.1111/pce.12151
- Grossiord, C., Buckley, T.N., Cernusak, L.A., Novick, K.A., Poulter, B., Siegwolf, R.T.W., Sperry, J.S., McDowell, N.G., 2020. Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New Phytol.*, 226, 1550–1566. DOI: 10.1111/nph.16485
- Hackl, H., Baresel, J.P., Mistele, B., Hu, Y., Schmidhalter, U., 2007. A comparison of plant temperatures as measured by thermal imaging and infrared thermometry. *J. Agron. Crop Sci.*, 198, 415–429. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01771.x
- Jones, H.G., 1992. *Plants and Microclimate*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K.; Vol. 2nd. Ed.; ISBN 9780511845727.
- Kerstiens, G., 2006. Water transport in plant cuticles: an update. *J. Exp. Bot.*, 57, 2493–2499. DOI: 10.1093/jxb/erl017
- Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Alpert, P., Artale, V., Li, L., Luterbacher, J., May, W., Trigo, R., Tsimplis, M., Ulbrich, U., Xoplaki, E., 2006. The Mediterranean Climate: An overview of the main characteristics and issues, In: Lionello P, Malanotte-Rizzoli P, R Boscolo R (eds). *Mediterranean Climate Variability*. Elsevier, Amsterdam, p 1–26
- Martin, C.E., von Willert, D.J., 2000. Leaf epidermal hydathodes and the ecophysiological consequences of foliar water uptake in species of *Crassula* from the Namib desert in Southern Africa. *Plant Biol.*, 2, 229–242. DOI: 10.1055/s-2000-9163
- McDowell, N.G., Allen, C.D., 2015. Darcy's law predicts widespread forest mortality under climate warming. *Nat. Clim. Chang.*, 5, 669–672. DOI: 10.1038/nclimate2641
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiol.* 23, 987–996. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.14.987>.
- Mosmann, V., Castro, A., Fraile, R., Dessens, J., Sanchez, J.L., 2004. Detection of statistically significant trends in the summer precipitation of mainland Spain. *Atmos. Res.*, 70, 43–53. DOI: 10.1016/j.atmosres.2003.11.002
- Nardini, A., Lo Gullo, M.A., Trifilò, P., Salleo, S., 2014. The challenge of the Mediterranean climate to plant hydraulics: Responses and adaptations. *Environ. Exp. Bot.* 103, 68–79. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.09.018
- Niinemets, Ü., Keenan, T., 2014. Photosynthetic responses to stress in Mediterranean evergreens: Mechanisms and models. *Environ. Exp. Bot.* 103, 24–41. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.008
- Niinemets, Ü., Keenan, T.F., Hallik, L., 2014. A worldwide analysis of within-canopy variations in leaf structural, chemical and physiological traits across plant functional types. *New Phytol.*, 205, 973–993. DOI: 10.1111/nph.13096

- Pariyar, S., Chang, S.C., Zinsmeister, D., Zhou, H., Grantz, D.A., Hunsche, M., Burkhardt, J., 2017. Xeromorphic traits help to maintain photosynthesis in the perhumid climate of a Taiwanese cloud forest. *Oecologia*, 184, 609-621. DOI: 10.1007/s00442-017-3894-4
- Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., Morales, F., 2013. Three pools of zeaxanthin in *Quercus coccifera* leaves during light transitions with different roles in rapidly reversible photoprotective energy dissipation and photoprotection. *J. Exp. Bot.*, 64, 1649-1661. DOI: 10.1093/jxb/ert024
- Peguero-Pina, J.J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., Moya, I., 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia*, 156, 1–11. DOI: 10.1007/s00442-007-0957-y
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.*, 36, 453-462. DOI: 10.1071/FP08297
- Peguero-Pina, J.J., Vilagrosa, A., Alonso-Forn, D., Ferrio, J.P., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2020. Living in Drylands: Functional adaptations of trees and shrubs to cope with high temperatures and water scarcity. *Forests*, 11, 1028. DOI: 10.3390/f11101028
- Pina, A.L., Zandavalli, R.B., Oliveira, R.S., Martins, F.R., Soares, A.A., 2016. Dew absorption by the leaf trichomes of *Combretum leprosum* in the Brazilian semiarid region. *Funct. Plant Biol.*, 43, 851-861. DOI: 10.1071/FP15337
- Rey-Sánchez, A.C., Slot, M., Posada, J.M., Kitajima, K., 2016. Spatial and seasonal variation in leaf temperature within the canopy of a tropical forest. *Climate Research*, 71, 75-89. DOI: 10.3354/cr01427
- Schreel, J.D.M., Leroux, O., Goossens, W., Brodersen, C., Rubinstein, A., Steppe, K., 2020. Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. *Plant J.*, 103, 769-780. DOI: 10.1111/tpj.14770
- Sepulcre-Canto, G., Zarco-Tejada, P.J., Jimenez-Munoz, J.C., Sobrino, J.A., Soriano, M.A., Fereres, E., Vega, V., Pastor, M., 2007. Monitoring yield and fruit quality parameters in open-canopy tree crops under water stress. Implications for ASTER. *Remote Sens. Environ.*, 107, 455-470. DOI: 10.1016/j.rse.2006.09.014
- Simonin, K.A., Santiago, L.S., Dawson, T.E., 2009. Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D. Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant Cell Environ.*, 32, 882-892. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01967.x
- Turner, N.C., 1988. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.*, 9, 289-308. DOI: 10.1007/BF00296704
- Uematsu, S., Vandenhave, H., Sweeck, L., Hees, M.V., Wannijn, J., Smolders, E., 2017. Foliar uptake of radiocaesium from irrigation water by paddy rice (*Oryza sativa*): an overlooked pathway in contaminated environments. *New Phytol.*, 214, 820-829. DOI: 10.1111/nph.14416
- Walter, H., 1985. Vegetation of the earth and ecological systems of the geo-biosphere, 3rd ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Wang, X., Xiao, H., Cheng, Y., Ren, J., 2016. Leaf epidermal water absorbing scales and their absorption of unsaturated atmospheric water in *Reaumuria soongorica*, a desert plant from the northwest arid region of China. *J. Arid Environ.*, 128, 17-29. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2016.01.005
- Yuan, W., Zheng, Y. I., Piao, S., Ciais, P., Lombardozzi, D., Wang, Y., Ryu, Y., Chen, G., Dong, W., Hu, Z., et al., 2019. Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Sci. Adv.*, 5, eaax1396. DOI: 10.1126/sciadv.aax1396

CAPÍTULO 6

Discusión General y Conclusiones Finales

6.1. Discusión general

6.1.1. Mecanismos de respuesta fisiológica de la encina frente a la escasez estival de agua en el suelo.

Todos los parámetros fotosintéticos analizados en las hojas de encina se vieron reducidos drásticamente al aumentar los niveles de estrés, alcanzando valores casi insignificantes al final del periodo de sequía (**Figuras 2.3 y 2.4**). Así, la capacidad neta de asimilación del CO₂ (A_N) disminuyó progresivamente y llegó a ser negativa cuando el potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD}) fue de aproximadamente -5 MPa, tal y como se ha descrito previamente para esta especie (Peguero-Pina *et al.*, 2009). La caída experimentada por A_N a lo largo del periodo de sequía estuvo acompañada de fuertes reducciones para el resto de parámetros fotosintéticos, es decir, la conductancia estomática (g_s), la conductancia del mesófilo (g_m) y la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}). Estos resultados indican que tanto las limitaciones difusivas (estomáticas y mesofílicas) como las no difusivas (bioquímicas) de la fotosíntesis aumentaron a lo largo del periodo de sequía, lo que ayudó a explicar el patrón seguido por A_N . En relación a esto, se ha reportado (Galle *et al.*, 2011) un comportamiento similar para A_N , g_s y g_m en encina cuando se somete a sequía, aunque estos autores encontraron que V_{cmax} no se vio afectada a lo largo del experimento.

Independientemente del incremento absoluto de todos los factores potencialmente limitantes de la fotosíntesis, el análisis de la partición de los diferentes componentes reveló que g_m fue el factor más limitante para la asimilación neta de CO₂ para las plantas bien regadas y durante todo el periodo de sequía (**Figura 2.5**), lo que confirma el importante papel de g_m en la capacidad fotosintética de la encina (Peguero-Pina *et al.*, 2017). De hecho, la importancia relativa de la limitación del mesófilo (I_m) se incrementó gradualmente durante el periodo de sequía, desde 0,67 para las plantas bien regadas hasta 1,00 cuando la ψ_{PD} era de aproximadamente -5 MPa (**Figura 2.5**), coincidiendo con el momento en que A_N se volvió negativa (**Figura 2.3**).

Además de la respuesta de g_m , la respuesta encontrada en g_s bajo estrés por sequía también impuso una fuerte limitación a la captación de CO₂. Como se indica en la Introducción, este es un mecanismo común en las plantas mediterráneas en respuesta a una reducción de la disponibilidad de agua en el suelo que se ha reportado para la encina (Peguero-Pina *et al.*, 2009). Los resultados encontrados en el presente estudio parecen indicar que el cierre estomático al inicio del periodo de sequía (cuando la ψ_{PD} era de aproximadamente -3 MPa) podría estar impulsado por el rápido aumento del ácido abscísico (ABA) (**Figura 2.7**), una hormona vegetal que inicia una señalización en cascada para cerrar los estomas y reducir la pérdida de agua (Munemasa *et al.*, 2015). Cabe destacar que, en esta fase, se produce una regulación a la baja de la conductancia estomática a nivel de toda la planta (g_{plant}) desde las primeras horas de la mañana hasta el mediodía (**Figura 2.2**), probablemente asociada a factores hidráulicos por efecto de la incipiente embolia del xilema (**Figura 2.7**). Posteriormente, la concentración de ABA mostró un ligero descenso hasta el final del periodo de sequía, tal y como se ha observado (Yan *et al.*, 2017) para *Amorpha fruticosa* y *Robinia pseudoacacia*. Además, los resultados derivados de este trabajo proporcionan evidencias de que incluso un cierre estomático casi completo (es decir, g_s por debajo de 0,030 mol H₂O m⁻² s⁻¹) no puede impedir una pérdida significativa de la conductividad hidráulica en el xilema (aproximadamente un 50% al final del periodo de sequía, **Figura 2.6**).

La severa reducción del potencial hídrico de los brotes, tanto antes del amanecer (ψ_{PD}) como al mediodía (ψ_{MD}), se ha relacionado con la variación de varios parámetros de fluorescencia de la clorofila (ChlF)

(eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_m); la eficiencia real (Φ_{PSII}) e intrínseca (Φ_{exc}) del PSII; *quenching* fotoquímico (qP) y no fotoquímico (NPQ)), confirmando resultados similares a los encontrados en estudios anteriores (Zhang *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017). El valor de Ψ_{PD} a partir del cual los parámetros comenzaron a cambiar (aproximadamente -3 MPa) coincidió con el umbral a partir del cual las tasas de asimilación de CO₂ de *Quercus ilex* disminuían significativamente (**Figura 3.3**), reduciendo la productividad primaria e induciendo anomalías en los flujos de CO₂ árbol-atmósfera (Reichstein *et al.*, 2013; Frank *et al.*, 2015). De hecho, Peguero-Pina *et al.* (2009), midieron tasas de asimilación de CO₂ insignificantes a -3 MPa para *Quercus ilex*, mostrando también resultados similares en F_v/F_m , Φ_{PSII} y qP. Este umbral, obtenido con parámetros de fluorescencia, fue también detectado en *Robinia pseudoacacia* y *Amorpha fruticosa* (Yan *et al.*, 2017), cuya disminución inicial en F_v/F_m también coincidió con el comienzo de las tasas de asimilación de CO₂ insignificantes. Sin embargo, F_v/F_m en *Quercus suber* no mostró una clara variación con Ψ_{PD} (Peguero-Pina *et al.*, 2009), lo que implica que no siempre los parámetros de fluorescencia de Chl funcionan como proxy de la capacidad de fotosíntesis.

Los cambios en ChlF también se han relacionado con cambios en los índices de reflectancia en estudios anteriores (Peguero-Pina *et al.*, 2008, 2013; Peñuelas *et al.*, 1997; Méthy, 2000). Los resultados de este estudio confirman dicha relación ya que se encontró un aumento en los valores de NPQ con una disminución en el índice de reflectancia fisiológico (PRI) durante el incremento progresivo de la escasez de agua ($R^2 = 0,80$, $p < 0,05$, **Figura 3.5**). Otros trabajos también han encontrado buenas correlaciones entre PRI y NPQ para *Vitis vinifera* (Evain *et al.*, 2004) y *Quercus coccifera* (Peguero-Pina *et al.*, 2008). Esta relación era esperable porque ambos parámetros reflejan en muchos casos procesos de fotoprotección relacionados con la generación de un gradiente de pH trans-tilacoidal y/o la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Peguero-Pina *et al.*, 2013). De hecho, el PRI se ha correlacionado directamente con diversas variables relacionadas con la fotosíntesis (Goerner *et al.*, 2008; Garbulsky *et al.*, 2011; Tsonev *et al.*, 2014). La variación de Ψ_{PD} con PRI (**Figura 3.5**) fue similar a las encontradas para los parámetros de ChlF (**Figura 3.4**), incluyendo la detección del mismo punto umbral en $\Psi_{PD} = -3$ MPa. También se han encontrado variaciones en PRI con cambios en el estado hídrico de la encina por parte de Tsonev *et al.* (2014), y Zhang *et al.* (2017). Sin embargo, estos autores encontraron que los valores de PRI en condiciones de sequía severa se mantuvieron bastante estables. Los resultados de la presente tesis confirmaron parcialmente esta afirmación, ya que los valores de PRI medidos a media mañana se mantuvieron constantes por debajo de aproximadamente $\Psi_{PD} = -4,5$, mientras que el PRI medido a mediodía siguió disminuyendo (**Figura 3.4**). Los otros índices de reflectancia utilizados (índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI); índice de agua (WI); posición del *red-edge*) mostraron relaciones más débiles y ruidosas con Ψ . Además, estos índices no mostraron correlaciones con los parámetros de fluorescencia (datos no mostrados), indicando una peor relación con la capacidad de fotosíntesis. De hecho, estudios previos en encina mostraron que el WI no era muy sensible a los cambios en el contenido de agua de la hoja durante las primeras etapas del proceso de secado (Peñuelas *et al.*, 1997) y el NDVI no estaba correlacionado con las tasas de fotosíntesis neta a nivel de hoja (Zhang *et al.*, 2017; Garbulsky *et al.*, 2013). Por el contrario, la posición del *red-edge* medida en pino estaba fuertemente correlacionada con la concentración de clorofila (Curran *et al.*, 1995) y era capaz de distinguir los pinos sanos de los que estaban en decaimiento (Zarco-Tejada *et al.*, 2018). A pesar de que el NDVI y la posición del *red-edge* están altamente relacionados con los cambios en la concentración de clorofila (Filella y Peñuelas, 1994; Gitelson *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2008), la falta de cambios inducidos por la sequía en la concentración de clorofila mostrada por *Quercus ilex*, (tal y como describe Peguero-Pina *et al.*, 2009) puede ayudar a explicar la falta de relación entre el NDVI y la posición del *red-edge* con los parámetros de fluorescencia.

6.1.2. La importancia de la sequía atmosférica en la transpiración y la capacidad de asimilación de carbono de la encina.

6.1.2.1. Evaluación de métodos para monitorizar la respuesta de las plantas al déficit de presión de vapor

En general, los resultados de la tesis muestran como la conductancia foliar de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* se relacionó negativamente con el aumento del déficit de presión de vapor (VPD), pero la variabilidad a nivel local del VPD fue diferente en los tres métodos utilizados (cubeta foliar, cámara de planta entera y termometría por infrarrojos (IR) del dosel), principalmente asociada a la escala de medición. La conductancia foliar obtenida con la termometría IR disminuyó exponencialmente para todo el rango de VPD evaluado, mientras que la conductancia foliar total obtenida con la cámara de planta entera se mantuvo constante para valores de VPD inferiores a 2 kPa y superiores a 4 kPa, disminuyendo principalmente de 2 a 4 kPa (**Figura 4.7**). Esta discrepancia podría explicarse por la diferente zona del árbol medida por cada método (Jones, 1992; Rey-Sánchez *et al.*, 2016). Por un lado, el método de IR monitorizó la exposición sur del dosel superior, es decir, la zona con mayor demanda evaporativa durante el día y, por tanto, la zona potencialmente más sensible a los cambios en el VPD. Por otro lado, la respuesta dada por la cámara de toda la planta resultó de la suma de las diferentes partes del árbol, donde la respuesta de las partes de exposición sur podría suavizarse con la respuesta de las zonas del norte y de la parte inferior del dosel (Tenhunen *et al.*, 1990; Bonan *et al.*, 2021). En cuanto a la cubeta foliar, la variación de la conductancia estomática a los cambios en el VPD dio lugar a una respuesta intermedia entre los otros dos métodos. Esto podría deberse también a la ubicación de las hojas medidas con esta técnica, que era la exposición sur de la parte inferior del dosel, que podría tener una demanda evaporativa menor que la zona superior con exposición sur, pero aún mayor que la exposición norte.

En cuanto a la comparación de procedimientos entre los métodos, cada uno de ellos tiene algunas ventajas y otras desventajas teniendo en cuenta su complejidad, invasividad y grado de suposición. En primer lugar, la cubeta foliar permite fácilmente la medición de cualquier hoja individual debido a su portabilidad, pero apenas permite un seguimiento continuo debido a su mayor invasividad. De hecho, establecer valores de VPD inferiores a 1,5 y superiores a 3,5 KPa, requería varios minutos y no siempre se alcanzaban. Esto dio lugar a que se midieran pocos valores a altos VPD, especialmente durante las condiciones de déficit hídrico del suelo, en las que no se pudieron obtener mediciones a VPD superiores a 4,5 kPa. En cualquier caso, la tendencia de la regresión mostrada en la **Figura 4.9a** para las condiciones de déficit hídrico del suelo indica que los valores de VPD > 4,5 kPa podrían producir valores de g_s cercanos a la conductancia mínima.

En segundo lugar, la cámara de planta completa puede monitorizar la respuesta de todo el árbol con un mínimo de suposición, pero con la mayor complejidad metodológica. Para este método se usaron unidades de conductancia por árbol en lugar de por m^2 , por lo que hay que tener en cuenta que los valores absolutos no son comparables con los valores obtenidos con los otros métodos. Alternativamente, se podría estimar el área foliar total del árbol utilizando diferentes modelos y supuestos como la estimación a partir de las transmitancias del haz solar (Lang y McMurtriebm, 1992) o utilizando escáner láser terrestre (Hu *et al.*, 2018). Otra cuestión a destacar en el uso de la cámara de planta completa es el importante efecto de calentamiento encontrado durante la tarde, que aumentó el VPD en comparación con las condiciones externas. Esto limita la duración de las campañas de monitorización y debería tenerse en cuenta a la hora de escalar los resultados a nivel de plantación.

Por último, la técnica de infrarrojos registra la respuesta de una zona determinada de la copa, lo que permite realizar mediciones no invasivas, sin modificar las condiciones microclimáticas que rodean al árbol. Sin embargo, la utilización del método IR requiere un mayor grado de suposición, por ejemplo, hay que estimar la radiación incidente que llega a la superficie de la hoja (Apéndice B del Capítulo 4), la entrada de la velocidad del viento o el cálculo de la conductancia de la capa límite (véase el Apéndice A del Capítulo 4, para más detalles). Además, la incertidumbre del método aumenta con valores bajos de VPD, lo que implica valores cercanos a cero en el denominador de la Ecuación **A6** (Apéndice A del Capítulo 4). De hecho, a valores de VPD inferiores a 1 kPa (encontrados alrededor del amanecer), la conductancia estomática estimada puede dar lugar a valores demasiado altos y erráticos.

Resumiendo, los tres métodos tienen sus ventajas e inconvenientes, proporcionando relaciones similares entre la conductancia foliar y el estrés por sequía, pero con peculiaridades que se complementan entre sí (**Figura 4.13**).

6.1.2.2. Efecto del VPD y del déficit hídrico del suelo en *Quercus ilex*

En los árboles bien regados de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*, un aumento del VPD se vio compensado por una reducción de la conductancia estomática, tal y como se había informado previamente en esta misma especie (Mediavilla y Escudero, 2003; Aguadé *et al.*, 2015). En el presente estudio, un aumento de 2 a 4 kPa resultó en una reducción de aproximadamente el 25% en la conductancia, independientemente de las condiciones del suelo (**Figura 4.7d**). Cuando un aumento del VPD a 4 kPa se combinó con el déficit hídrico del suelo, la respuesta de *Quercus ilex* a ambos estreses resultó en una disminución adicional de aproximadamente 20% en la conductancia estomática. Así, el estrés hídrico del suelo y el atmosférico tienen un efecto aditivo, con la desecación del suelo causando una disminución general de *g*, pero sin afectar al umbral crítico en respuesta al VPD (aproximadamente 2kPa; ver ED50 en **Tabla 4.3**). En consecuencia, se mantiene una respuesta similar de *g* al VPD independientemente de las condiciones hídricas del suelo.

En general, los resultados de la tesis confirman que el VPD es un regulador sustancial de la respuesta estomática y por tanto, de la transpiración (Novick *et al.*, 2016, 2019; Grossiord *et al.*, 2020). En condiciones de buen riego, la reducción de *g* compensó solo parcialmente el aumento de la transpiración con el VPD, tanto a escala horaria como diaria. En este sentido, la respuesta de ahorro de agua de *Quercus ilex* frente al VPD fue menos efectiva que en especies mediterráneas más isohídricas (Tatarinov *et al.*, 2016). Por el contrario, en condiciones de déficit hídrico del suelo, el efecto combinado del estrés hídrico atmosférico y del suelo disminuyó la pérdida de agua al reducir aún más la conductancia estomática. Esto podría ser una estrategia eficaz para reducir la tensión del xilema impulsada por la transpiración y prevenir la embolia inducida por la sequía (Martin-StPaul *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2020; Capítulo 2 de la presente Tesis). Además, esta estrategia de ahorro de agua junto con la alta resistencia del xilema a la cavitación inducida por la sequía que muestra *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* tanto en los tallos (50% de pérdida de conductividad hidráulica, PLC₅₀, aproximadamente -6,0 MPa) como en los brotes (PLC₅₀ aproximadamente -6,5 MPa; Alonso-Forn *et al.*, 2021), supone un amplio margen de seguridad para evitar el embolismo masivo (Vilagrosa *et al.*, 2003). Adicionalmente, cabe considerar el diferente comportamiento que podría tener *Quercus ilex* en poblaciones de Francia o Italia, donde la otra subespecie, *Quercus ilex* subsp. *ilex*, mostró una sensibilidad similar al VPD y al déficit hídrico del suelo, pero con una menor tolerancia a la tensión del xilema (Tognetti *et al.*, 1998), y por tanto, un menor margen de seguridad. La existencia de diferentes ecotipos dentro de este paradigma de árbol mediterráneo (Peguero-Pina *et al.*, 2014) debe ser tomada en cuenta en cuanto a su interpretación ecológica.

6.1.2.3. Consecuencias de un mayor VPD en la ganancia de carbono

La encina es muy sensible a la sequía, como se ha demostrado en esta tesis o en estudios anteriores (Mediavilla y Escudero, 2003, 2004; Aguadé *et al.*, 2015; Alonso-Forn *et al.*, 2021; Capítulo 3 de la presente Tesis). Este hecho hace que la máxima productividad de la encina (medida como ganancia de carbono) se restrinja a una estrecha ventana de condiciones ambientales, es decir, $VPD < 2$ KPa y $SWP > -0,5$ MPa, usualmente registradas para árboles bien regados durante sólo dos horas al día en promedio, desde aproximadamente 7:30 a 9:30 h hora solar (**Figura 4.10**). Además, independientemente del VPD, los valores de temperatura de la hoja por encima de 30 °C también podrían inducir una reducción de las tasas fotosintéticas máximas (Gratani *et al.*, 2000) debido a limitaciones en el metabolismo (Haldimann *et al.*, 2008), lo que podría contribuir a una reducción de la WUE. Por tanto, la ganancia real de carbono de la encina puede ser mucho menor que su potencial, volviéndose menos eficiente en el uso de los recursos hídricos, lo que puede amenazar la productividad, el crecimiento y la supervivencia a largo plazo de esta especie.

En la práctica, al evaluar las condiciones ambientales de verano registradas durante la monitorización de IR, encontramos que sólo el 14,7% de las horas de luz con $PAR > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ son propensas a alcanzar las máximas tasas de ganancia de carbono. Sin embargo, como árbol perenne, *Q. ilex* podría estar ganando carbono también durante el resto del periodo vegetativo (Corcuera *et al.*, 2005; Alonso-Forn *et al.*, 2022), donde la ventana de condiciones óptimas podría ser mayor (**Figura 4.1**), y por tanto, compensando la estación estival del clima mediterráneo. Esto puede conllevar implicaciones en la productividad a nivel de ecosistema, pero también para la gestión de las plantaciones de árboles. La encina se utiliza en plantaciones para la producción de trufa, donde el déficit hídrico del suelo se elimina con programas de riego (Águeda *et al.*, 2010). Si este hubiera sido nuestro caso y no se hubiera interrumpido el riego, manteniendo así las condiciones de buen riego del suelo durante todo el periodo experimental (desde el día del año 171 hasta el 220), el porcentaje de horas en los que la encina habría alcanzado las tasas máximas de fotosíntesis durante el periodo estudiado, sólo habría aumentado hasta el 29,6% de las horas de luz. Por lo tanto, el estrés hídrico atmosférico por sí solo puede impedir alcanzar condiciones óptimas de funcionamiento a pesar de eliminar el déficit de agua en el suelo. Esto sugiere que los programas de riego que mantienen continuamente los suelos a capacidad de campo podrían estar obsoletos ya que provocarían un desperdicio en el agua de riego si el VPD ya limita las tasas máximas de fotosíntesis.

Dada la importancia del VPD en la determinación de las ganancias de carbono de la encina, cabría esperar que la distribución natural de esta especie también dependiera del rango de valores de VPD a lo largo del periodo vegetativo. Efectivamente, al analizar la distribución natural de la encina en una región del noreste de España (**Figura 4.14**), se ha observado que la distribución natural de la encina coincide prácticamente con las áreas con menor VPD durante el periodo vegetativo (de marzo a noviembre), sugiriendo un papel relevante del VPD en la conformación de la vegetación similar a otros factores como las propiedades del suelo o los patrones geográficos de las precipitaciones.

6.1.3. Valoración de la capacidad de recuperación de la encina tras estrés hídrico estival impuesto en el clima mediterráneo.

6.1.3.1. Recuperación tras riego de planta en maceta

Para una recuperación del potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{PD}) desde -5,6 MPa a -0,6 MPa, éste último medido 7 días después de riego, las tasas de recuperación mostraron importantes diferencias cuando

se analizaron los distintos parámetros fotosintéticos. Así, g_m y V_{cmax} recuperaron los valores originales registrados para las plantas bien regadas (**Figura 2.4, Tabla 2.1**), lo que coincide con los resultados (Galle *et al.*, 2011) para la encina. Sin embargo, al contrario que nuestros resultados, estos autores encontraron que A_N y g_s en la encina recuperaron los valores de control incluso después de tres ciclos de sequía. De hecho, en la presente tesis solamente se registró una recuperación parcial de A_N después del riego ($7,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3a**), y este valor fue significativamente distinto ($p < 0,05$, **Tabla 2.1**) cuando se comparó con el medido en plantas bien regadas ($10,9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3a**). Este hecho puede explicarse por la baja g_s tras rehidratación ($0,084 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3b**), mucho menor ($p < 0,05$, **Tabla 2.1**) que el valor mostrado por las plantas bien regadas ($0,288 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, **Figura 2.3b**). La capacidad fotosintética, estimada a través de los parámetros de fluorescencia de Chl, tampoco mostró una recuperación completa. En cuanto a los índices de reflectancia, la recuperación parcial del PRI fue similar a la recuperación parcial del NPQ, lo que respalda la relación encontrada en la **Figura 2.6**. Como resultado, las limitaciones estomáticas a la fotosíntesis (I_s) aumentaron significativamente después de la rehidratación, en comparación con los valores estimados tanto para las plantas bien regadas como para las plantas durante el periodo de sequía (**Figura 2.5**). Con respecto a esto, Galmés *et al.* (2007), también mostraron una recuperación parcial de la fotosíntesis neta en otras 10 especies de plantas mediterráneas después de una sequía severa. Por tanto, la no recuperación de la actividad fotosintética después de un evento de estrés hídrico intenso en la especie perennifolia *Quercus ilex* podría implicar, no sólo una reducción de la productividad primaria durante el evento de estrés, sino también una reducción después del evento de estrés cuando las plantas se rehidrataron. La eficiencia en el uso del agua del ecosistema en estos casos sería muy baja y el flujo de entrada del CO_2 a la planta se reduciría hasta un nuevo crecimiento de las hojas.

Estas aparentes discrepancias entre nuestros resultados y los mostrados por Galle *et al.* (2011), pueden explicarse teniendo en cuenta los diferentes niveles de estrés hídrico alcanzados cuando se comparan ambos estudios. Así, el potencial hídrico del mediodía (ψ_{MD}) en la encina sólo disminuyó hasta $-2,9 \text{ MPa}$ en Galle *et al.* (2011), mientras que en nuestro estudio, ψ_{MD} se acercó a -6 MPa al final del ciclo de sequía (**Figura 2.6**). Estas diferencias en ψ_{MD} entre ambos experimentos tendrían importantes consecuencias en cuanto a la pérdida de conductividad hidráulica del xilema. Efectivamente, encontramos que la embolia del xilema para los brotes de encina era de aproximadamente el 50% al final del periodo de sequía, mientras que el ψ_{MD} reportado por Galle *et al.* (2011), sólo induciría un nivel casi insignificante de embolia del xilema (aproximadamente un 10%) según nuestros datos y los publicados previamente por Peguero-Pina *et al.* (2014), para encinas de diferentes procedencias. La preservación de la integridad del transporte de agua por el xilema puede justificar la rápida recuperación de g_s encontrada para la encina por Gallé *et al.* (2011) una vez que el potencial hídrico fue restaurado a los valores de control. Por el contrario, el importante nivel de embolia del xilema y la falta de recuperación hidráulica (**Figura 2.6**), podrían explicar la fuerte regulación a la baja de g_s , incluso después de regar de nuevo, encontrada en nuestro estudio.

El papel de las limitaciones hidráulicas en la recuperación del intercambio gaseoso de las hojas una vez rehidratadas tras un periodo de sequía ha sido discutido en estudios anteriores (Yan *et al.*, 2017; Blackman *et al.*, 2009; Brodribb y Cochard, 2009). Así, Brodribb y Cochard (2009) encontraron una fuerte evidencia de que la limitación hidráulica era el proceso que gobernaba la recuperación del intercambio de gases de la sequía en coníferas con estrés hídrico. Por otro lado, Blackman *et al.* (2009) sugirieron que, además de las limitaciones hidráulicas, factores no hidráulicos como el ABA podrían estar también implicados en la limitación de la tasa de reapertura estomática después de un nuevo riego en cuatro especies de angiospermas leñosas nativas de Australia. Más recientemente, Yan *et al.* (2017) afirmaron que la recuperación estomática en *Amorpha fruticosa* L. y *Robinia pseudoacacia* L. en la etapa de rehidratación

estaba principalmente mediada por factores hidráulicos, aunque también sugirieron que las limitaciones no hidráulicas podrían estar también implicadas en la recuperación del intercambio de gases en *R. pseudoacacia*.

En nuestro caso, existen considerables evidencias que apuntan hacia el papel predominante del modelo de limitación hidráulico-estomática propuesto por Brodribb y Cochard (2009) en la falta de recuperación de A_N encontrada en la encina. En primer lugar, las concentraciones de ABA tras el nuevo riego estuvieron muy alejadas de las medidas durante el periodo de sequía, especialmente respecto a los valores máximos registrados cuando se produjo el cierre estomático (**Figura 2.7**). En segundo lugar, como se ha indicado anteriormente, g_m y V_{cmax} recuperaron completamente sus valores originales para las plantas bien regadas (**Figura 2.4**). Por tanto, estos factores no hidráulicos no limitarían la recuperación de la actividad fotosintética de la encina. Por otro lado, la caída del potencial hídrico entre antes del amanecer y el mediodía ($\psi_{MD} - \psi_{PD}$) tras rehidratación (aproximadamente 1 MPa) fue mucho menor que para las plantas bien regadas (aproximadamente 2 MPa), lo que sugiere una regulación a la baja de la transpiración de la planta (a través de una baja g_s) junto con una menor capacidad de transporte de agua a través del xilema hacia las hojas que transpiran (debido a la embolia del xilema), según el modelo propuesto por Oren *et al.* (1999). En este sentido, aunque varios autores han descrito una recuperación de la capacidad hidráulica por reparación de la embolia tras la rehidratación (por ejemplo, Martorell *et al.*, 2014; Brodersen, *et al.*, 2010; Yang y Tyree, 1992; Salleo, *et al.*, 1996), éste no parece ser el caso de la encina, al menos cuando se alcanzan valores de potencial hídrico cercanos al PLC_{50} .

6.1.3.2. Recuperación tras evento de baja precipitación en parcela experimental

Un evento de baja precipitación de 0.6 mm ocurrido durante la sequía estival en una parcela experimental de *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*, cambió temporalmente las condiciones atmosféricas disminuyendo la aridez de la atmósfera o VPD (**Figuras 5.1 y 5.2**). En relación con estudios anteriores (por ejemplo, Mediavilla y Escudero, 2003), una disminución del VPD podría aumentar la conductancia estomática de *Quercus ilex*, lo que estaría en consonancia con el aumento de la conductancia foliar total encontrado en esta tesis, incluso antes del comienzo de la lluvia misma. Es decir, el aumento de la conductancia foliar medido antes de la propia lluvia podría ser atribuible exclusivamente a la disminución del VPD. Además, la compensación entre VPD y conductancia foliar total encontrada para *Quercus ilex*, resultó en un mantenimiento de las tasas de transpiración durante el evento de lluvia. Para la disminución del VPD_{max} hasta 3 kPa aproximadamente (**Figura 5.2**), la transpiración debería haber disminuido considerablemente, pero, como *Quercus ilex* respondió abriendo los estomas, los niveles de transpiración se mantuvieron entre 3 y 4 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. Del mismo modo, al final del evento de lluvia, un aumento del VPD debería haber incrementado la transpiración, pero como *Quercus ilex* redujo la conductancia foliar cerrando estomas, los niveles de transpiración se mantuvieron constantes de nuevo. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos durante el evento de precipitación (con un cierto nivel de déficit hídrico en el suelo) con los valores medidos tres semanas antes cuando los árboles estaban bien regados, observamos que para el mayor VPD en condiciones de buen riego, la conductancia total es similar, pero con una transpiración foliar mayor. Es decir, la transpiración en la encina puede aumentar con el incremento en VPD si existe una mayor disponibilidad de agua en el suelo.

El aumento de la conductancia foliar podría conducir a un aumento de la fotosíntesis neta siempre que otros factores como la humedad del suelo y la radiación solar no la limiten (Alonso-Forn *et al.*, 2021; Capítulo 2 de la presente Tesis). En primer lugar, según Alonso-Forn *et al.* (2021), *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* alcanza tasas de fotosíntesis y valores de conductancia estomática insignificantes (es decir, cercanos a cero) a -4

MPa de potencial hídrico antes del amanecer. En esta tesis los árboles en la parcela experimental sólo fueron sometidos a un estrés hídrico moderado (potenciales de suelo en torno a -2MPa) con el que la encina sería capaz de mantener un balance de carbono positivo. En segundo lugar, los datos de radiación revelaron que las plantas podían aprovechar valores de radiación fotosintéticamente activa superiores a 1000 mol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante el evento de baja precipitación (**Figura 5.5**), lo que no limitó la posibilidad de aumentar la fotosíntesis neta durante este tiempo. Si este fuera el caso y la fotosíntesis neta no estuviera limitada por otros factores, la eficiencia en el uso del agua, calculada como la relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración, podría haber aumentado también durante el evento de baja precipitación, ya que la transpiración se mantuvo constante debido a la regulación estomática (**Figura 5.2**). Por otro lado, otros estudios asumen que el agua interceptada por el dosel podría reducir temporalmente la fotosíntesis debido a la oclusión de los estomas y a la dispersión y refracción de la radiación por el agua superficial (Gerlein-Safdi *et al.*, 2018; Pariyar *et al.*, 2017). Como *Quercus ilex* tiene una superficie abaxial no mojeable (Fernández *et al.*, 2014), la oclusión de los estomas por el agua podría no ocurrir. En cuanto al efecto de la reflexión por el agua superficial, se necesitaría más investigación para estudiar las consecuencias en *Quercus ilex*.

Junto con la reducción del VPD, los árboles podrían haber incrementado también su conductancia foliar total con una rehidratación de sus tejidos (Mediavilla y Escudero, 2003; Capítulo 2 de la presente Tesis) una vez iniciada la propia lluvia. En este caso, sería interesante medir en posteriores investigaciones la importancia relativa de cada factor en el aumento de la conductancia foliar. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el potencial hídrico del suelo se volvió más negativo después del evento de precipitación (**Figura 5.3**), por lo que la pequeña cantidad de agua registrada durante la lluvia no fue aparentemente suficiente para alcanzar las capas de las raíces del suelo donde se instalaron los sensores de potencial hídrico del suelo (30 cm de profundidad). En su lugar, el agua interceptada por el follaje y la posterior absorción de agua por las hojas debe ser el mecanismo utilizado por *Quercus ilex* para mantener el estado hídrico de las hojas (Fernández *et al.*, 2014), ya que no se encontraron diferencias en el potencial hídrico de la planta antes y después de la lluvia. De hecho, uno de los árboles monitorizados mostró una ligera recuperación del potencial hídrico de la planta antes del amanecer pasando de -1,24 a -1,10 MPa. La discrepancia entre el potencial hídrico del suelo y el de la planta antes del amanecer debido a la captación foliar de agua se evidenció recientemente en varias especies arbóreas de la Amazonia, donde los autores demostraron que la captación foliar elevaba el estado hídrico de la hoja por encima del valor más alto que podría alcanzarse sólo con la captación de agua del suelo (Binks *et al.*, 2019).

Como consecuencia de la supuesta captación de agua foliar detectada en la parcela experimental, *Quercus ilex* mostró una recuperación de la máxima eficiencia potencial del fotosistema II (F_V/F_M) y una recuperación parcial del índice de reflectancia fisiológica (PRI, **Figura 5.4**). La rápida recuperación de F_V/F_M tras el evento de baja precipitación hasta los valores fisiológicos normales podría deberse a la capacidad de esta especie para mantener intacta la maquinaria de pigmentos fotosintéticos, tal y como informaron Peguero-Pina *et al.*, 2009. Por lo tanto, tal y como afirman estos autores, las disminuciones de F_V/F_M no se interpretarían como un daño permanente del aparato fotosintético, sino como un mecanismo fotoprotector que permite a esta especie aclimatarse a condiciones más estresantes. La variación en el PRI también se consideraría en estos términos, ya que los cambios en este parámetro están asociados a variaciones en las formas desoxidadas de las moléculas del ciclo de la xantofila (antheraxantina y zeaxantina) (Peguero-Pina *et al.*, 2008; Peguero-Pina *et al.*, 2013), lo que constituye un mecanismo eficiente para disipar el exceso de energía lumínica en muchas especies vegetales (Demmig-Adams y Adams, 2006), como *Quercus ilex* (Peguero-Pina *et al.*, 2009). En consecuencia, la recuperación parcial del PRI observada en este estudio podría ser consecuencia de la retención parcial de antheraxantina y zeaxantina, ya que el potencial hídrico de la planta no se recuperó

completamente después de la lluvia. De todos modos, el aumento observado del PRI después del evento de baja precipitación indicaría un aumento de la actividad fotosintética de la planta después del evento de baja precipitación.

Teniendo en cuenta esta recuperación encontrada durante la estación seca, los eventos de baja precipitación deberían ser considerados en la visión clásica de las interacciones planta-atmósfera. Además, otros tipos de fenómenos hídricos, como el rocío debido a la condensación, también deben ser considerados ya que esta precipitación oculta también puede suministrar pequeñas pero esenciales cantidades de agua a lo largo de la estación seca (Binks *et al.*, 2019). De hecho, el rocío se produce aproximadamente en el 20% de los días de verano en las zonas de cultivo de encinas de la Península Ibérica (<http://www.aemet.es>). Durante estos días, el agua derivada del rocío puede ser utilizada para la transpiración matinal, lo que podría ser crucial en la tolerancia del bosque a la sequía. Este tema debería merecer más atención de la comunidad científica en futuras investigaciones.

6.2. Conclusiones generales

Las conclusiones a las que se llega en la presente tesis, en la que se ha investigado sobre *Quercus ilex*, bien de 14 años en maceta 25 L o bien de 25 años en finca experimental, en un entorno de clima Mediterráneo, aplicando y comparando la pléyade de metodologías de estudio y medida descritas, para explorar el comportamiento fisiológico bajo sequía (edáfica y atmosférica) y la posterior recuperación por rehidratación (incluso bajo evento de pequeña precipitación) de la encina, se pueden enumerar y agrupar de la siguiente manera:

1. La encina mostró un comportamiento conservador en el uso del agua cuando fue sometida a déficit hídrico, principalmente asociado a un aumento del ABA que desencadenó el cierre estomático. Este hecho, junto con los fuertes descensos de g_m y V_{cmax} , limitó severamente la capacidad fotosintética de esta especie bajo un intenso estrés hídrico. A pesar de las mínimas pérdidas de agua y de su gran resistencia a la cavitación inducida por la sequía, el estrés hídrico provocó un cierre estomático casi completo y tasas de embolia del xilema cercanas a PLC₅₀.
2. De manera análoga, los parámetros de fluorescencia de la clorofila variaron con la disminución del potencial hídrico durante un periodo de sequía en *Quercus ilex*. Uno de estos parámetros, el *quenching* no fotoquímico (NPQ), se correlacionó con el índice de reflectancia fisiológico (PRI), cuyos valores también cambiaron con el aumento de la escasez de agua. Ambos parámetros tenían un punto umbral alrededor de -3 MPa, momento en el que las tasas de fotosíntesis netas eran insignificantes. Teniendo en cuenta que el PRI mostró la misma tendencia que los parámetros de fluorescencia de clorofila (ChlF) y que la medición del PRI es mucho más fácil de manejar que la de ChlF, se propone utilizar el PRI para detectar el nivel de capacidad de fotosíntesis en *Quercus ilex*, y de esta manera, complementar las mediciones de Ψ durante los eventos de sequía.
3. Después del riego, el estado hídrico de la planta se restableció por completo, mientras que los parámetros de intercambio de gases, fluorescencia y el PRI no recuperaron los valores iniciales. Es decir, las sequías intensas y el estrés térmico no sólo podrían reducir la capacidad fotosintética de la encina durante el periodo de estrés, sino que también podrían afectar a la capacidad fotosintética una vez recuperado el estado hídrico de la planta.

- a. La recuperación parcial de A_N encontrada tras la rehidratación se debió principalmente a factores hidráulicos, que redujeron la g_s para evitar la embolia masiva del xilema bajo eventos de sequía posteriores que podrían comprometer la supervivencia de la planta.
 - b. A pesar de la recuperación parcial de A_N tras la rehidratación, la ocurrencia de episodios acumulados de sequía extrema puede tener un efecto negativo en el rendimiento a largo plazo de la encina, debido a una menor capacidad de ganancia de carbono.
4. Los métodos utilizados en este estudio para monitorizar el VPD complementados entre sí, con la cámara de planta entera proporcionando una visión global de la respuesta de todo el árbol, y la termometría IR proporcionando una monitorización a lo largo de todo el periodo de sequía estival de forma no invasiva, comparados con las mediciones a escala foliar, proporcionaron relaciones negativas similares entre el VPD y la conductancia, siendo las discrepancias debidas a la escala de medida.
5. Los resultados mostraron que el estrés hídrico atmosférico y del suelo tienen un efecto aditivo.
 - a. En condiciones de buen riego, un aumento del VPD se compensó parcialmente con una reducción de la conductancia estomática, lo que dio lugar a un ligero aumento de las tasas de transpiración y una disminución en la asimilación de carbono.
 - b. Con déficit hídrico en el suelo, la respuesta al VPD se tradujo en una mayor disminución de la conductancia estomática, reduciendo la transpiración como estrategia de ahorro de agua.
 - c. La alta sensibilidad a la sequía tanto edáfica como atmosférica hace que las tasas máximas de ganancia de carbono de la encina se restrinjan a condiciones ambientales particulares que puedan modular su rendimiento fisiológico y su distribución natural.
6. Los eventos de baja precipitación deberían ser considerados en la visión clásica de las interacciones planta-atmósfera
 - a. El aumento de la conductancia foliar medido justo antes de la propia lluvia podría ser atribuible exclusivamente a la disminución del VPD provocado por el cambio en las condiciones climáticas precedentes a la lluvia.
 - b. El aumento de la conductancia foliar registrado durante y con posterioridad a la lluvia puede ser atribuible a la combinación del descenso en el VPD mas una posible absorción de agua por las hojas, que provocó una recuperación parcial del F_v/F_m y del PRI.

6.3. Bibliografía

- Aguadé, D., Poyatos, R., Rosas, T., Martínez-Vilalta, J., 2015. Comparative drought responses of *Quercus ilex* L. and *Pinus sylvestris* L. in a montane forest undergoing a vegetation shift. *Forests* 6, 2505-2529. <https://doi.org/10.3390/f608250510.3390/f6082505>
- Águeda, B., Fernández-Toirán, L.M., de Miguel, A.M., Martínez-Peña, F. 2010. Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation. *For. Syst.* 19(1), 89-97. <https://doi.org/10.5424/fs/2010191-01170>
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., García-Plazaola, J.I., Martín-Sánchez, R., Niinemets, U., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E. 2022. Cell-level anatomy explains leaf age-dependent declines in mesophyll conductance and photosynthetic capacity in the evergreen Mediterranean oak *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* Tpac049. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpac049>
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., Mencuccini, M., Mendoza-Herrer, Ó., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2021. Contrasting functional strategies following severe drought in two Mediterranean

- oaks with different leaf habit: *Quercus faginea* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* 41, 371–387. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa135>
- Binks, O., Mencuccini, M., Rowland, L., da Costa, A.C.L., Reis de Carvalho, C.J., Bittencourt, P., Eller, C., Sales Teodoro, G., Maklouf Carvalho, E.J., Azul Soza, A., et al., 2019. Foliar water uptake in Amazonian trees: Evidence and consequences. *Glob. Change Biol.*, 25, 2678-2690. DOI: 10.1111/gcb.14666
- Blackman, C., Brodribb, T., Jordan, G., 2009. Leaf hydraulics and drought stress: Response, recovery and survivorship in four woody temperate plant species. *Plant Cell Environ.*, Issue 32, pp. 1584-1595.
- Bonan, G.B., Patton, E.G., Finnigan, J.J., Baldocchi, D.D., Harman, I.N. 2021. Moving beyond the incorrect but useful paradigm: reevaluating big-leaf and multilayer plant canopies to model biosphere-atmosphere fluxes – a review. *Agric. For. Meteorol.* 306, 108435. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108435>
- Brodersen, C., McElrone, A.J., Choat, B., Matthews, M.A., Shackel, K.A., 2010. The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiol.*, Volumen 154, pp. 1088-1095.
- Brodribb, T., Cochard, H., 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol.*, Issue 149, pp. 575-584.
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A., Gil-Pelegrín, E., 2005. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* subsp. *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian peninsula. *Tree Physiol.* 25:599–608. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.5.599>
- Curran, P.J., Dungan, J.L., Gholz, H.L., 1995. Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll concentration in slash pine leaves. *Tree Physiol.*, 15, 203–206.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., 2006. Photoprotection in an ecological context: the re-markable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.*, 172, 11-21. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x
- Evain, S., Flexas, J., Moya, I., 2004. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Remote Sens. Environ.*, 91, 175–185.
- Fernández, V., Sancho-Knapik, D., Guzmán, P., Peguero-Pina, J.J., Gil, L., Karabourniotis, G., Khayet, M., Fasseas, C., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., Gil-Pelegrín, E., 2014. Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: effect of leaf side and age. *Plant Physiol.*, 166, 168-180. DOI: 10.1104/pp.114.242040
- Filella, I., Peñuelas, J., 1994. The red edge position and shape as indicators of plant chlorophyll content, biomass and hydric status. *Int. J. Remote Sens.*, 15, 1459–1470.
- Frank, D., Reichstein, M., Bahn, M., Frank, D., Mahecha, M.D., Smith, P., Thonicke, K., van der Velde, M., Vicca, S., Babst, F., et al., 2015. Effects of climate extremes on the terrestrial carbon cycle: concepts, processes and potential future impacts. *Glob. Change Biol.*, 2, 2861–2880.
- Galle, A., Florez-Sarasa, I., El Aououad, H., Flexas, J., 2011. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi-deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. *J. Exp. Bot.*, Issue 62, pp. 5207-5216.
- Galmés, J., Medrano, H., Flexas, J., 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol.*, 175, 81–93.
- Garbulsky, M.F., Peñuelas, J., Ogaya, R., Filella, I., 2013. Leaf and stand-level carbon uptake of a Mediterranean forest estimated using the satellite-derived reflectance indices EVI and PRI. *Int. J. Remote Sens.*, 34, 1282–1296.

- Garbulsky, M.F., Peñuelas, J., Gamon, J.A., Inoue, Y., Filella, I., 2011. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies: A review and meta-analysis. *Remote Sens. Environ.*, 115, 281–297.
- Gerlein-Safdi, C., Koohafkan, M.C., Chung, M., Rockwell, F.E., Thompson, S., Caylor, K.K., 2018. Dew deposition suppresses transpiration and carbon uptake in leaves. *Agric. For. Meteorol.*, 259, 305–316. DOI: 10.1016/j.agrfor.2018.05.015
- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., Lichtenthaler, H.K., 1996. Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm. *J. Plant Physiol.*, 148, 501–508.
- Goerner, A., Reichstein, M., Rambal, S., 2008. Estimation of photosynthetic light use efficiency in semi-arid ecosystems with the MODIS-derived photochemical reflectance index. In *Proceedings of the 2008 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium*, Boston, MA, USA, 7–11 July; Volume 3, pp. 756–758.
- Gratani, L., Pesoli, P., Crescente, M.F., Aichner, K., Larcher, W. 2000. Photosynthesis as a temperature indicator in *Quercus ilex* L. *Global Planet. Change* 24, 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0921-8181\(99\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0921-8181(99)00061-2)
- Grossiord, C., Buckley, T.N., Cernusak, L.A., Novick, K.A., Poulter, B., Siegwolf, R. T.W., Sperry, J.S., McDowell, N.G., 2020. Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New Phytol.* 226(6), 1550–1566. <https://doi.org/10.1111/nph.16485>
- Haldimann, P., Gallé, A., Feller, U. 2008. Impact of an exceptionally hot dry summer on photosynthetic traits in oak (*Quercus pubescens*) leaves. *Tree Physiol.* 28, 785–795. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.5.785>
- Hu, R., Bournez, E., Cheng, S., Jiang, H., Nerry, F., Landes, T., Saudreau, M., Kastendeuch, P., Najjar, G., Colin, J., Yan, G. 2018. Estimating the leaf area of an individual tree in urban areas using terrestrial laser scanner and path length distribution model. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* 144, 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2018.07.015>
- Jones, H. G., 1992. *Plants and Microclimate*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K.; Vol. 2nd. Ed. ISBN 9780511845727.
- Lang, A.R.G., McMurtriebm R.E. 1992. Total leaf areas of single trees of *Eucalyptus grandis* estimated from transmittances of the sun's beam. *Agric. Forest Meteorol.* 58:79-92. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(92\)90112-H](https://doi.org/10.1016/0168-1923(92)90112-H)
- Martin-StPaul, N., Delzon, S., Cochard, H., 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol. Lett.* 20, 1437–1447. <https://doi.org/10.1111/ele.12851>
- Martorell, S., Diaz-Espejo, A., Medrano, H., Ball, M.C., Choat, B., 2014. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: Linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant Cell Environment*, Volumen 37, pp. 617-626.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiol.* 23, 987–996. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.14.987>.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2004. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *For. Ecol. Manag.* 187, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2003.07.006>
- Méthy, M., 2000. Analysis of photosynthetic activity at the leaf and canopy levels from reflectance measurements: A case study. *Photosynthetica*, 38, 505–512.
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., Schroeder, J.I., 2015. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.*, Issue 28, pp. 154-162.

- Novick K.A., Miniati, C.F., Vose, J.M. 2016. Drought limitations to leaf-level gas exchange: results from a model linking stomatal optimization and cohesion–tension theory. *Plant Cell Environ.* 39, 583–596. <https://doi.org/10.1111/pce.12657>
- Novick K.A., Konings, A.G., Gentine, P., 2019. Beyond soil water potential: An expanded view on isohydricity including land–atmosphere interactions and phenology. *Plant Cell Environ.* 42, 1802–1815. <https://doi.org/10.1111/pce.13517>
- Oren, R., Sperry, J.S., Katul, G.G., Pataki, D.E., Ewers, B.E., Phillips, N., Schäfer, K.V.R., 1999. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant Cell Environ.*, Issue 22, pp. 1515–1526.
- Pariyar, S., Chang, S.C., Zinsmeister, D., Zhou, H., Grantz, D.A., Hunsche, M., Burkhardt, J., 2017. Xeromorphic traits help to maintain photosynthesis in the perhumid climate of a Taiwanese cloud forest. *Oecologia*, 184, 609–621. DOI: 10.1007/s00442-017-3894-4
- Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., Morales, F., 2013. Three pools of zeaxanthin in *Quercus coccifera* leaves during light transitions with different roles in rapidly reversible photoprotective energy dissipation and photoprotection. *J. Exp. Bot.*, 64, 1649–1661.
- Peguero-Pina, J.J., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., Moya, I., 2008. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia*, 156, 1–11.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Barrón, E., Camarero, J.J., Vilagrosa, A., Gil-Pelegrín, E. 2014. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.* 114(2), 301–13. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu108>.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Morales, F., Flexas, J., Gil-Pelegrín, E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.*, Issue 36, pp. 453–462.
- Peguero-Pina, J.J.; Sisó, S., Flexas, J., Galmés, J., Niinemets, Ü., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2017. Coordinated modifications in mesophyll conductance, photosynthetic potentials and leaf nitrogen contribute to explain the large variation in foliage net assimilation rates across *Quercus ilex* provenances. *Tree Physiol.*, Issue 37, pp. 1084–1094.
- Peñuelas, J., Piñol, J., Ogaya, R., Filella, I., 1997. Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970). *Int. J. Remote Sens.*, 18, 2869–2875.
- Reichstein, M., Bahn, M., Ciais, P., Frank, D., Mahecha, M.D., Seneviratne, S.I., Zscheischler, J., Beer, C., Buchmann, N., Frank, D.C., et al., 2013. Climate extremes and the carbon cycle. *Nature*, 500, 287–295.
- Rey-Sánchez, A.C., Slot, M., Posada, J.M., Kitajima, K., 2016. Spatial and seasonal variation in leaf temperature within the canopy of a tropical forest. *Clim. Res.* 2016, 71, 75–89. <https://doi.org/10.3354/cr01427>
- Salleo, S., Lo Gullo, M.A., De Paoli, D., Zippo, M., 1996. Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: A possible mechanism. *New Phytol.*, 132, 47–56.
- Tatarinov, F., Rotenberg, E., Maseyk, K., Ogée, J., Klein, T., Dan Yakir, D. 2016. Resilience to seasonal heat wave episodes in a Mediterranean pine forest. *New Phytol.* 210, 485–496. <https://doi.org/10.1111/nph.13791>
- Taylor, N.J., Smit, T.G., Midgley, S.J.E., Annandale, J.G. 2020. Stomatal regulation of transpiration and photosynthesis in macadamias. *Acta Hortic.* 1281, 463–469. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1281.61>

- Tenhunen, A.J.D., Lange, O.L., Braun, M. 1981. Midday stomatal closure in Mediterranean type sclerophylls under simulated habitat conditions in an environmental chamber: II. Effect of the complex of leaf temperature and air humidity on gas exchange of *Arbutus unedo* and *Quercus ilex*. *Oecologia* 50, 5-11. <https://doi.org/10.1007/BF00378788>
- Tenhunen, A.J.D., Serra, A.S., Harley, P.C., Dougherty, R.L., Reynolds, J.F., 1990. Factors influencing carbon fixation and water use by Mediterranean sclerophyll shrubs during summer drought. *Oecologia* 82, 381-393. <https://doi.org/10.1007/BF00317487>
- Tognetti, R., Longobucco, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1998. Transpiration and stomatal behavior of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. *Plant Cell Environ.* 21, 613–622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00301.x>
- Tsonev, T., Wahbi, S., Sun, P., Sorrentino, G., Centritto, M., 2014. Gas exchange, water relations and their relationships with photochemical reflectance index in *Quercus ilex* plants during water stress and recovery. *Int. J. Agric. Biol.*, 16, 335–341.
- Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V.R., Gil-Pelegrín, E., 2003. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *J. Exp. Bot.* 54(390), 2015-2024. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg221>
- Wu, C., Niu, Z., Tang, Q., Huang, W., 2008. Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation. *Agric. For. Meteorol.*, 148, 1230–1241.
- Yan, W., Zheng, S., Zhong, Y., Shangguan, Z., 2017, Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. *Sci. Rep.*, 7, 1–12.
- Yang, S., Tyree, M.T., 1992. A theoretical model of hydraulic conductivity recovery from embolism with comparison to experimental data on *Acer saccharum*. *Plant Cell Environ.*, 15, 633–643.
- Zarco-Tejada, P.J., Hornero, A., Hernández-Clemente, R., Beck, P.S.A., 2018. Understanding the temporal dimension of the red-edge spectral region for forest decline detection using high-resolution hyperspectral and Sentinel-2a imagery. *J. Photogramm. Remote Sens.*, 137, 134–148.
- Zhang, C., Preece, C., Filella, I., Farré-Armengol, G., Peñuelas, J., 2017. Assessment of the response of photosynthetic activity of mediterranean evergreen oaks to enhanced drought stress and recovery by using PRI and R690/R630. *Forests*, 8, 386.

ANEXOS

ANEXO 1

Cavitation Limits the Recovery of Gas Exchange after Severe Drought Stress in Holm Oak (*Quercus ilex* L.) (Artículo publicado)

Article

Cavitation Limits the Recovery of Gas Exchange after Severe Drought Stress in Holm Oak (*Quercus ilex* L.)

José Javier Peguero-Pina, Óscar Mendoza-Herrer, Eustaquio Gil-Pelegrín * and Domingo Sancho-Knapik

Unidad de Recursos Forestales, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain; jipeguero@aragon.es (J.J.P.-P.); oscarmendozaherrer@gmail.com (Ó.M.-H.); dsancho@cita-aragon.es (D.S.-K.)

* Correspondence: egilp@aragon.es; Tel.: +34-976-716-394

Received: 12 July 2018; Accepted: 23 July 2018; Published: 24 July 2018



Abstract: Holm oak (*Quercus ilex* L.) is a Mediterranean species that can withstand intense summer drought through a high resistance to cavitation far beyond the stomatal closure. Besides stomatal limitations, both mesophyll and biochemical limitations to CO₂ uptake could increase in holm oak under drought. However, no studies have addressed how hydraulic and non-hydraulic factors may limit the recovery of photosynthesis when re-watering after inducing 50% loss of hydraulic conductivity. We measured photosynthetic traits, xylem embolism, and abscisic acid (ABA) in holm oak with increasing levels of drought stress and seven days after plant re-watering. Drought stress caused a sharp decrease in net CO₂ assimilation (A_N), stomatal and mesophyll conductance (g_s and g_m), and maximum velocity of carboxylation (V_{cmax}). The stomatal closure could be mediated by the rapid increase found in ABA. The high level of xylem embolism explained the strong down-regulation of g_s even after re-watering. Therefore, only a partial recovery of A_N was observed, in spite of non-hydraulic factors not limiting the recovery of A_N , because i/ABA strongly decreased after re-watering, and ii/ g_m and V_{cmax} recovered their original values. Therefore, the hydraulic-stomatal limitation model would be involved in the partial recovery of A_N , in order to prevent extensive xylem embolism under subsequent drought events that could compromise holm oak survival.

Keywords: abscisic acid; drought; holm oak; maximum velocity of carboxylation; mesophyll conductance; photosynthesis; recovery; stomatal conductance; xylem embolism

1. Introduction

Mediterranean-type climates are characterized by hot/dry summers and mild or cold winters that can potentially restrict vegetative activity [1,2]. This type of climate is found in several regions between 30° and 40° latitude on the western sides of continents [3], in areas where the shift of the subtropical high pressure cells to higher latitudes during summer causes atmospheric stability, and as a consequence, an absence of rainfall [4]. Moreover, climate change projections indicate that Mediterranean ecosystems could experience drastic reductions in precipitation that will exacerbate seasonal drought stress [5,6]. Therefore, plant species growing in the Mediterranean area should develop mechanisms and strategies to cope with prolonged periods of water shortage [7].

Stomatal closure in response to drought is a common way of regulating water consumption [8–11]. This strategy is considered to be an effective mechanism that prevents xylem cavitation and runaway embolism [12,13], albeit at the expense of a reduction in net CO₂ assimilation that could compromise the carbon balance of the plant [2,14]. The existence of a delay between the water potential leading stomatal closure and that inducing extensive xylem cavitation (i.e., a wide “security margin”) [15] is common in plants occurring in water-limited environments [16]. Several studies suggest that a

wide “security margin” would increase the survival and competitiveness under Mediterranean severe drought conditions [12,17].

Holm oak (*Quercus ilex* L.) is a keystone Circum-Mediterranean tree species—both in terms geographic distribution and landscape dominance—that experiences very negative water potentials under extreme drought (a more anisohydric behavior) [18], and shows high resistance to drought-induced cavitation [19]. This species has a wide “security margin” because stomatal closure occurs at water potentials (ca. -3 MPa) [10,12] much higher than those inducing 50% Loss of hydraulic Conductivity (PLC₅₀) (ca. -6 MPa) [19]. Despite this, in periods of extended drought, stomatal closure cannot sufficiently restrict water loss to prevent the formation of extensive embolism in the xylem [20].

Besides stomatal limitations, drought stress can also reduce photosynthesis by (i) decreasing the mesophyll conductance to CO₂ (g_m), i.e., increasing the CO₂ transfer resistance from intercellular air spaces to carboxylation sites in chloroplasts (mesophyll limitations), and (ii) decreasing the maximum carboxylase activity of Rubisco (V_{cmax}), i.e., inhibiting the capacity to fix CO₂ into sugars (biochemical limitations) [21]. Regarding holm oak, Galle et al. [22] showed evidence that mesophyll limitations increased when experiencing drought stress; this plays a predominant role in limiting photosynthesis under these conditions. Moreover, these authors also characterized the velocity of recovery of photosynthetic traits after re-watering, but they only found a partial recovery of net CO₂ assimilation due to persistently low stomatal and mesophyll conductances.

The time to recovery of plant function is critical for ecosystem function, especially if a new drought arrives, as was recently addressed by Schwalm et al. [23]. However, few studies have addressed the relationship between hydraulic and photosynthetic traits during drought and recovery [20,24–27]. Overall, these authors suggested that recovery of photosynthetic capacity could be driven by recovery of ability for water transport to the transpiring leaves. Besides hydraulic traits, Yan et al. [28] proposed that non-hydraulic factors might jeopardize the recovery of gas exchange from severe drought in *Robinia pseudoacacia*, i.e., through the existence of residual abscisic acid (ABA) during the recovery stage.

However, to the extent of our knowledge, no studies have addressed the role of both hydraulic (xylem embolism) and non-hydraulic factors (namely g_m , V_{cmax} and ABA) in the decline of the photosynthetic activity of holm oak under severe drought conditions, and its subsequent recovery after re-watering, which is the main objective of the present study. We hypothesized that recovery of net CO₂ assimilation in holm oak after imposing a severe drought (i.e., reaching water potential values close to PLC₅₀) would be compromised by extensive xylem embolism, more than by non-hydraulic factors.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Experimental Conditions

Seeds from holm oak (*Q. ilex* subsp. *rotundifolia*) (“Soria” provenance, 41°46′ N, 2°29′ W, 1074 m above sea level, Spain) were sown and cultivated in 2003 in 0.5 L containers inside a greenhouse under the same conditions with a mixture of 80% compost (Neuhaus Humin Substrat N6; Klasman-Deilmann GmbH, Geeste, Germany) and 20% perlite. After the first growth cycle, the seedlings were transplanted to 25 L containers filled with the same mixture of compost and perlite, and cultivated outdoors at CITA de Aragón (41°39′ N, 0°52′ W, Zaragoza, Spain), under Mediterranean conditions (mean annual temperature 15.4 °C, total annual precipitation 298 mm). A slow-release fertilizer (15:9:12 N:P:K, Osmocote Plus, Sierra Chemical, Milpitas, CA, USA) was periodically added to the top 10-cm layer of substrate (3 g L⁻¹ growth substrate). All plants were grown under the same environmental conditions, drip-irrigated every 2 days and pruned when necessary.

Two weeks before the beginning of the experiment, ten potted plants (14-years-old and ca. 1.5 m in height and ca. 0.8 m of maximum diameter) were placed under a clear plastic roof (polyethylene film for greenhouse covering, 200 µm thickness) that allowed the passing 90% of PPFD (~1800 µmol photons m⁻² s⁻¹ at midday, during the experiment). The use of covers in water-stress experiments had the advantage of performing measurements in more controlled environmental conditions, i.e.,

avoiding re-watering by storms or unwanted rainfall events. Watering was stopped on 21 August 2017, and measurements in well-watered plants started on 22 August 2017. Over the following days, measurements were performed in the same plants every two or three days with increasing levels of drought stress. Drought stress was imposed during 20 days. Finally, after the last measurement under drought stressed conditions, plants were re-watered, and measurements were performed again after 7 days.

Air temperature (T , °C) and relative humidity (RH, %) were measured at the experimental site using a Hobo Pro temp/RH data logger (Onset Computer, Bourne, MA, USA) located at 1.30 m above the soil surface. Measurements were recorded every 60 min from June to September of 2017. Vapour pressure deficit (VPD, kPa) was calculated from values of T and RH according to Rundel and Jarrell [29]. Mean and maximum diurnal (from dawn to sunset) VPD values for this period are shown in Figure S1.

2.2. Water Potential Measurements

Predawn and midday leaf water potentials (ψ_{PD} and ψ_{MD} , MPa) were measured in shoots of holm oak (with leaves still attached to the shoots) with a Scholander pressure chamber following the methodological procedure described by Turner [30].

2.3. Leaf Gas Exchange and Chlorophyll Fluorescence Measurements

Simultaneous gas-exchange and chlorophyll fluorescence measurements were conducted with an open gas exchange system (CIRAS-2, PP-Systems, Amesbury, MA, USA) fitted with an automatic universal leaf cuvette (PLC6-U, PP-Systems) and an FMS II portable pulse amplitude modulated fluorometer (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). All measurements were performed between 8 and 9 h (solar time) in fully developed current-year attached leaves of holm oak, at controlled cuvette CO_2 concentration ($C_a = 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and a saturating photosynthetic photon flux density (PPFD) of $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In all measurements, the vapor pressure deficit was kept at 1.25 kPa, and leaf temperature at 25 °C. After steady-state gas-exchange was reached, net CO_2 uptake (A_N , $\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), stomatal conductance (g_s , $\text{mmol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the effective quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) were estimated. The Φ_{PSII} was calculated as $(F'_M - F_S)/F'_M$, where F_S is the steady-state fluorescence and F'_M is the maximum fluorescence during a light-saturating pulse of $\sim 8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [31]. Photosynthetic electron transport rate (J_F) was then calculated according to Krall and Edwards [32], following the methodology described in Peguero-Pina et al. [33]. Leakage of CO_2 in and out of the cuvette was determined as described in Flexas et al. [34], and used to correct for measured leaf fluxes.

Mesophyll conductance (g_m) and maximum velocity of carboxylation (V_{cmax}) were estimated according to the method of Harley et al. [35] (Equation (1)), and the one-point method of De Kauwe et al. [36] Equation (2), respectively, as follows:

$$g_m = \frac{A_N}{C_i - \frac{\Gamma^*(J_F + 8(A_N + R_L))}{J_F - 4(A_N + R_L)}} \quad (1)$$

$$V_{cmax} = \frac{A_N}{\left(\frac{C_i - \Gamma^*}{C_i + K_m}\right) - 0.015} \quad (2)$$

where A_N and the substomatal CO_2 concentration (C_i) were taken from the gas-exchange measurements at saturating light. The chloroplastic CO_2 compensation point in the absence of mitochondrial respiration (Γ^*) and the respiration rate in the light (R_L) were estimated as described in Flexas et al. [37], whereas K_m (the Michaelis-Menten constant) was estimated as described in De Kauwe et al. [36].

To separate the relative controls on A_N resulting from limited stomatal conductance (l_s), mesophyll diffusion (l_m) and biochemical capacity (l_b), we used the quantitative limitation analysis of Grassi

and Magnani [38], as applied in Tomás et al. [39] and Peguero Pina et al. [40]. Different fractional limitations, l_s , l_m and l_b ($l_s + l_m + l_b = 1$) were calculated as:

$$l_s = \frac{g_{\text{tot}}/g_s \cdot \delta A N_N / \delta C_c}{g_{\text{tot}} + \delta A N_N / \delta C_c} \quad (3)$$

$$l_m = \frac{g_{\text{tot}}/g_m \cdot \delta A N_N / \delta C_c}{g_{\text{tot}} + \delta A N_N / \delta C_c} \quad (4)$$

$$l_b = \frac{g_{\text{tot}}}{g_{\text{tot}} + \delta A N_N / \delta C_c} \quad (5)$$

where g_s is the stomatal conductance to CO_2 , g_m is the mesophyll conductance according to Harley et al. [35] Equation (1), and g_{tot} is the total conductance to CO_2 from ambient air to chloroplasts (sum of the inverse CO_2 serial conductances g_s and g_m). The values of g_m obtained were used to calculate the chloroplastic CO_2 concentration (C_c) using the equation $C_c = C_i - A_N/g_m$.

2.4. Whole-Plant Transpiration and Conductance

Whole-plant transpiration was estimated through lysimetric measurements by weighing the plant pots from the early morning to midday every 2 h (6, 8, 10 and 12 h solar time) with a precision balance (Wagi Load Cell WLC 20/A2, Radwag Balances and Scales, Radom, Poland). In order to consider only the water losses by plant transpiration, the surface of the ground and the pot drain holes were sealed before the first measurement; these seals were removed after the last measurement of the day. Transpiration ($\text{mol H}_2\text{O s}^{-1}$) was calculated as the difference in weight divided by the time lapse between two consecutive measurements. Whole-plant transpiration on leaf area basis (E_{plant} , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was calculated by estimating total leaf area per plant; to do this, single leaf area was estimated in 20 representative leaves per plant and the total number of leaves per plant was quantified. Moreover, whole-plant conductance (g_{plant}) was derived from Ficks law of diffusion, as described in Pearcy et al. [41]:

$$g_{\text{plant}} = \frac{E_{\text{plant}}}{\Delta VPD} \quad (6)$$

where ΔVPD is the leaf-air vapour pressure difference.

2.5. Native Xylem Embolism

Native xylem embolism was estimated in current-year twigs of holm oak collected from branches where ψ_{MD} had previously been measured. The twigs were cut under water in the field and immediately carried out to the lab in a plastic bag. Once there, the stem segments of the twigs were cut under water again (50 mm long), and both ends were shaved with a razor blade. The segments were placed in a tubing similar to that described by Cochard et al. [42] and connected to a digital mass flowmeter Liqui-Flow (Bronkhorst High-Tech, Ruurlo, The Netherlands). The tubing with the twigs was immersed in distilled water to prevent desiccation and to maintain a near constant temperature [12]. The segments were perfused with distilled, degassed and filtered ($0.22 \mu\text{m}$) water containing 0.005% (v/v) Micropur (Katadyn Products, Wallisellen, Switzerland) to prevent microbial growth [43]. The hydraulic conductivity was measured before and after removing air embolisms by applying short perfusions at 0.15 MPa for 60–90 s, as described by Sperry et al. [44]. Native embolism was then calculated as the ratio between the hydraulic conductivity before and after removing embolism.

2.6. Absciscic Acid Determination

Absciscic acid (ABA) was determined in current-year fully developed leaves of holm oak. Samples were collected at midday and stored at -80°C for preservation until analysis. Fifty milligrams of lyophilized tissue was extracted twice with 3 mL of acetone/water/formic acid (80:19:1, $v/v/v$) (30 min,

2000 rpm) and centrifuged (15 min, 3000 rpm, 4 °C). The acetone was evaporated under a nitrogen stream, and the remaining aqueous extract was adjusted to 1.2 mL with Milli-Q water. The extract was partitioned twice with diethyl ether, dried under nitrogen, and redissolved in 500 μ L acetonitrile/water (30:70, *v/v*) containing 0.1% formic acid. The extract was analyzed by mass spectrometry, and ABA was quantified following the methodology described in Sancho-Knapik et al. [45].

2.7. Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ standard error. One-way ANOVAs were performed to identify the effect of time of measurement on whole-plant transpiration (E_{plant}) and conductance (g_{plant}). Multiple comparisons were carried out among times of measurement for E_{plant} and g_{plant} using the post hoc Tukey's Honest Significant Difference test. Student's *t*-tests were used to compare the values of photosynthetic traits (A_N , g_s , g_m and V_{cmax}) measured for well-watered plants before the drought period with those measured 7 days after plants were rewatered. All statistical analyses were performed with SAS version 8.0 (SAS, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Whole-Plant Transpiration and Conductance

Both transpiration and conductance at whole-plant level (E_{plant} and g_{plant}) decreased in holm oak when predawn water potential (ψ_{PD}) became more negative (Figure 1). At the end of the drought period (when ψ_{PD} was ca. -6 MPa), both E_{plant} and g_{plant} reached almost negligible values. E_{plant} for well-watered plants was statistically higher at midday (solar time) when compared with the values obtained in early- and mid-morning (Figure 1a). This fact can be explained by the gradual increase in VPD from early morning to midday because g_{plant} did not show differences among different times of measurement for well-watered plants (when ψ_{PD} was ca. 0 MPa, Figure 1b). g_{plant} only showed differences among different times of measurement when ψ_{PD} was ca. -3 MPa.

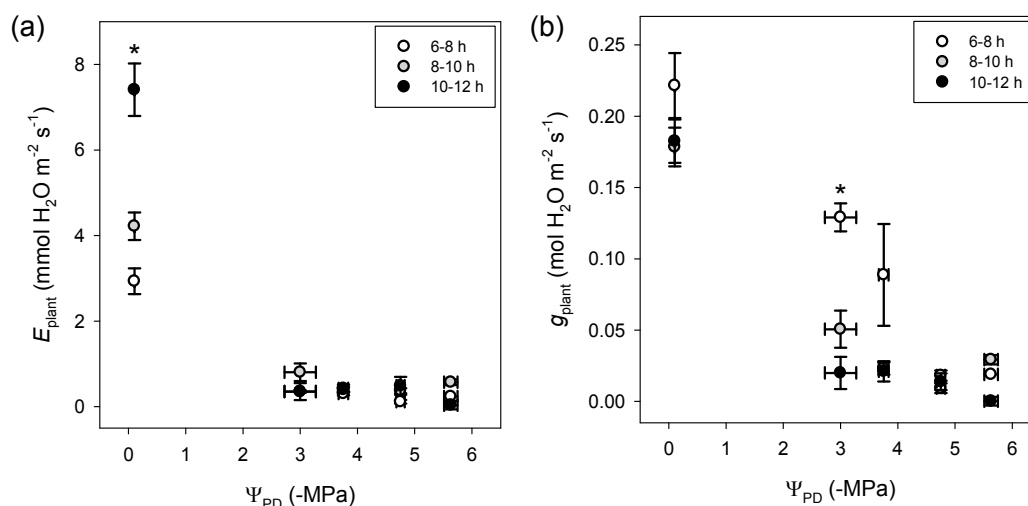


Figure 1. Time course of (a) whole-plant transpiration (E_{plant}) and (b) whole-plant conductance (g_{plant}) with predawn water potential (ψ_{PD}) for holm oak leaves during the drought period at early morning (between 6 and 8 h solar time, white symbols), mid-morning (between 8 and 10 h solar time, grey symbols) and midday (between 10 and 12 h solar time, black symbols). Data are mean $\pm$ SE. Asterisks indicate significant differences among early morning, mid-morning and midday for each level of ψ_{PD} (Tukey's test, $p < 0.05$).

3.2. Photosynthetic Traits at Leaf Level

Both net photosynthesis and stomatal conductance at leaf level (A_N and g_s) decreased in holm oak when ψ_{PD} became more negative, reaching negative values for A_N and almost negligible values for g_s at the end of the drought period (Figure 2), which agreed with the results obtained at the whole-plant level (Figure 1). Both A_N and g_s showed a partial recovery when plants were re-watered, although this was much higher for A_N than for g_s (64% and 29% with respect to the values for well-watered plants, respectively). This pattern was also observed for mesophyll conductance and maximum velocity of carboxylation (g_m and V_{cmax}), which showed a sharp decrease throughout the drought period (Figure 3). However, contrary to g_s , the recovery of g_m and V_{cmax} was almost complete 7 days after plants were re-watered (89 and 75%, respectively).

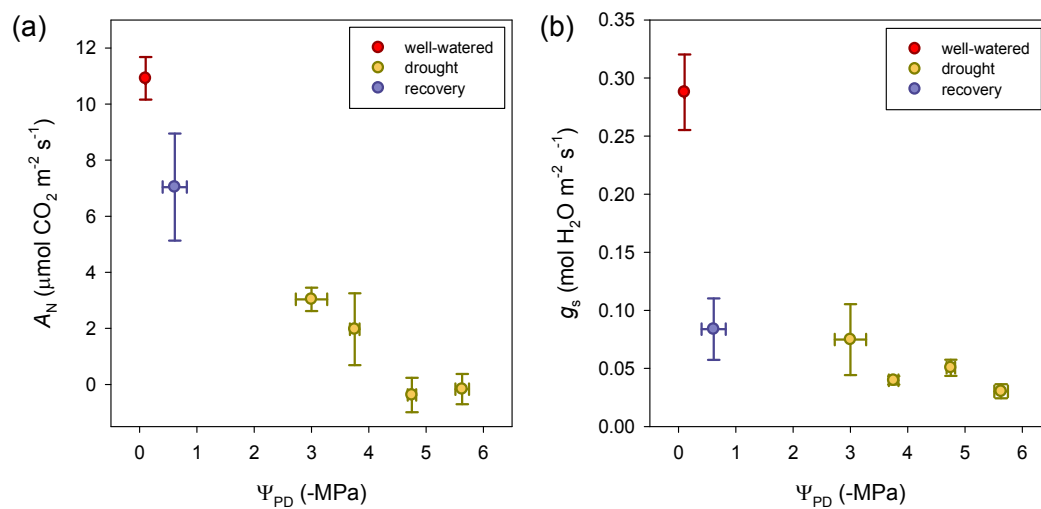


Figure 2. Time course of (a) net photosynthesis (A_N) and (b) stomatal conductance (g_s) with predawn water potential (ψ_{PD}) for holm oak leaves well-watered (red symbols), during the drought period (yellow symbols) and 7 days after plants were re-watered (violet symbols). Data are mean $\pm$ SE.

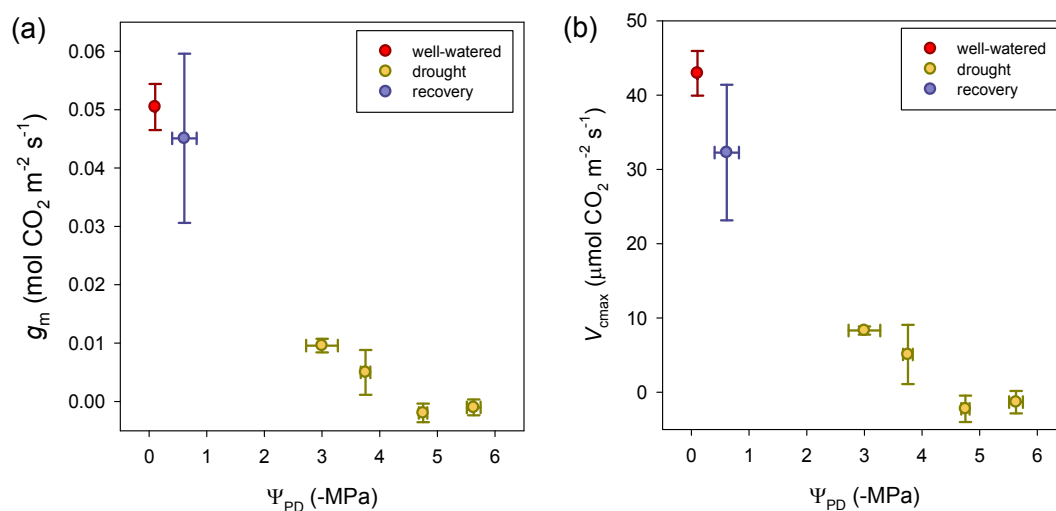


Figure 3. Time course of (a) mesophyll conductance (g_m) and (b) maximum velocity of carboxylation (V_{cmax}) with predawn water potential (ψ_{PD}) for holm oak leaves well-watered (red symbols), during the drought period (yellow symbols) and 7 days after plants were re-watered (violet symbols). Data are mean $\pm$ SE.

The analysis of the partitioning of photosynthetic limitations revealed that A_N was mainly limited by mesophyll conductance (l_m) for well-watered plants, which was gradually increased during the drought period (Figure 4). However, there was a strong increase in l_s and a strong decrease in l_m 7 days after plants were re-watered (Figure 3), probably associated with the lack of recovery in g_s (Figure 2).

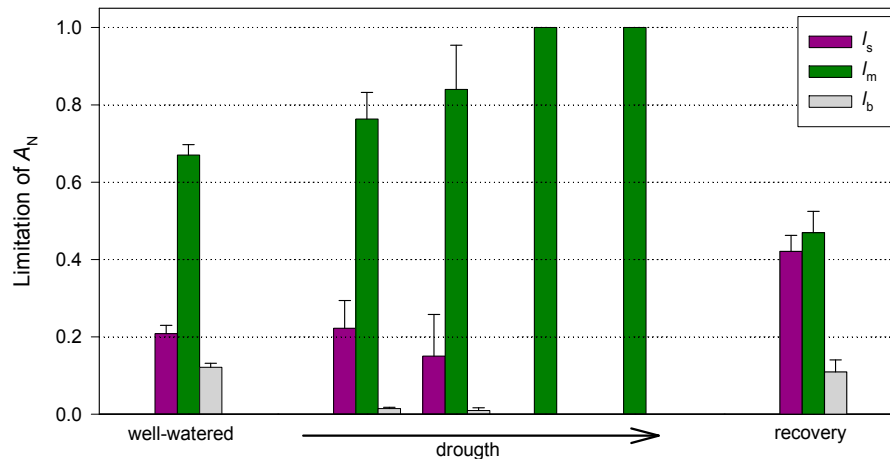


Figure 4. Relative stomatal (l_s), mesophyll (l_m) and biochemical (l_b) photosynthesis limitations for holm oak leaves well-watered, with increasing levels of drought stress and 7 days after plants were re-watered. Data are mean $\pm$ SE.

3.3. Native Xylem Embolism

The increasing levels of maximum daily drought stress (estimated through the measurement of ψ_{MD}) induced a progressive loss of hydraulic conductivity in holm oak twigs, reaching values of native xylem embolism ca. 50% at the end of the drought period. This value of native embolism remained almost constant for 7 days after plants were re-watered (ca. 55%, Figure 5).

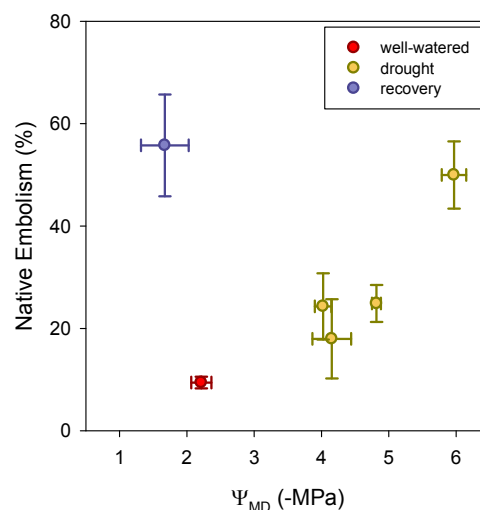


Figure 5. Time course of native xylem embolism (%) with midday water potential (ψ_{MD}) for holm oak twigs well-watered (red symbols), during the drought period (yellow symbols) and 7 days after plants were re-watered (violet symbols). Data are mean $\pm$ SE.

3.4. Absciscic Acid

The increasing levels of drought stress induced a sharp increase in ABA concentration, reaching maximum values at ψ_{PD} between -3 and -4 MPa (Figure 6). Despite ABA progressively decreasing

until the end of the drought period, the residual value after plants were re-watered was much lower than that registered throughout the drought period, but slightly higher than that for well-watered plants (Figure 6).

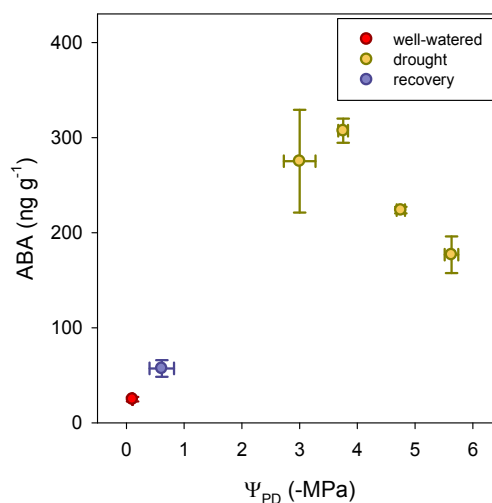


Figure 6. Time course of abscisic acid (ABA, ng g⁻¹) with predawn water potential (Ψ_{PD}) for well-watered holm oak leaves (red symbols) during the drought period (yellow symbols) and 7 days after plants were re-watered (violet symbols). Data are mean $\pm$ SE.

4. Discussion

4.1. Drought Period

All the photosynthetic traits analyzed for holm oak leaves showed strong reductions when increasing the levels of drought, reaching almost negligible values at the end of the drought period (Figures 2 and 3). Thus, the ability for net CO₂ uptake (A_N) was progressively decreased and became negative when predawn water potential (Ψ_{PD}) was ca. -5 MPa, as previously reported for this species [10]. The drop experienced by A_N throughout the drought period was accompanied by strong reductions for the rest of photosynthetic traits, i.e., stomatal conductance (g_s), mesophyll conductance (g_m), and maximum velocity of carboxylation (V_{cmax}). These results indicate that both diffusive (stomatal and mesophyll) and non-diffusive (biochemical) limitations of photosynthesis increased throughout the drought period, which helped explain the pattern followed by A_N . Regarding to this, Galle et al. [22] reported a similar performance for A_N , g_s and g_m in holm oak when subjected to drought, although these authors found that V_{cmax} was not affected throughout the experiment.

Regardless of the absolute increase found for all the factors potentially limiting photosynthesis, the analysis of the partitioning of the different components revealed that g_m was the most limiting factor for net CO₂ assimilation for well-watered plants and throughout the drought period (Figure 4), which confirms the important role of g_m in the photosynthetic capacity of holm oak [46]. In fact, the relative importance of mesophyll limitation (l_m) was gradually increased during the drought period, from 0.67 for well-watered plants up to 1.00 when Ψ_{PD} was ca. -5 MPa (Figure 4), concurrently with the point when A_N became negative (Figure 2).

Besides g_m , the response found in g_s under drought stress also imposed a strong limitation to CO₂ uptake. As stated in the Introduction, this is a common mechanism in Mediterranean plants in response to a reduction in soil water availability that has been reported for holm oak [10]. The results found in the present study seem to indicate that the stomatal closure at the onset of the drought period (when Ψ_{PD} was ca. -3 MPa) could be driven by the rapid increase in abscisic acid (ABA) (Figure 6), a plant hormone that initiates a signaling cascade to close stomata and reduce water loss [47]. It should be noted that, at this stage, a down-regulation of stomatal conductance at whole-plant level (g_{plant})

from the early morning to midday (Figure 1) was also detected, probably associated to hydraulic factors due to the effect of incipient xylem embolism (Figure 6). Afterwards, ABA concentration showed a slight decline until the end of the drought period, as observed by Yan et al. [28] for *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. Furthermore, the results derived from this work provide evidence that even an almost complete stomatal closure (i.e., g_s below $0.030 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) cannot impede a meaningful loss of hydraulic conductivity in the xylem (ca. 50% at the end of the drought period, Figure 5).

4.2. Recovery

The values of ψ_{PD} for holm oak recovered from -5.6 MPa at the end of the drought period to -0.6 MPa 7 days after re-watering, although this value was slightly more negative than that for well-watered plants (-0.1 MPa). The rate of recovery of the different photosynthetic traits showed meaningful differences among them. Thus, g_m and V_{cmax} recovered the original values registered for well-watered plants (Figure 3, Table 1), which is in accordance with the results showed by Galle et al. [22] for holm oak. However, contrary to our findings, these authors reported that A_N and g_s in holm oak restored the control values even after three drought cycles. In fact, we observed only a partial recovery of A_N after re-watering ($7.0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Figure 2a), and this value was statistically significant different ($p < 0.05$, Table 1) when measured on well-watered plants ($10.9 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Figure 2a). This fact can be explained by the low g_s after re-watering ($0.084 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Figure 2b), i.e., much lower ($p < 0.05$, Table 1) than the value showed by well-watered plants ($0.288 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Figure 2b). As a result, stomatal limitations to photosynthesis (l_s) increased significantly after re-watering when compared with the values estimated for both well-watered plants and during the drought period (Figure 4).

Table 1. Outputs of the Student's t -tests performed to compare the values of net photosynthesis (A_N), stomatal conductance (g_s), mesophyll conductance (g_m) and maximum velocity of carboxylation (V_{cmax}) for well-watered plants before the drought period and those measured 7 days after plants were rewatered. *: Significant values at $p < 0.05$.

	<i>t</i> -Value	<i>p</i> -Value
A_N	2.20	0.049 *
g_s	4.38	0.001 *
g_m	0.43	0.668
V_{cmax}	1.27	0.231

These apparently discrepancies between our results and those showed by Galle et al. [22] can be explained by considering the different levels of water stress reached when both studies are compared. Thus, midday water potential (ψ_{MD}) in holm oak only decreased to -2.9 MPa in Galle et al. [22], whereas in our study, ψ_{MD} was close to -6 MPa at the end of the drought cycle (Figure 5). These differences in ψ_{MD} between both experiments would have important consequences in terms of loss of xylem hydraulic conductivity. Effectively, we found that xylem embolism for holm oak twigs was ca. 50% at the end of the drought period, whereas ψ_{MD} reported by Galle et al. [22] would only induce an almost negligible level of xylem embolism—ca. 10%—according to our data and those previously published by Peguero-Pina et al. [19] for holm oaks of different provenances. The preservation of the integrity of xylem water transport may justify the rapid recovery of g_s found for holm oak by Gallé et al. [22] once water potential was restored to control values. In contrast, the meaningful value of xylem embolism and the lack of hydraulic recovery (Figure 5) could explain the strong down-regulation of g_s , even after re-watering, found in the our study.

The role of the hydraulic limitations in the recovery of leaf gas exchange once re-watered after a drought period has been discussed in previous studies [28,48,49]. Thus, Brodribb and Cochard [49] found strong evidence that hydraulic limitation was the process governing gas-exchange recovery

from drought in water stressed conifers. On the other hand, Blackman et al. [48] suggested that, besides hydraulic limitations, non-hydraulic factors such as ABA might also be involved in limiting the rate of stomatal reopening after re-watering in four woody angiosperm species native to Australia. More recently, Yan et al. [28] stated that the stomatal recovery in *Amorpha fruticosa* L. and *Robinia pseudoacacia* L. in the re-watered stage was mainly mediated by hydraulic factors, although they also suggested that non-hydraulic limitations might also be involved in the recovery of gas exchange in *R. pseudoacacia*.

In our case, there is considerable evidence that points toward the predominant role of the hydraulic-stomatal limitation model proposed by Brodribb and Cochard [49] in the lack of recovery of A_N found in holm oak. First, ABA concentrations after re-watering were very far from those measured during the drought period, especially with respect to the maximum values registered when the stomatal closure occurred (Figure 6). Second, as stated above, g_m and V_{cmax} completely recovered their original values for well-watered plants (Figure 3). Therefore, these non-hydraulic factors would not limit the recovery of photosynthetic activity of holm oak. On the other hand, the water potential drop between predawn and midday ($\psi_{MD} - \psi_{PD}$) after re-watering (ca. 1 MPa) was much lower than for well-watered plants (ca. 2 MPa), which suggests a down-regulation of plant transpiration (i.e., through low g_s) coupled with a reduced ability for water transport through the xylem to transpiring leaves (i.e., due to xylem embolism), according to the model proposed by Oren et al. [50]. In this regard, although several authors have reported a recovery of hydraulic capacity by embolism repair after re-watering (e.g., [20,51–53]), this seems not to be the case of holm oak, at least when reaching water potential values close to PLC₅₀.

5. Conclusions

Holm oak showed conservative water-use behavior when subjected to drought, mainly associated to an increase in ABA that triggered the stomatal closure. This fact, together with strong declines in g_m and V_{cmax} , severely limited the photosynthetic ability of this species under intense water stress. In spite of minimal water losses and its higher resistance to drought-induced cavitation, drought stress led to an almost complete stomatal closure, and xylem embolism rates close to PLC₅₀. The partial recovery of A_N found after re-watering was mainly due to hydraulic factors, which reduced g_s in order to prevent extensive xylem embolism under subsequent drought events that could compromise plant survival. Nevertheless, the occurrence of accumulative episodes of extreme drought may have a negative effect on the long-term performance of holm oak, due to a reduced ability for carbon gain.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/9/7/443/s1>, Figure S1: Mean and maximum diurnal VPD at the experimental site from June to September of 2017.

Author Contributions: All authors conceived and designed the experiments; J.J.P.-P., Ó.M.-H. and D.S.-K. performed the experiments; J.J.P.-P. and Ó.M.-H. analyzed the data; J.J.P.-P. wrote the initial draft of the paper; all authors contributed to the discussion of the results and to the writing of the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) grant number RTA2015-00054-C02-01. Research of D. S. K. is supported by a DOC INIA-CCAA contract co-funded by INIA and European Social Fund (ESF).

Acknowledgments: Authors thank Ernesto Ruiz for his valuable work during the experiment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Montserrat-Martí, G.; Camarero, J.J.; Palacio, S.; Pérez-Rontomé, C.; Milla, R.; Albuixech, J.; Maestro, M. Summer-drought constrains the phenology and growth of two co-existing Mediterranean oaks with contrasting leaf habit: Implications for their persistence and reproduction. *Trees* **2009**, *23*, 787–799. [CrossRef]
2. Flexas, J.; Diaz-Espejo, A.; Gago, J.; Gallé, A.; Galmés, J.; Gulías, J.; Medrano, H. Photosynthetic limitations in Mediterranean plants: A review. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 12–23. [CrossRef]

3. Lionello, P.; Malanotte-Rizzoli, P.; Boscolo, R.; Alpert, P.; Artale, V.; Li, L.; Luterbacher, J.; May, W.; Trigo, R.; Tsimplis, M.; et al. The Mediterranean climate: An overview of the main characteristics and issues. In *Mediterranean Climate Variability*; Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; pp. 1–26. ISBN 978-0-444-52170-5.
4. Gil-Pelegrín, E.; Saz, M.A.; Cuadrat, J.M.; Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D. Oaks under Mediterranean-type climates: Functional response to summer aridity. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer International Publishing: Basel, Switzerland, 2017; pp. 137–193. ISBN 978-3-319-69099-5.
5. Peñuelas, J.; Sardans, J.; Filella, I.; Estiarte, M.; Llusà, J.; Ogaya, R.; Carnicer, J.; Bartrons, M.; Rivas-Ubach, A.; Grau, O.; et al. Assessment of the impacts of climate change on Mediterranean terrestrial ecosystems based on data from field experiments and long-term monitored field gradients in Catalonia. *Environ. Exp. Bot.* **2018**, *152*, 49–59. [[CrossRef](#)]
6. Busotti, F.; Ferrini, F.; Pollastrini, M.; Fini, A. The challenge of Mediterranean sclerophyllous vegetation under climate change: From acclimation to adaptation. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 80–98. [[CrossRef](#)]
7. Niinemets, Ü.; Keenan, T. Photosynthetic responses to stress in Mediterranean evergreens: Mechanisms and models. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 24–41. [[CrossRef](#)]
8. Gallé, A.; Haldimann, P.; Feller, U. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New Phytol.* **2007**, *174*, 799–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Peguero-Pina, J.J.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrín, E.; Moya, I. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* **2008**, *156*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrín, E. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 453–462. [[CrossRef](#)]
11. Klein, T. The variability of stomatal sensitivity to leaf water potential across tree species indicates a continuum between isohydric and anisohydric behaviours. *Funct. Ecol.* **2014**, *28*, 1313–1320. [[CrossRef](#)]
12. Vilagrosa, A.; Bellot, J.; Vallejo, V.R.; Gil-Pelegrín, E. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *J. Exp. Bot.* **2003**, *54*, 2015–2024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tombesi, S.; Nardini, A.; Frioni, T.; Socolini, M.; Zadra, C.; Farinelli, D.; Poni, S.; Palliotti, A. Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. McDowell, N.G. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 1051–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hochberg, U.; Rockwell, F.E.; Holbrook, N.M.; Cochard, H. Iso/Anisohydry: A Plant-Environment Interaction Rather Than a Simple Hydraulic Trait. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 112–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hacke, U.G.; Sperry, J.S.; Pittermann, J. Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah. *Basic Appl. Ecol.* **2000**, *1*, 31–41. [[CrossRef](#)]
17. Vilagrosa, A.; Morales, F.; Abadía, A.; Bellot, J.; Cochard, H.; Gil-Pelegrín, E. Are symplast tolerance to intense drought conditions and xylem vulnerability to cavitation coordinated? An integrated analysis of photosynthetic, hydraulic and leaf level processes in two Mediterranean drought-resistant species. *Environ. Exp. Bot.* **2010**, *69*, 233–242. [[CrossRef](#)]
18. Aguadé, D.; Poyatos, R.; Rosas, T.; Martínez-Vilalta, J. Comparative drought responses of *Quercus ilex* L. and *Pinus sylvestris* L. in a montane forest undergoing a vegetation shift. *Forests* **2015**, *6*, 2505–2529. [[CrossRef](#)]
19. Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D.; Barrón, E.; Camarero, J.J.; Vilagrosa, A.; Gil-Pelegrín, E. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.* **2014**, *114*, 301–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Martorell, S.; Diaz-Espejo, A.; Medrano, H.; Ball, M.C.; Choat, B. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: Linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 617–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Flexas, J.; Barbour, M.M.; Brendel, O.; Cabrera, H.M.; Carriqui, M.; Díaz-Espejo, A.; Douthe, C.; Dreyer, E.; Ferrio, J.P.; Gago, J.; et al. Mesophyll conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci.* **2012**, *193*–194, 70–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Galle, A.; Florez-Sarasa, I.; El Aououad, H.; Flexas, J. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi-deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 5207–5216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schwalm, C.R.; Anderegg, W.R.L.; Michalak, A.M.; Fisher, J.B.; Biondi, F.; Koch, G.; Litvak, M.; Ogle, K.; Shaw, J.D.; Wolf, A.; et al. Global patterns of drought recovery. *Nature* **2017**, *54*, 202–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Resco, V.; Ewers, B.E.; Sun, W.; Huxman, T.E.; Weltzin, J.F.; Williams, D.G. Drought induced hydraulic limitations constrain leaf gas exchange recovery from drought after precipitation pulses in the C3 woody legume, *Prosopis velutina*. *New Phytol.* **2009**, *181*, 672–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Brodribb, T.J.; Bowman, D.J.M.S.; Nichols, S.; Delzon, S.; Burlett, R. Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytol.* **2010**, *188*, 533–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chen, J.W.; Zhang, Q.; Li, X.S.; Cao, K.F. Gas exchange and hydraulics in seedlings of *Hevea brasiliensis* during water stress and recovery. *Tree Physiol.* **2010**, *30*, 876–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guadagno, C.R.; Ewers, B.E.; Speckman, H.N.; Aston, T.L.; Huhn, B.J.; DeVore, S.B.; Ladwig, J.T.; Strawn, R.N.; Weinig, C. Dead or Alive? Using Membrane Failure and Chlorophyll a Fluorescence to Predict Plant Mortality from Drought. *Plant Physiol.* **2017**, *175*, 223–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yan, W.; Zheng, S.; Zhong, Y.; Shangguan, Z. Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rundel, P.W.; Jarrell, W.M. Water in the environment. In *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*, 1st ed.; Pearcy, R.W., Ehleringer, J., Mooney, H.A., Rundel, P.W., Eds.; Chapman and Hall: London, UK, 1989; pp. 29–56. ISBN 978-0-412-40730-2.
30. Turner, N.C. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.* **1988**, *9*, 289–308. [[CrossRef](#)]
31. Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *990*, 87–92. [[CrossRef](#)]
32. Krall, J.P.; Edwards, G.E. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiol. Plant.* **1992**, *86*, 80–187. [[CrossRef](#)]
33. Peguero-Pina, J.J.; Sisó, S.; Fernández-Marín, B.; Flexas, J.; Galmés, J.; García-Plazaola, J.I.; Niinemets, Ü.; Sancho-Knapik, D.; Gil-Pelegrín, E. Leaf functional plasticity decreases the water consumption without further consequences for carbon uptake in *Quercus coccifera* L. under Mediterranean conditions. *Tree Physiol.* **2016**, *36*, 356–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Flexas, J.; Díaz-Espejo, A.; Berry, J.A.; Galmés, J.; Cifre, J.; Kaldenhoff, R.; Medrano, H.; Ribas-Carbó, M. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: Quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1533–1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Harley, P.C.; Loreto, F.; Di Marco, G.; Sharkey, T.D. Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by the analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiol.* **1992**, *98*, 1429–1436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. De Kauwe, M.G.; Lin, Y.-S.; Wright, I.J.; Medlyn, B.E.; Crous, K.Y.; Ellsworth, D.S.; Maire, V.; Prentice, I.C.; Atkin, O.K.; Rogers, A.; et al. A test of the 'one-point method' for estimating maximum carboxylation capacity from field-measured, light-saturated photosynthesis. *New Phytol.* **2016**, *210*, 1130–1144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Flexas, J.; Ortuño, M.F.; Ribas-Carbó, M.; Díaz-Espejo, A.; Flórez-Sarasa, I.D.; Medrano, H. Mesophyll conductance to CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **2007**, *175*, 501–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Grassi, G.; Magnani, F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ.* **2005**, *28*, 834–849. [[CrossRef](#)]
39. Tomás, M.; Flexas, J.; Copolovici, L.; Galmés, J.; Hallik, L.; Medrano, H.; Ribas-Carbó, M.; Tosens, T.; Vislap, V.; Niinemets, Ü. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: Quantitative limitations and scaling up by models. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2269–2281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Peguero-Pina, J.J.; Sisó, S.; Flexas, J.; Galmés, J.; García-Nogales, A.; Niinemets, Ü.; Sancho-Knapik, D.; Saz, M.Á.; Gil-Pelegrín, E. Cell-level anatomical characteristics explain high mesophyll conductance and photosynthetic capacity in sclerophyllous Mediterranean oaks. *New Phytol.* **2017**, *214*, 585–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pearcy, R.W.; Schulze, E.-D.; Zimmermann, R. Measurement of transpiration and leaf conductance. In *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*, 1st ed.; Pearcy, R.W., Ehleringer, J., Mooney, H.A., Rundel, P.W., Eds.; Chapman and Hall: London, UK, 1989; pp. 137–160. ISBN 978-0-412-40730-2.
42. Cochard, H.; Breda, N.; Granier, A. Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: Evidence for stomatal control of embolism? *Ann. For. Sci.* **1996**, *53*, 197–206. [[CrossRef](#)]
43. Mayr, S.; Wieser, G.; Bauer, H. Xylem temperatures during winter in conifers at the alpine timberline. *Agric. For. Meteorol.* **2006**, *137*, 81–88. [[CrossRef](#)]
44. Sperry, J.S.; Donnelly, J.R.; Tyree, M.T. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ.* **1988**, *11*, 35–40. [[CrossRef](#)]
45. Sancho-Knapik, D.; Sanz, M.Á.; Peguero-Pina, J.J.; Niinemets, Ü.; Gil-Pelegrín, E. Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Ann. For. Sci.* **2017**, *74*, 24. [[CrossRef](#)]
46. Peguero-Pina, J.J.; Sisó, S.; Flexas, J.; Galmés, J.; Niinemets, Ü.; Sancho-Knapik, D.; Gil-Pelegrín, E. Coordinated modifications in mesophyll conductance, photosynthetic potentials and leaf nitrogen contribute to explain the large variation in foliage net assimilation rates across *Quercus ilex* provenances. *Tree Physiol.* **2017**, *37*, 1084–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Munemasa, S.; Hauser, F.; Park, J.; Waadt, R.; Brandt, B.; Schroeder, J.I. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *28*, 154–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Blackman, C.J.; Brodribb, T.J.; Jordan, G.J. Leaf hydraulics and drought stress: Response, recovery and survivorship in four woody temperate plant species. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 1584–1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Brodribb, T.J.; Cochard, H. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 575–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Oren, R.; Sperry, J.S.; Katul, G.G.; Pataki, D.E.; Ewers, B.E.; Phillips, N.; Schäfer, K.V.R. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant Cell Environ.* **1999**, *22*, 1515–1526. [[CrossRef](#)]
51. Brodersen, C.R.; McElrone, A.J.; Choat, B.; Matthews, M.A.; Shackel, K.A. The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 1088–1095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yang, S.; Tyree, M.T. A theoretical model of hydraulic conductivity recovery from embolism with comparison to experimental data on *Acer saccharum*. *Plant Cell Environ.* **1992**, *15*, 633–643. [[CrossRef](#)]
53. Salleo, S.; Lo Gullo, M.A.; De Paoli, D.; Zippo, M. Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: A possible mechanism. *New Phytol.* **1996**, *132*, 47–56. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO 2

**Chl Fluorescence Parameters and Leaf Reflectance Indices
Allow Monitoring Changes in the Physiological Status
of *Quercus ilex* L. under Progressive Water Deficit.
(Artículo publicado)**

Article

Chl Fluorescence Parameters and Leaf Reflectance Indices Allow Monitoring Changes in the Physiological Status of *Quercus ilex* L. under Progressive Water Deficit

Domingo Sancho-Knapik, Óscar Mendoza-Herrer, Eustaquio Gil-Pelegrín and José Javier Peguero-Pina *

Unidad de Recursos Forestales, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain; dsancho@cita-aragon.es (D.S.-K.); oscarmendozaherrer@gmail.com (O.M.-H); egilp@aragon.es (E.G.-P.)

* Correspondence: jjpeguero@aragon.es; Tel.: +34-976-716-974

Received: 29 May 2018; Accepted: 3 July 2018; Published: 4 July 2018



Abstract: Extreme droughts and heat events, frequently produced in Mediterranean climates, induce anomalies in the ecosystem–atmosphere CO₂ fluxes. In order to mitigate the consequences on forests and agriculture, managers must have a better knowledge of the ecosystem by monitoring plant status. Water status is commonly observed measuring water potential but when the extreme event is over, this parameter cannot show managers the recovery of other physiological processes such as photosynthesis. To address this problem, we have evaluated the *Quercus ilex* L. water status and photosynthetic capacity throughout an intense water scarcity event and a subsequent re-watering. Photosynthetic capacity was evaluated through chlorophyll fluorescence parameters and leaf reflectance indices. We found that all fluorescence parameters changed as water potential decreased and they did not completely recover after re-watering. Among the reflectance indices, the physiological reflectance index (PRI) varied similarly to fluorescence, obtaining a strong correlation with the non-photochemical quenching (NPQ). We proposed using PRI to detect the level of photosynthetic capacity in *Q. ilex*, as it is much easier-to-handle. We also concluded that intense droughts and heat stress not only might reduce photosynthetic capacity through changes in Chl fluorescence parameters during the stress period, but might also affect photosynthetic capacity once the plant water status is recovered.

Keywords: chlorophyll fluorescence; drought; water potential; *Quercus ilex*; reflectance

1. Introduction

Extreme climatic events, such as droughts and heat stress, can induce anomalies in the CO₂ fluxes between the ecosystem and the atmosphere, which may change the net carbon balance of an ecosystem [1,2]. Furthermore, the simultaneous combination of both stresses, drought and heat, entails a stronger C sink reduction than any other single extreme event [3]. Unfortunately, both stresses occur during the summer season of those areas under Mediterranean type-climates like the Mediterranean Basin [4]. In such ecosystems, climate change models also predict an increase of these extreme events [5], that would enhance water scarcity [6] leading to a higher down-regulation of net photosynthesis [7] and to a severe reduction in primary productivity [8]. Short-term consequences of this reduction are the increase of forest decline episodes [9] and, in agriculture, a more frequent use of irrigation for an affordable crop production [10]. *Quercus ilex* L., as a key tree species of the Mediterranean Basin might suffer both consequences. On the one hand this species is a well-spread

oak of the Mediterranean Basin landscape [11] being also part of the so-called “dehesa” [12]. On the other hand, the oak is commonly used as producer of edible fungi of the genus *Tuber*, well appreciated in the haute cuisine [13,14].

In order to mitigate the consequences of extreme climatic events on forest and agriculture, managers must have a better knowledge of the ecosystem by monitoring plant status [15]. In this sense, the parameter water potential (Ψ) [16,17] is globally used to characterized plant water status (e.g., [18–20]). Nevertheless, once water scarcity is over, Ψ can only show managers the recovery of plants in terms of water, leaving unknown the recovery of other physiological processes such as photosynthesis. To avoid this problem, it is important to implement monitoring along with other easy-to-handle and efficient methods.

The development of hyperspectral remote sensing has enabled the use of leaf reflectance signals, both to estimate the leaf water concentration [21] and to quantify leaf chemistry in vegetation [22–24]. In this way, changes in reflectance indices such as the physiological reflectance index (PRI), based on changes in de-epoxidized forms of the xanthophyll cycle molecules [25,26], have been used to detect the effect of drought stress on photosynthetic capacity [27–30]. However, other indices as the normalized difference vegetation index (NDVI) that indicate changes in the chlorophyll pigment [31] did not always show a clear correlation with plant water stress [32]. Photosynthetic capacity changes are also accompanied by the emission of chlorophyll *a* fluorescence (ChlF) that regulates the switch between an efficient sunlight utilization and a thermal dissipation state [33,34]. This phenomenon is measurable as non-photochemical quenching (NPQ) of chlorophyll fluorescence [35], which under environmental stress, is associated to the down-regulation of maximum photochemical efficiency of photosystem II (FV/FM) [32,36–38].

Taking into account that plant status can be monitored easily and efficiently in terms of both water status and photosynthetic capacity, the aim of this work was to confirm the relationship of Ψ with fluorescence and reflectance parameters in order to find the best indices related to photosynthetic capacity able to complement a more established water status measurement. The relationship was studied during an intense soil water deficit period, under extreme temperature conditions, in *Q. ilex*, a species particularly important in Mediterranean forest landscape and agriculture. Additionally, plant recovery was also investigated by measuring plant status after re-watering. We hypothesized that most of the parameters used in this study would change with a decrease in water potential. We also hypothesized that after re-watering, plant water status would be completely recovered while photosynthetic capacity, estimated through ChlF and reflectance parameters, would not be completely recovered.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Experimental Conditions

Seeds from holm oak (*Q. ilex* subsp. *rotundifolia*) (“Soria” provenance, 41°46′ N, 2°29′ W, 1074 m above sea level, Spain) were sown and cultivated in 2003 in 0.5 L containers inside a greenhouse under the same conditions with a mixture of 80% compost (Neuhaus Humin Substrat N6; Klasman-Deilmann GmbH, Geeste, Germany) and 20% perlite. After the first growth cycle, seedlings were transplanted to 25 L containers filled with the same mixture (4:1 compost:perlite) and cultivated outdoors since then at CITA de Aragón (41°39′ N, 0°52′ W, Zaragoza, Spain) under Mediterranean conditions (mean annual temperature 15.4 °C, total annual precipitation 298 mm). A slow-release fertilizer (15:9:12 N:P:K, Osmocote Plus, Sierra Chemical, Milpitas, CA, USA) was periodically added to the top 10-cm layer of substrate (3 g L^{−1} growth substrate). All plants were grown under the same environmental conditions and drip-irrigated every 2 days.

The experiment took place during the summer of 2017. Two weeks before the beginning of the experiment, ten potted plants (14 years old) were placed under a clear plastic roof that allowed the passing of 90% of PPFD (~1800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at midday, during the experiment). The use of

covers in water-stress experiments had the advantage of performing measurements in more controlled environmental conditions, avoiding re-watering by storms or unwanted rainfall events. Watering was stopped on 21 August 2017 and measurements in well-watered plants started on 22 August 2017. During the following days, measurements were performed every two or three days with increasing levels of drought stress. Drought stress was imposed during 20 days. Finally, after the last measurement under drought stressed conditions, plants were re-watered and measurements were performed again after 7 days.

Air temperature (T , °C) and relative humidity (RH, %) were measured at the experimental site using a Hobo Pro temp/RH data logger (Onset Computer, Bourne, MA, USA) located at 1.30 m above the soil surface. Measurements were recorded every 60 min during August and September of 2017. Mean diurnal (from dawn to sunset) T and RH, maximum T and minimum RH values for each day during this period are shown in Figure 1.

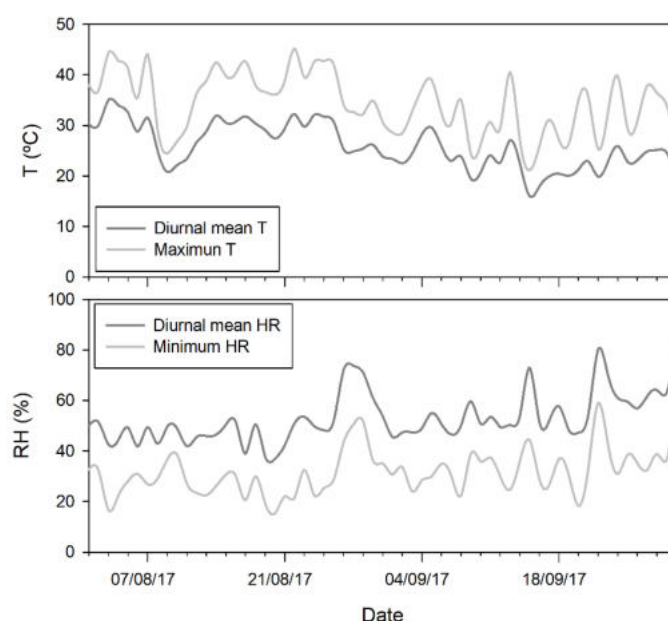


Figure 1. Atmospheric climatic conditions of the site during the experiment.

2.2. Water Potential Measurements

Predawn and midday leaf water potentials (Ψ_{PD} and Ψ_{MD} , MPa) were measured in shoots of holm oak (with leaves still attached to the shoots) with a Scholander pressure chamber following the methodological procedure described by Turner [39].

2.3. Chlorophyll Fluorescence

Chlorophyll fluorescence (ChlF) parameters were measured in fully developed current-year attached leaves of holm oak with a FMS II modulated fluorometer (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Initial ChlF in darkness (F_0) was measured at predawn by switching on the modulated light (0.6 kHz); leaf surface photosynthetic photon flux density was below $0.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maximal Chl fluorescence in darkness (F_M) was measured at predawn (20 kHz) with a 0.8-s pulse of $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light. F_0 was measured in presence of far-red light that fully oxidizes the PSII acceptor side [40,41]. The Chl fluorescence at steady-state photosynthesis (F_S) was measured at mid-morning (8 h solar time) and midday (12 h solar time), and a second pulse of high-intensity white light was used to determine the maximum ChlF in the light-adapted state (F'_M). Leaves were then covered and the minimum ChlF after illumination in presence of far-red light ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was determined (F'_0). The experimental protocol for the analysis of the ChlF quenching was essentially as described by

Genty et al. [42] with some modifications. These involved the measurements of F_0 and F'_0 , which were measured in presence of far-red light ($7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in order to fully oxidize the PSII acceptor side [40,41]. The dark-adapted, maximum potential PSII efficiency was calculated as F_V/F_M [43,44]. The actual (ϕ_{PSII}) and intrinsic (ϕ_{exc}) PSII efficiency were calculated as $(F'_M - F_S)/F'_M$ and F'_V/F'_M , respectively [42,45]. Photochemical quenching (qP) was calculated as $(F'_M - F_S)/F'_V$ according to van Kooten and Snel [46]. NPQ was calculated as $(F_M/F'_M) - 1$ [47].

2.4. Spectral Reflectance

Leaf reflectance was measured at mid-morning (8 h solar time) and midday (12 h solar time) in fully developed current-year attached leaves of holm oak with a visible/near-infrared spectroradiometer USB-2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). A bifurcated fiber optic cable was connected to the spectroradiometer into one end and to a tungsten halogen light source LS-1-LL (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) into the other end. Leaf reflectance was expressed as spectral reflectance after standardization with white standard (Spectralon, Labsphere, North Sutton, NH, USA). Integration time was 200 ms. The physiological reflectance index (PRI) was calculated as $(R_{531} - R_{570})/(R_{531} + R_{570})$, where R_{531} and R_{570} represent, respectively, the reflectance at 531 and 570 nm [31,48,49]. The normalized difference vegetation index (NDVI) was calculated as $(R_{750} - R_{705})/(R_{750} + R_{705})$, where R_{750} and R_{705} represent, respectively, the reflectance at 750 and 705 nm [50,51]. The water index (WI) was calculated as R_{970}/R_{900} , where R_{970} and R_{900} represent, respectively, the reflectance at 970 and 900 nm [52,53]. The first derivate spectra were used to study the wavelength of the red-edge position [54,55].

2.5. Statistical Analysis

Data are expressed as means $\pm$ standard error of at least five single measurements, each one made on a different plant. Student's *t*-tests were used to compare the values measured for well-watered plants before the drought period and those measured 7 days after plants were re-watered. Values were considered statistically different when *p*-values were lower than 0.05. All statistical analyses were performed with SAS version 8.0 (SAS, Cary, NC, USA).

Data have been deposit in citaREA. The handle number is <http://hdl.handle.net/10532/4065> and data are available online at <https://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/4065/1/Data.xlsx>.

3. Results

3.1. Water Potential

Plants started the water deficit period with a predawn water potential (Ψ_{PD}) mean value of -0.1 ± 0.0 MPa. At this well-watered state, midday water potential (Ψ_{MD}) mean value was -2 ± 0.2 MPa. At the end of the dry period, plants reached Ψ_{PD} and Ψ_{MD} mean values of -7.0 ± 0.2 and -7.5 ± 0.2 MPa respectively. Seven days after plant re-watering Ψ_{PD} and Ψ_{MD} returned to less negative Ψ mean values, i.e., -0.6 ± 0.2 and -1.7 ± 0.4 MPa respectively, recovering the well-watered status.

3.2. Chlorophyll Fluorescence Parameters

The maximum potential PSII efficiency (F_V/F_M) had an initial mean value of 0.81 ± 0.00 that remained constant from $\Psi_{\text{PD}} = -0.1$ to -3.0 MPa (Figure 2). Below -3.0 MPa, F_V/F_M started to decrease reaching a mean value of 0.48 ± 0.04 at $\Psi_{\text{PD}} = -7$ MPa. After plant re-watering, F_V/F_M mean value sifted up to 0.75 ± 0.01 , value that was statistically different ($p < 0.05$) to the one measured at the beginning of the dry period when plants had a $\Psi_{\text{PD}} = -0.1$ MPa.

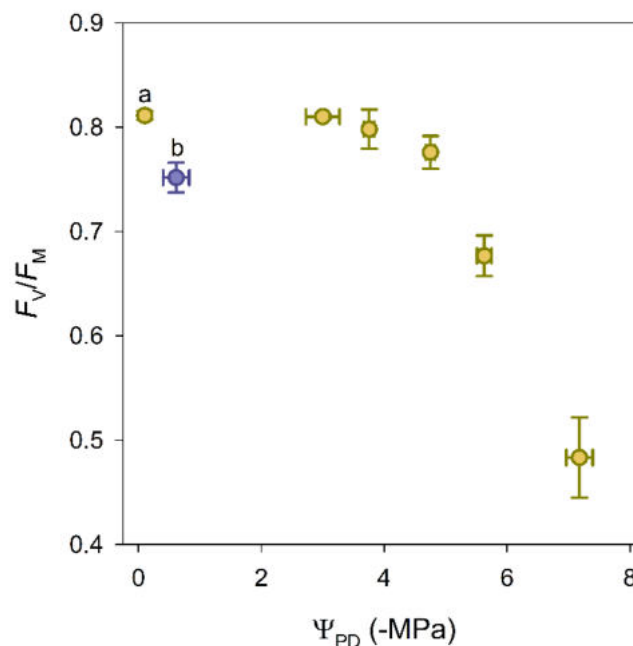


Figure 2. Relationship of predawn shoot water potential (Ψ_{PD}) with the maximum potential PSII efficiency (F_V/F_M). Yellow and violet circles are mean values $\pm$ SE ($n \geq 5$) measured during the water deficit period and after re-watering, respectively. Lowercase letters on top of the first yellow and violet mean points indicate statistically significant differences (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Mean values of actual (ϕ_{PSII}) and intrinsic (ϕ_{exc}) PSII efficiency and photochemical quenching (qP) measured at mid-morning were constant between $\Psi_{PD} = -0.1$ and -3.0 MPa. From -3.0 MPa to -7.0 MPa, the three parameters decreased: ϕ_{PSII} decreased from 0.48 ± 0.05 to 0.06 ± 0.01 , ϕ_{exc} from 0.56 ± 0.06 to 0.21 ± 0.02 and qP decreased from 0.84 ± 0.03 to 0.31 ± 0.04 (Figure 3). At midday, the relation between Ψ_{MD} and these parameters, showed a continuous decrease of their mean values along the water potential range observed (from -2 to -7.5 MPa): ϕ_{PSII} decreased from 0.51 ± 0.00 to 0.08 ± 0.00 , ϕ_{exc} from 0.59 ± 0.02 to 0.16 ± 0.03 and qP decreased from 0.87 ± 0.02 to 0.48 ± 0.04 (Figure 3). Mean values of ϕ_{PSII} and qP after re-watering shifted up, both at mid-morning and midday, reaching mean values above 0.2 and 0.5, respectively. On contrary, ϕ_{exc} did not show any recovery. Concerning the relations between Ψ and the non-photochemical quenching (NPQ), there were also no changes in the mean values of NPQ in the first sections of the curves (from $\Psi_{PD} = -0.1$ to -3.0 MPa and from $\Psi_{MD} = -2.0$ to -4.0 MPa) both measured at mid-morning and at midday. In the second sections (below $\Psi_{PD} = -3.0$ MPa and $\Psi_{MD} = -4.0$ MPa), mean values of NPQ increased from 1.2 ± 0.3 to 4.9 ± 0.6 at mid-morning and from 3.1 ± 0.0 to 6.1 ± 0.8 at midday. After plant re-watering, mean values of NPQ shifted down to 4.3 ± 0.3 at mid-morning and to 5.0 ± 0.7 at midday (Figure 3). Recovery values of these fluorescence parameters (excluding qP measured at midday) were statistically different ($p < 0.05$) to the ones measured at the beginning of the experiment (Figure 3).

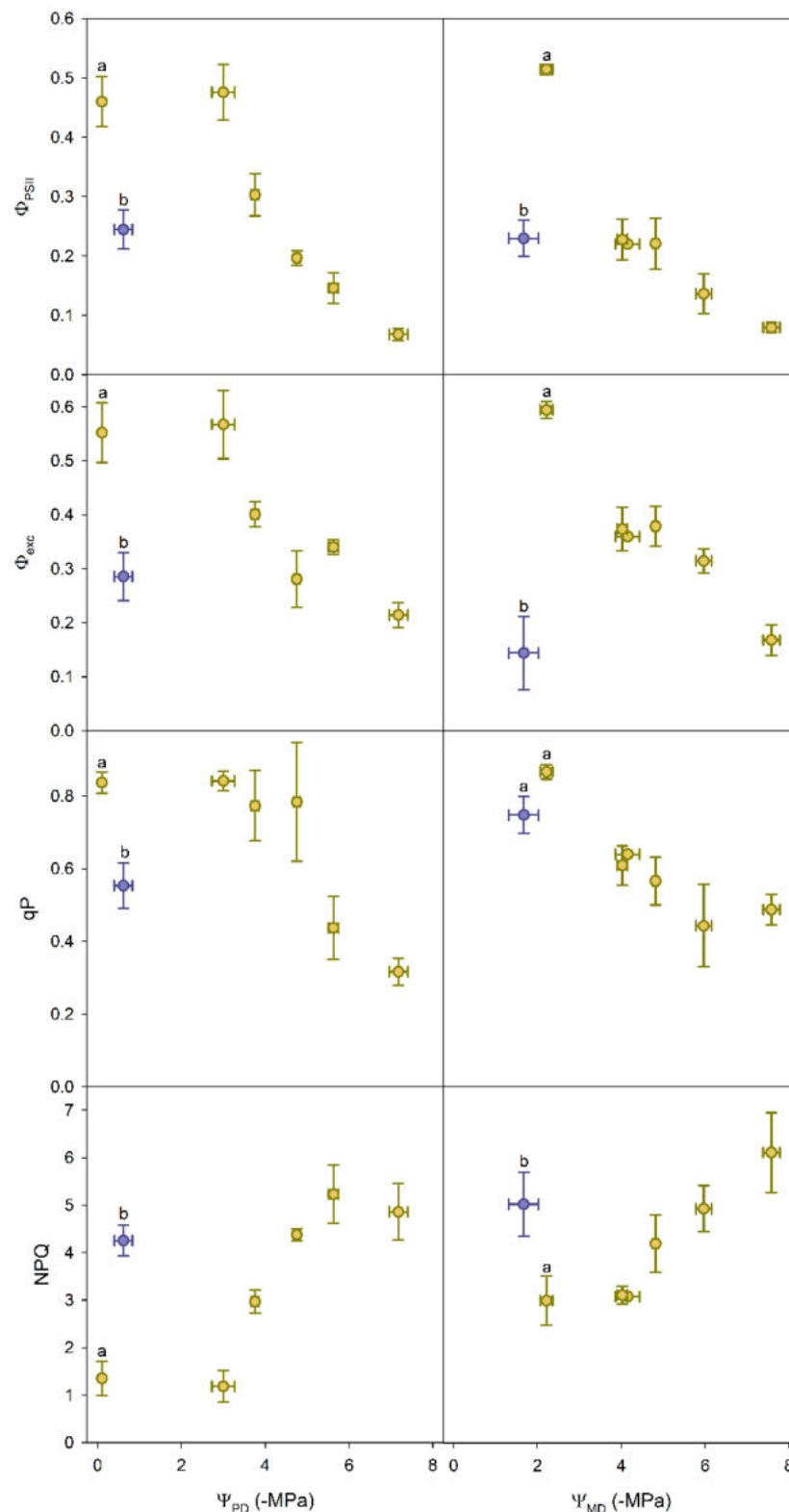


Figure 3. Relationships of predawn and midday shoot water potential (Ψ_{PD} , Ψ_{MD}) with chlorophyll fluorescence (ChlF) parameters: Actual (Φ_{PSII}) and intrinsic (Φ_{exc}) PSII efficiency, photochemical quenching (qP) and non-photochemical quenching (NPQ). ChlF parameters measured during mid-morning were associated to Ψ_{PD} , while those measured at midday were related to Ψ_{MD} . Yellow and violet circles are mean values $\pm$ SE ($n \geq 5$) measured during the soil water deficit period and after re-watering, respectively. Lowercase letters on top of the first yellow and violet mean points indicate statistically significant differences (Student's t -test, $p < 0.05$).

3.3. Reflectance Indices

The physiological reflectance index (PRI) measured at mid-morning remained constant from a well-hydrated state ($\Psi_{PD} = -0.1$ MPa) to a value of Ψ_{PD} c.a. -3.0 MPa. Below this Ψ_{PD} value, PRI measured at mid-morning dropped from 0.01 ± 0.00 to -0.02 ± 0.00 , value that remained constant at more negative values of Ψ_{PD} . PRI measured at midday followed a similar pattern: a constant mean value of 0.01 ± 0.01 from -2.0 to -4.0 MPa and a drop to c.a. -0.04 ± 0.01 at $\Psi_{MD} = -7.5$ MPa (Figure 4). After plant re-watering both mid-morning and midday PRI mean values were -0.02 ± 0.01 , values statistically different ($p < 0.05$) to those measured at the beginning of the dry period.

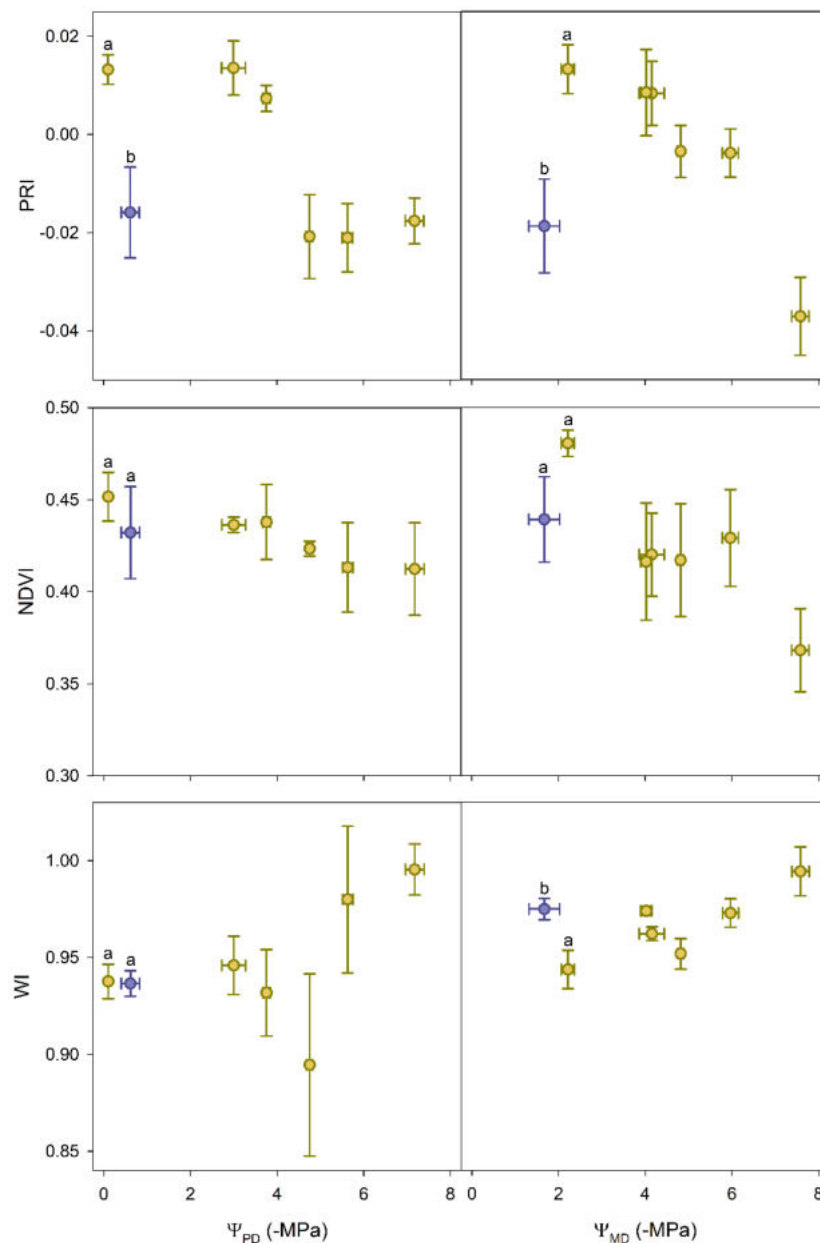


Figure 4. Relationships of predawn and midday shoot water potential (Ψ_{PD} , Ψ_{MD}) with reflectance indices: physiological reflectance index (PRI), normalized difference vegetation index (NDVI) and water index (WI). Reflectance indices measured during mid-morning were associated to Ψ_{PD} , while those measured at midday were related to Ψ_{MD} . Yellow and violet circles are mean values $\pm$ SE ($n \geq 5$) measured during the soil water deficit period and after re-watering, respectively. Lowercase letters on top of the first yellow and violet mean points indicate statistically significant differences (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

The normalized difference vegetation index (NDVI) at mid-morning slightly decreased from a mean value of 0.45 ± 0.01 (at $\Psi_{PD} = -0.1$ MPa) to 0.41 ± 0.02 (at $\Psi_{PD} = -7.0$ MPa). The decrease at midday was a bit more remarkable falling from 0.48 ± 0.01 to 0.37 ± 0.02 . Mean values after re-watering reached 0.43 ± 0.02 both at mid-morning and at midday (Figure 4). These values were not statistically different ($p < 0.05$) to those measured at the beginning of the dry period.

The mean value of water index (WI) slightly increased towards lower values of Ψ from 0.94 ± 0.01 to 0.99 ± 0.01 , both at mid-morning and at midday. After plant re-watering, mean values of WI were

0.94 ± 0.01 at mid-morning (not statistically different to the one measured at $\Psi_{PD} = 0.1$, $p < 0.05$) and 0.97 ± 0.01 at midday (statistically different to the one measured at $\Psi_{PD} = 0.1$, $p < 0.05$).

Finally, the red-edge position did not show any variation with changes in water potential (data not shown).

4. Discussion

4.1. Response to Water Scarcity

The enhanced levels of soil water scarcity imposed in this study caused a severe reduction in shoot water potential, both at predawn (Ψ_{PD}) and at midday (Ψ_{MD}), reaching values close to those found in natural stands during summer drought [56]. This reduction in has been successfully related to the variation of several chlorophyll fluorescence (ChlF) parameters (maximum potential PSII efficiency (F_V/F_M); the actual (ϕ_{PSII}) and intrinsic (ϕ_{exc}) PSII efficiency; photochemical (qP) and non-photochemical (NPQ)), confirming similar results found in previous studies [32,57]. As these fluorescence parameters can be considered a proxy of the photosynthesis capacity [33,34], the Ψ_{PD} value from which the parameters started to change (c.a. -3 MPa) could be the threshold from which CO_2 assimilation rates of *Q. ilex* could significantly decreased, reducing the primary productivity and inducing anomalies in the tree–atmosphere CO_2 fluxes [1,2]. In fact, Peguero et al. [58] measured negligible CO_2 assimilation rates at -3 MPa for *Q. ilex*, showing also similar results in F_V/F_M , ϕ_{PSII} and qP. This threshold, obtained with fluorescence parameters, was also detected in *Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa* [57], which initial decrease in F_V/F_M also matched the beginning of negligible CO_2 assimilation rates. However, F_V/F_M in *Quercus suber* did not show a clear variation with Ψ_{PD} [58], which implies that not always Chl fluorescence parameters worked as photosynthesis capacity proxies.

Changes in ChlF have also been related to changes in reflectance indices in previous studies [31,49,59,60]. Our investigation confirmed such relation as we found an increase in the values of NPQ with a decrease in the physiological reflectance index (PRI) during the progressive increment in water scarcity ($R^2 = 0.80$, $p < 0.05$, Figure 5). Other works have also found good correlations between PRI and NPQ for *Vitis vinifera* [61] and *Quercus coccifera* [31]. This relation can be expected because both parameters reflect in many cases photoprotection processes related to pH and/or de-epoxidation of the xanthophyll cycle [49]. In fact, PRI has been directly correlated with various photosynthetic-related variables [62–64]. Due to the relationship in Figure 5, the variation of Ψ_{PD} with PRI was similar to those found for the ChlF parameters, including the detection of the same threshold point at $\Psi_{PD} = -3$ MPa (Figure 4). Variations in PRI with changes in holm oak water status have been also found in Tsonev et al. [64] and Zhang et al. [32]. However, these authors stated that values of PRI at severe drought remained quite stable. Our results confirmed partially this statement as PRI values measured at mid-morning remained constant below c.a. $\Psi_{PD} = -4.5$ while PRI measured at midday continued decreasing (Figure 4). The other reflectance indices used in this study (normalized difference vegetation index (NDVI); water index (WI); red-edge position) showed weaker and noisier relationships with Ψ . Furthermore, these indices did not show correlations with fluorescence parameters (data not shown), indicating a worse relation with photosynthesis capacity. In fact, previous studies in holm oak showed that WI was not very sensitive to changes in leaf water content during the first steps of the drying process [21] and NDVI was not correlated with leaf-level net photosynthesis rates [32,65]. On contrary, red edge measured in pine was strongly correlated with chlorophyll concentration [66] and it was able to distinguish healthy pines from those undergoing decline [67]. Despite of NDVI and position of red edge to be highly related to changes in chlorophyll concentration [54,55,68], the lack of drought-induced changes in Chl concentration showed in *Q. ilex*, (as reported by Peguero-Pina et al. [58]), may help to explain the lack of relationship between NDVI and the red-edge position with fluorescence parameters.

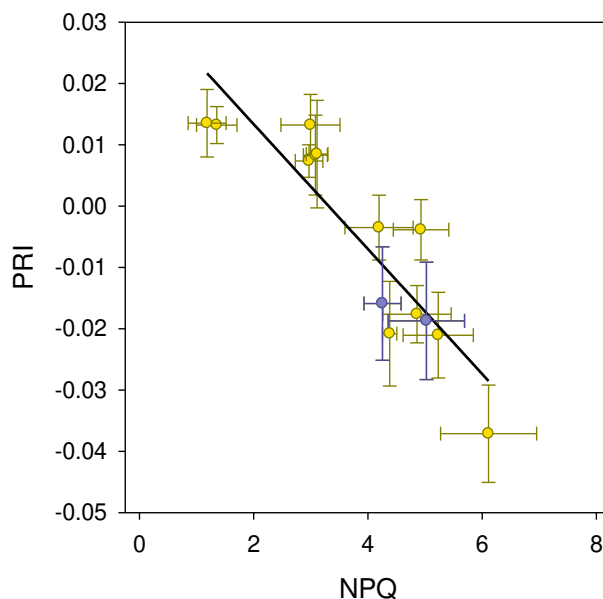


Figure 5. Relationship between mean values ($\pm$ SE) of the non-photochemical quenching (NPQ) and the physiological reflectance index (PRI) measured along the water scarcity period (yellow) and after re-watering (violet). Mid-morning and midday mean values are both included.

4.2. Recovery from Water Scarcity

The level of drought stress imposed in this study can induce in *Q. ilex* an 80% loss of xylem conductivity [69]. In spite of this possible loss, Ψ after re-watering indicated a complete recovery of plant water status, consistent with other species in previous reports [57,69–71]. On contrary, the photosynthetic capacity, estimated through Chl fluorescence parameters, did not show a complete recovery, indicating a possible reduction in the CO_2 fixation rates after drought stress. With respect to this, Galmés et al. [72] also showed a net photosynthesis partial recovery in 10 other Mediterranean plant species after a severe drought. Concerning the reflectance indices, the partial recovery of PRI was similar to the partial recovery of NPQ, supporting the relation found in Figure 5. The other reflectance indices (NDVI, WI, red-edge) showed in most cases a complete recovery, probably due to their lower change, confirming again the lack of relationship with Chl fluorescence parameters previously found during the drought period.

The non-recovery of ChlF activity after an intense water stress event in the evergreen *Q. ilex* might imply, not only a reduction in primary productivity during the stress event, but also a reduction after the stress event when plants were water recovered. Water efficiency of the ecosystem in these cases will be very low and the income flux of CO_2 would be reduced until a new leaf growth.

5. Conclusions

Chlorophyll fluorescence parameters, as estimators of photosynthetic capacity, varied with a decrease in water potential during a drought-simulated period in *Quercus ilex*. One of these parameters, the non-photochemical quenching (NPQ), was correlated with the physiological reflectance index (PRI), which values also changed with the increase of water scarcity. Both parameters had a threshold point around -3 MPa that might indicate the beginning of negligible net photosynthesis rates. After re-watering, plant water status was completely restored while fluorescence parameters and PRI did not recover the initial values. That is, intense droughts and heat stress not only might reduce the photosynthetic capacity of holm oak during the stress period, but also might affect the photosynthetic capacity once the plant water status is recovered. Taking into account that PRI showed the same trend than ChlF parameters and that measuring PRI is much easier-to-handle than ChlF,

we propose to use PRI to detect the level of photosynthesis capacity in *Q. ilex*, and in this way, to complement the measurements of Ψ during drought events.

Author Contributions: D.S.K., O.M., E.G.P. and J.J.P.P. conceived and designed the experiments; D.S.K., J.J.P.P. and O.M. performed the experiments; J.J.P.P. and O.M. analyzed the data; D.S.K. wrote the initial draft; All authors contributed to the discussion of the results and to the writing of the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) grant number RTA2015-00054-C02-01 and by Gobierno de Aragón grant number PETRA R+D PLATEA FITE 2017. Research of D. S. K. is supported by a DOC INIA-CCAA contract co-funded by INIA and European Social Fund.

Acknowledgments: Authors thank Ernesto Ruíz for his valuable work during the experiment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Reichstein, M.; Bahn, M.; Ciais, P.; Frank, D.; Mahecha, M.D.; Seneviratne, S.I.; Zscheischler, J.; Beer, C.; Buchmann, N.; Frank, D.C.; et al. Climate extremes and the carbon cycle. *Nature* **2013**, *500*, 287–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Frank, D.; Reichstein, M.; Bahn, M.; Frank, D.; Mahecha, M.D.; Smith, P.; Thonicke, K.; van der Velde, M.; Vicca, S.; Babst, F.; et al. Effects of climate extremes on the terrestrial carbon cycle: concepts, processes and potential future impacts. *Glob. Change Biol.* **2015**, *2*, 2861–2880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Von Buttlar, J.; Zscheischler, J.; Rammig, A.; Sippel, S.; Reichstein, M.; Knohl, A.; Jung, M.; Menzer, O.; Altaf Arain, M.; Buchmann, N.; et al. Impacts of droughts and extreme-temperature events on gross primary production and ecosystem respiration: A systematic assessment across ecosystems and climate zones. *Biogeosciences* **2018**, *15*, 1293–1318. [[CrossRef](#)]
4. Gil-Pelegrín, E.; Saz, M.A.; Cuadrat, J.M.; Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D. Oaks under mediterranean-type climates: functional response to summer aridity. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*, 1st ed.; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 137–194. ISBN 978-3-319-69098-8.
5. García-Mozo, H.; Mestre, A.; Galán, C. Phenological trends in southern Spain: A response to climate change. *Agric. For. Meteorol.* **2010**, *150*, 575–580. [[CrossRef](#)]
6. Iglesias, A.; Garrote, L.; Flores, F.; Moneo, M. Challenges to manage the risk of water scarcity and climate change in the Mediterranean. *Water Resour. Manag.* **2007**, *21*, 775–788. [[CrossRef](#)]
7. Farquhar, G.D.; Sharkey, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1982**, *33*, 317–345. [[CrossRef](#)]
8. Ciais, P.; Reichstein, M.; Viovy, N.; Granier, A.; Ogee, J.; Allard, V.; Aubinet, M.; Buchmann, N.; Bernhofer, C.; Carrara, A.; et al. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **2005**, *437*, 529–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rodríguez-Calcerrada, J.; Sancho-Knapik, D.; Martin-StPaul, N.K.; Limousin, J.M.; McDowell, N.G.; Gil-Pelegrín, E. Drought-induced oak decline-Factors involved, physiological dysfunctions, and potential attenuation by forestry practices. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*, 1st ed.; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 419–451. ISBN 978-3-319-69098-8.
10. Chaves, M.M.; Santos, T.P.; Souza, C.R.; Ortuño, M.F.; Rodrigues, M.L.; Lopes, C.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Ann. Appl. Biol.* **2007**, *150*, 237–252. [[CrossRef](#)]
11. De Rigo, D.; Caudullo, G. *Quercus ilex* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species*; San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., Eds.; Publication Office of the European Union: Luxembourg, 2016; pp. 130–131. ISBN 978-92-79-36740-3.

12. Rodríguez-Estevez, V.; Sanchez-Rodriguez, M.; Arce, C.; García, A.R.; Perea, J.M.; Gomez-Castro, A.G. Consumption of acorns by finishing iberian pigs and their function in the conservation of the Dehesa Agroecosystem. In *Agroforestry for Biodiversity and Ecosystem Services—Science and Practice*; Kaonga, M., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2012; pp. 1–22. ISBN 978-953-51-0493-3.
13. Reyna, S.; García-Barreda, S. Black truffle cultivation: A global reality. *For. Syst.* **2014**, *23*, 317–328. [[CrossRef](#)]
14. Gil-Pelegrín, E.; Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D. Oaks and people: a long journey together. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*, 1st ed.; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 1–11. ISBN 978-3-319-69098-8.
15. Sancho-Knapik, D.; Gómez Álvarez-Arenas, T.; Peguero-Pina, J.J.; Gil-Pelegrín, E. Air-coupled broadband ultrasonic spectroscopy as a new non-invasive and non-contact method for the determination of leaf water status. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 1385–1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Barrs, H.D. Determination of water deficits in plant tissues. In *Water Deficits and Plant Growth*; Kozlowski, T.T., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1968; Volume 1, pp. 235–368.
17. Slavík, B. *Methods of Studying Plant Water Relations*; Springer: Berlin, Germany, 1974; ISBN 3-540-06686-1.
18. Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D.; Martín, P.; Saz, M.A.; Gea-Izquierdo, G.; Cañellas, I.; Gil-Pelegrín, E. Evidence of vulnerability segmentation in a deciduous Mediterranean oak (*Quercus subpyrenaica* E. H. del Villar). *Trees* **2015**, *29*, 1917–1927. [[CrossRef](#)]
19. Sancho-Knapik, D.; Medrano, H.; Peguero-Pina, J.J.; Mencuccini, M.; Fariñas, M.D.; Gómez Álvarez-Arenas, T.; Gil-Pelegrín, E. The application of leaf ultrasonic resonance to *Vitis vinifera* L. suggests the existence of a diurnal osmotic adjustment subjected to photosynthesis. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sancho-Knapik, D.; Sanz, M.A.; Peguero-Pina, J.J.; Niinemets, Ü.; Gil-Pelegrín, E. Changes of secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. needles under increasing soil water deficit. *Ann. For. Sci.* **2017**, *74*, 24. [[CrossRef](#)]
21. Peñuelas, J.; Llusia, J.; Pinol, J.; Filella, I. Photochemical reflectance index and leaf photosynthetic radiation-use-efficiency assessment in Mediterranean trees. *Int. J. Remote Sens.* **1997**, *18*, 2863–2868. [[CrossRef](#)]
22. Gitelson, A.; Merzlyak, M.N. Signature analysis of leaf reflectance spectra: algorithm development for remote sensing of chlorophyll. *J. Plant. Physiol.* **1996**, *148*, 494–500. [[CrossRef](#)]
23. Huang, Z.; Turner, B.J.; Dury, S.J.; Wallis, I.R.; Foley, W.J. Estimating foliage nitrogen concentration from HYMAP data using continuum removal analysis. *Remote. Sens. Environ.* **2004**, *93*, 18–29. [[CrossRef](#)]
24. Asner, G.P.; Carlson, K.M.; Martin, R.E. Substrate age and precipitation effects on Hawaiian forest canopies from spaceborne imaging spectroscopy. *Remote. Sens. Environ.* **2005**, *98*, 457–467. [[CrossRef](#)]
25. Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **1990**, *94*, 607–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ruban, A.V.; Young, A.J.; Horton, P. Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. *Plant Physiol.* **1993**, *102*, 741–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vicca, S.; Balzarolo, M.; Filella, I.; Granier, A.; Herbst, M.; Knohl, A.; Longdoz, B.; Mund, M.; Nagy, Z.; Pintér, K.; et al. Remotely-sensed detection of effects of extreme droughts on gross primary production. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dobrowski, S.Z.; Pushnik, J.C.; Zarco-Tejada, P.J.; Ustin, S.L. Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sens. Environ.* **2005**, *97*, 403–414. [[CrossRef](#)]
29. Sun, P.; Wahbi, S.; Tsonev, T.; Haworth, M.; Liu, S.; Centritto, M. On the use of leaf spectral indices to assess water status and photosynthetic limitations in *Olea europaea* L. during water-stress and recovery. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Moreno, A.; Maselli, F.; Gilabert, M.A.; Chiesi, M.; Martínez, B.; Seufert, G. Assessment of MODIS imagery to track light-use efficiency in a water-limited Mediterranean pine forest. *Remote Sens. Environ.* **2012**, *123*, 359–367. [[CrossRef](#)]

31. Peguero-Pina, J.J.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrín, E.; Moya, I. Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* **2008**, *156*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhang, C.; Preece, C.; Filella, I.; Farré-Armengol, G.; Peñuelas, J. Assessment of the response of photosynthetic activity of mediterranean evergreen oaks to enhanced drought stress and recovery by using PRI and R690/R630. *Forests* **2017**, *8*, 386. [[CrossRef](#)]
33. Horton, P.; Ruban, A.V.; Walters, R.G. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 655–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Krause, G.; Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 313–349. [[CrossRef](#)]
35. Briantais, J.M.; Vernet, C.; Picaud, M.; Krause, G.H. A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *548*, 128–138. [[CrossRef](#)]
36. Demmig-Adams, B.; Adams, W.W. Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* **2006**, *172*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Porcar-Castell, A. A high-resolution portrait of the annual dynamics of photochemical and non-photochemical quenching in needles of *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* **2011**, *143*, 139–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Verhoeven, A. Sustained energy dissipation in winter evergreens. *New Phytol.* **2014**, *201*, 57–65. [[CrossRef](#)]
39. Turner, N.C. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.* **1988**, *9*, 289–308. [[CrossRef](#)]
40. Belkhodja, R.; Morales, F.; Quílez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res.* **1998**, *56*, 265–276. [[CrossRef](#)]
41. Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J. Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in iron deficient sugar beet leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **1998**, *25*, 403–412. [[CrossRef](#)]
42. Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *990*, 87–92. [[CrossRef](#)]
43. Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.* **1991**, *97*, 886–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Abadía, J.; Morales, F.; Abadía, A. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil* **1999**, *215*, 183–192. [[CrossRef](#)]
45. Harbinson, J.; Genty, B.; Baker, N.R. Relationship between the quantum efficiencies of Photosystems I and II in pea leaves. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 1029–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Van Kooten, O.; Snel, J.H.F. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* **1990**, *25*, 147–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bilger, W.; Björkman, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* **1990**, *25*, 173–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gamon, J.A.; Serrano, L.; Surfus, J.S. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* **1997**, *112*, 492–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Peguero-Pina, J.J.; Gil-Pelegrín, E.; Morales, F. Three pools of zeaxanthin in *Quercus coccifera* leaves during light transitions with different roles in rapidly reversible photoprotective energy dissipation and photoprotection. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 1649–1661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gitelson, A.; Merzlyak, M.N. Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves: spectral features and relation to chlorophyll estimation. *J. Plant Physiol.* **1994**, *143*, 286–292. [[CrossRef](#)]
51. Richardson, A.D.; Berlyn, G.P. Spectral reflectance and photosynthetic properties of *Betula papyrifera* (Betulaceae) leaves along an elevational gradient on Mt. Mansfield, Vermont, USA. *Am. J. Bot.* **2002**, *89*, 88–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Peñuelas, J.; Filella, I.; Biel, C.; Serrano, L.; Savé, R. The reflectance at the 950–970 nm region as an indicator of plant water status. *Int. J. Remote Sens.* **1993**, *14*, 1887–1905. [[CrossRef](#)]

53. Peñuelas, J.; Filella, I.; Serrano, L.; Savé, R. Cell wall elasticity and Water Index (R970 nm/R900 nm) in wheat under different nitrogen availabilities. *Int. J. Remote Sens.* **1996**, *17*, 373–382. [[CrossRef](#)]
54. Filella, I.; Peñuelas, J. The red edge position and shape as indicators of plant chlorophyll content, biomass and hydric status. *Int. J. Remote Sens.* **1994**, *15*, 1459–1470. [[CrossRef](#)]
55. Gitelson, A.A.; Merzlyak, M.N.; Lichtenthaler, H.K. Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm. *J. Plant Physiol.* **1996**, *148*, 501–508. [[CrossRef](#)]
56. Limousin, J.M.; Longepierre, D.; Huc, R.; Rambal, S. Change in hydraulic traits of Mediterranean *Quercus ilex* subjected to long-term throughfall exclusion. *Tree Physiol.* **2010**, *30*, 1026–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yan, W.; Zheng, S.; Zhong, Y.; Shangguan, Z. Contrasting dynamics of leaf potential and gas exchange during progressive drought cycles and recovery in *Amorpha fruticosa* and *Robinia pseudoacacia*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrin, E. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 453–462. [[CrossRef](#)]
59. Peñuelas, J.; Piñol, J.; Ogaya, R.; Filella, I. Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970). *Int. J. Remote Sens.* **1997**, *18*, 2869–2875. [[CrossRef](#)]
60. Méthy, M. Analysis of photosynthetic activity at the leaf and canopy levels from reflectance measurements: A case study. *Photosynthetica* **2000**, *38*, 505–512. [[CrossRef](#)]
61. Evain, S.; Flexas, J.; Moya, I. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Remote Sens. Environ.* **2004**, *91*, 175–185. [[CrossRef](#)]
62. Goerner, A.; Reichstein, M.; Rambal, S. Estimation of photosynthetic light use efficiency in semi-arid ecosystems with the MODIS-derived photochemical reflectance index. In Proceedings of the 2008 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium, Boston, MA, USA, 7–11 July 2008; Volume 3, pp. 756–758.
63. Garbulsky, M.F.; Peñuelas, J.; Gamon, J.A.; Inoue, Y.; Filella, I. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies: A review and meta-analysis. *Remote Sens. Environ.* **2011**, *115*, 281–297. [[CrossRef](#)]
64. Tsonev, T.; Wahbi, S.; Sun, P.; Sorrentino, G.; Centritto, M. Gas exchange, water relations and their relationships with photochemical reflectance index in *Quercus ilex* plants during water stress and recovery. *Int. J. Agric. Biol.* **2014**, *16*, 335–341.
65. Garbulsky, M.F.; Peñuelas, J.; Ogaya, R.; Filella, I. Leaf and stand-level carbon uptake of a Mediterranean forest estimated using the satellite-derived reflectance indices EVI and PRI. *Int. J. Remote Sens.* **2013**, *34*, 1282–1296. [[CrossRef](#)]
66. Curran, P.J.; Dungan, J.L.; Gholz, H.L. Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll concentration in slash pine leaves. *Tree Physiol.* **1995**, *15*, 203–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Zarco-Tejada, P.J.; Hornero, A.; Hernández-Clemente, R.; Beck, P.S.A. Understanding the temporal dimension of the red-edge spectral region for forest decline detection using high-resolution hyperspectral and Sentinel-2a imagery. *J. Photogramm. Remote Sens.* **2018**, *137*, 134–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Wu, C.; Niu, Z.; Tang, Q.; Huang, W. Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation. *Agric. For. Meteorol.* **2008**, *148*, 1230–1241. [[CrossRef](#)]
69. Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D.; Barrón, E.; Camarero, J.J.; Vilagrosa, A.; Gil-Pelegrín, E. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.* **2014**, *114*, 301–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gallé, A.; Haldimann, P.; Feller, U. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New Phytol.* **2007**, *174*, 799–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

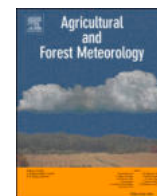
71. Martorell, S.; Diaz-Espejo, A.; Medrano, H.; Ball, M.C.; Choat, B. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 617–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Galmés, J.; Medrano, H.; Flexas, J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol.* **2007**, *175*, 81–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO 3

**Vapor pressure deficit constrains
transpiration and photosynthesis in holm oak:
A comparison of three methods during summer drought.
(Artículo publicado)**



Vapor pressure deficit constrains transpiration and photosynthesis in holm oak: A comparison of three methods during summer drought.

Domingo Sancho-Knapik^{a,b,*}, Óscar Mendoza-Herrer^a, David Alonso-Forn^a, Miguel Ángel Saz^c, Rubén Martín-Sánchez^a, José Víctor dos Santos Silva^a, Jerome Ogee^d, José Javier Peguero-Pina^{a,b}, Eustaquio Gil-Pelegrín^a, Juan Pedro Ferrio^{a,e}

^a Departamento de Sistemas Agrícolas, Forestales y Medio Ambiente (SAFMA), Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain

^b Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain

^c Departamento de Geografía y Ordenación del Territorio, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

^d UMR 1391 ISPA, INRA, Villenave d'Ornon 33140, France

^e Aragon Agency for research and development (ARAD), E-50018 Zaragoza, Spain.

ARTICLE INFO

Keywords:

Atmospheric drought
Conductance
Infrared thermometry
Photosynthesis
soil water deficit
Whole-plant chamber

ABSTRACT

High rates of vapor pressure deficit (VPD) can severely decrease plant productivity by reducing stomatal conductance, which might be exacerbated during Mediterranean summers due to soil water deficit. In this study, we monitored the response of holm oak, the archetype of Mediterranean trees, to changes in VPD during a summer drought period to evaluate the effects and consequences on gas exchange of the two water stresses (atmospheric and soil). Measurements were performed on trees growing in an experimental plantation over two summers with moderate drought stress by using three different methods: at the leaf level with an infrared gas analyzer, using a whole-plant chamber for short-term monitoring at the tree level, and measuring the canopy temperature for long-term monitoring. The three methods provided negative relationships between leaf conductance and VPD but with discrepancies probably associated with the measurement scale. Overall, the results showed that atmospheric and soil water stress had an additive effect. Under well-watered conditions, an increase in VPD was partially compensated by a reduction in stomatal conductance, resulting in a slight increase in the transpiration rates. With soil water deficit, the response to VPD resulted in a further decrease in stomatal conductance, reducing transpiration as a water saving strategy. The decrease in conductance in response to VPD was transitory, recovering to initial values as soon as the VPD decreased, both under well-watered and drought conditions. Due to this high sensitivity to atmospheric drought, the maximum carbon gain rates of holm oak were restricted to a short environmental window, which might modulate its physiological performance and natural distribution.

1. Introduction

Earth's atmosphere is experiencing a global increase in dryness as a result of a rise in atmospheric evaporative demand or the so-called water vapor pressure deficit (VPD, kPa), which is projected to further increase as climate change intensifies (Jung et al., 2010; Ficklin and Novick, 2017; Dai et al., 2018; Yuan et al., 2019; Li et al., 2021). Briefly, VPD is determined by two components: i) the water vapor holding capacity of air (saturation vapor pressure), which is proportional to temperature, and ii) vapor pressure, which is the actual amount of water vapor in the

atmosphere (Barkhordarian et al., 2019). This dependence on two standard climatic variables causes VPD to be a key parameter determining plant transpiration and ecosystem productivity (Seager et al., 2015; Ficklin and Novick, 2017; López et al., 2021). High values of VPD can reduce vegetation growth (Ding et al., 2018; Yuan et al., 2019), increase forest decline (Carnicer et al., 2013; Williams et al., 2013; Restaino et al., 2016), decrease crop yields (Lobell et al., 2014), increase wildfire incidence (Williams et al., 2014; Seager et al., 2015), or affect water and carbon ecosystem cycling (McDowell and Allen, 2015). Furthermore, these negative effects are especially relevant in arid and

* Corresponding author at: SAFMA, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, Spain.

E-mail address: dsancho@cita-aragon.es (D. Sancho-Knapik).

<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109218>

Received 25 March 2022; Received in revised form 30 September 2022; Accepted 11 October 2022

0168-1923/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

semiarid environments such as the Mediterranean areas, as plants in this type of climate not only have to regularly cope with VPD values above 4 kPa, but also with summer droughts that promote soil water deficit during the hot season (Iglesias et al., 2007; Gil-Pelegrín et al., 2017; Peguero-Pina et al., 2020).

The mechanistic basis explaining a reduction in productivity triggered by rising VPD, either alone or in combination with soil water deficit, has been associated with photosynthetic limitations resulting from decreases in stomatal conductance (g_s) (Mediavilla and Escudero, 2003, 2004; McDowell and Allen, 2015; Grossiord et al., 2020). This ability to modify g_s with changes in VPD has also been considered the predominant form of daytime gas-exchange regulation (McAdam and Brodribb, 2015, 2016). In water-limited environments, where the difference in VPD between early morning and midday could be more than 2 kPa (Bellot et al., 2002; Barradas et al., 2004), the ability to close stomata at midday could be considered a water saving strategy to prevent excessive water loss through transpiration but at the expense of reducing carbon gain (Tatarinov et al., 2016; Peguero-Pina et al., 2020).

Different methods are being used to evaluate plant transpiration and carbon gain for a certain stress, such as the use of infrared gas analyzers (von Caemmerer and Farquhar, 1981), infrared thermometry (Jones, 1999), gravimetric methods (Peguero-Pina et al., 2018) or eddy covariance (Burba, 2013). Among these methods, the measurement of the gas exchange response of single leaves with an infrared gas analyzer (IRGA) system is one of the most common techniques used due to its simplicity and ease of handling (Alonso-Forn et al., 2021; López et al., 2021). However, it has some disadvantages. First, conditions inside the chamber generally differ from the outside; hence, to monitor plant environmental responses, measurements must be made within a few seconds after closing the leaf chamber. Even when using an IRGA system with complete environmental control inside the chamber, it is not straightforward to mimic external conditions. Second, measurements are made on a single leaf and require multiple replicates to be extrapolated to the whole canopy. These problems can be solved by using a whole-plant chamber (Liu et al., 2000; Sancho-Knapik et al., 2016) that monitors the response of the entire canopy, which could differ from the response at the leaf scale (Bonan et al., 2021). The major inconvenience of this system is its complexity when monitoring large trees or its portability in uneasy accessible sites. Finally, another set of techniques includes the estimation of the response of plants to stress through near-surface remote sensing (Sancho-Knapik et al., 2010; Sancho-Knapik et al., 2018, and references therein). Among these other techniques, the use of infrared thermometry to monitor canopy temperature can be used for the estimation of stomatal conductance (Andrews et al., 1992; Jones, 1992; Sepulcre-Canto et al., 2007). This method is based on the decrease in leaf energy dissipation and the consequent rise in leaf temperature, triggered by the stomatal closure that occurs when plants are subjected to water stress (Jones, 1999). The method has been largely used to monitor crop fields as a possible aid for irrigation scheduling, but its main limitation is the need to measure or estimate several other environmental variables (Hipps et al., 1985). In particular, the leaf-to-air temperature difference depends not only on the cooling effect of transpiration but also on wind speed, surface roughness and net radiation (Jones, 1999).

In this study, we investigated the response of gas exchange to drought in holm oak (*Quercus ilex* L.), a key evergreen species of the Mediterranean Basin landscape. Holm oak is considered a drought-tolerant species but exhibits a water-saving strategy in response to both soil and atmospheric water stress when compared to other oaks, resulting in high stomatal control of water losses, as evidenced at hourly to seasonal scales (Tenhunen et al. 1981; Acherar & Rambal 1992; Mediavilla and Escudero, 2003; 2004; Aguadé et al. 2015; Peguero-Pina et al., 2020; Alonso-Forn et al. 2021). However, little is known about the short-term dynamics of stomatal response to atmospheric water stress, particularly with the interaction with soil water stress. Taking this into account, we hypothesized that the response to VPD of holm oak in terms

of stomatal conductance would be modulated by soil water conditions. Under well-watered conditions, the stomatal conductance of holm oak would be transiently reduced under atmospheric water stress, counteracting the increase in transpiration with higher VPD. Conversely, under soil water deficit conditions, the stomatal conductance (already limited by soil drought) would be comparatively less sensitive to VPD. As a consequence of the stomatal closure, we also hypothesized that atmospheric drought by itself would contribute negatively to the overall carbon balance of holm oak. For this purpose, we monitored *Q. ilex* (holm oak) trees growing in an experimental plantation (where trees receive irrigation and maintenance) over two summers with moderate drought stress by using the three methods proposed above: gas exchange at the leaf level (leaf cuvette), gas exchange at the tree level measured with a whole-plant chamber, and canopy infrared thermometry. Three main objectives were: (1) to compare and evaluate the three methods for monitoring plant responses to changes in VPD; (2) to evaluate the interaction of soil and atmospheric water stress on stomatal conductance and transpiration of *Q. ilex*; and (3) to study the consequences of both stresses on carbon gain.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental conditions and plant material

The study took place in an experimental field plot located at CITA de Aragón (41.723° N, 0.809° W, Zaragoza, Spain) during the summers of 2018 and 2019 under Mediterranean climatic conditions (mean annual temperature 15.4°C, total annual precipitation 298 mm; see annual climate patterns in Fig. S1). The experimental plot is a holm oak plantation first destined for truffle production, where the total soil depth is ca. 60 cm. Trees of *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* from this plot were 25 years old and planted in 1998 using a pattern of 6×6 m. Trees were maintained in good health conditions, were irrigated with sprinklers (35–40 L m⁻²) every week from April to September, and were pruned every two years during winter to obtain trees with homogeneous rounded-shape canopies. The tree height was ca. 3 m, the diameter of the orthogonal projection of the tree canopy ranged between 2.0 and 2.5 m, and the percentage of canopy cover on the soil surface was ca. 14%. Twice a year (during early winter and early summer), the experimental plot is cleaned mechanically, eliminating the presence of the herbaceous and shrubby stratum.

In both summers, irrigation was stopped in mid-June (prior to the monitoring) to allow drought conditions to develop. During the following weeks, plant monitoring took place at the tree level (using the plant chamber) in 2018, and at the leaf level (with the leaf cuvette) and canopy level (with the infrared thermometry) in 2019. No differences in the summer climatic patterns between 2018 and 2019 were noticed (Fig. S1). Furthermore, the same range in VPD and soil water conditions were evaluated.

Two soil water statuses were considered during the experiments: well-watered and soil water deficit conditions. The water potential threshold between them was set at -0.5 MPa, as from this value, *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* starts to close stomata, according to Alonso-Forn et al. (2021). Thus, soil under well-watered conditions referred to trees growing with a plant water potential at predawn (Ψ_{pd}) or soil water potential (SWP) between 0 and -0.5 MPa, while soil water deficit conditions (or soil water stressed conditions) were those at a Ψ_{pd} or SWP between -0.5 and -2.0 MPa. Trees experienced these moderate soil water deficit conditions during ca. 3 weeks in both the 2018 and 2019 summers.

2.2. Gas exchange measurements at the leaf level

Gas exchange measurements at the leaf level were conducted periodically during the summer of 2019 (from the beginning of July to mid-August) with an open gas exchange system (CIRAS-3, PP-Systems,

Amesbury, MA, USA) fitted with an automatic universal leaf cuvette (PLC6-U, PP-Systems, Amesbury, MA, USA). At the end of the experiment, we obtained a total of 12 measurement days: 6 days during well-watered conditions and another 6 during soil water deficit conditions. Measurements were performed in the morning (between 7:30 and 10:00 h solar time) and at midday (between 11:00 and 14:00 h) on sun-exposed, fully developed, current-year attached leaves located in the southern exposure of the lower canopy (ca. 1.30 m above ground). Three to five leaves were randomly selected and measured from each of the 3 specimens of *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* used for infrared monitoring (see Section 2.4). The sample size for each day of measurement ranged from 18 to 30 leaves (3 to 5 leaves $\times$ 2 times $\times$ 3 trees). The controlled cuvette CO₂ concentration was 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ and the saturating photosynthetic photon flux density was 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The VPD inside the leaf cuvette was set to coincide with the atmospheric value. It should be noted that setting VPD values lower than 1.5 and higher than 3.5 kPa, required several minutes and were not always reached. Prior to the gas-exchange measurements, plant water potential was measured at predawn (Ψ_{pd}) with a Scholander pressure chamber following the methodological procedure described by Turner (1988).

2.3. Gas exchange measurements at the whole-plant level

Measurements at the whole-plant level were performed in 2018 using one whole-plant chamber (described below) to monitor, one after other, 6 different specimens of *Q. ilex*. First, just after stopping the irrigation (mid-June), we monitored 4 trees under well-watered conditions in the following two weeks. Then, three weeks later (toward the end of July), 2 other trees under soil water deficit conditions were monitored. Each tree monitoring lasted 24 h. As a result, we monitored 6 trees $\times$ 24 h. Plant water potential at predawn (Ψ_{pd}) was measured the day before each tree monitoring in shoots of holm oak with a Scholander pressure chamber. The photosynthetic active radiation (PAR) was also registered with a quantum sensor QSO (Apogee Instruments, Logan, USA).

The whole-plant chamber (Fig. S2) consisted of a Teflon fluorinated ethylene propylene copolymer (FEP) film rolled and stapled into an aluminum cylindrical frame (diameter, $d = 200$ cm; height, $h = 180$ cm) ending in an open top cone (base $d = 200$ cm, $h = 100$ cm; open hole $d = 50$ cm). Teflon FEP was used because of its slow permeability to liquids and gasses and its excellent transmission (between 90 and 95%) in the infrared and visible range of the solar spectrum (Liu et al., 2000). For easier installation and portability, the chamber was built as two halves that were screwed together on a PVC base (220 $\times$ 220 cm). To accommodate the trunk and the air inlet tubes, we made 3 circular holes in the base: one in the middle ($d = 20$ cm) for the trunk and two others ($d = 15$ cm) facing opposite corners, one for each air inlet tube. The base was also cut in half through the trunk hole opening so that it could be moved on and off the tree. A sleeve of sealed-cell foam was placed around the trunk, enabling the chamber base to compress the sleeve and form a tight seal around the stem. This design separated the tree from the soil to eliminate the effects of soil and root respiration on CO₂ determinations (Miller et al., 1996). Finally, the joining between the chamber and the base was also sealed with plastic adhesive tape to ensure maximum impermeability.

The air-supply system consisted of a semiradial tube air fan (TD-1300/250 Silent Ecowatt, Soler & Palau, Spain) with an output of 20 m³/min attached to an aluminum tube ($d = 25$ cm) that collected air from 4 m above the ground. The output side of the fan was attached to another aluminum tube ($d = 25$ cm) that was split with a "T" connector into two smaller aluminum tubes ($d = 15$ cm), each one going through each hole of the base into the chamber. Each of these tubes ended in a 1 m aluminum tube ($d = 15$ cm), placed horizontally on the base inside the chamber, and upper perforated with small holes ($d_{\text{hole}} = 0.5$ cm) for a better diffusion of the incoming air into the chamber (Fig. S2).

To monitor the tree, we simultaneously measured the CO₂

concentration and H₂O vapor in the air prior to entering the chamber and just before the open top exit using an infrared gas analyzer (CIRAS-3 DC, PP-Systems, Amesbury, MA, USA). Measurements were recorded every 5 minutes. Additionally, we calculated VPD inside the chamber by measuring air temperature and relative humidity using a Hobo Pro RH/Temp data logger (Onset Computer Bourne, MA, USA) located 1 m above the base. The VPD inside the chamber was used for further evaluation of the plant response and for statistical analysis.

We calculated tree transpiration (E , mol H₂O s⁻¹ tree⁻¹) and total conductance (g_t , mol H₂O s⁻¹ tree⁻¹) using the following equations (von Caemmerer and Farquhar, 1981):

$$E = \frac{W \times (e_{\text{out}} - e_{\text{in}})}{(P - e_{\text{out}})} \quad (1)$$

$$g_t = \frac{E \times \left(P - \frac{e_{\text{leaf}} + e_{\text{out}}}{2}\right)}{(e_{\text{leaf}} - e_{\text{out}})} \quad (2)$$

where W is the mass flow of air entering the chamber (mol H₂O s⁻¹), e_{in} is the partial pressure of water vapor of reference air supplied to the cuvette (mbar), e_{out} is the partial pressure of water vapor in the air inside the chamber (mbar), P is the atmospheric pressure (mbar), and e_{leaf} is the saturated water vapor pressure inside the leaf (mbar). After obtaining g_t , we removed most of the values of g_t coinciding with values of VPD below 0.5 kPa as they had high uncertainty and resulted in aberrant values. We also calculated the net photosynthesis (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{s}^{-1} \text{tree}^{-1}$; von Caemmerer and Farquhar, 1981) as

$$A_N = (C_{\text{in}} \times W) - [C_{\text{out}} \times (W + E)] \quad (3)$$

where C_{in} and C_{out} are the CO₂ concentrations of air entering and exiting the chamber, respectively. Finally, water use efficiency (WUE, $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) and intrinsic water use efficiency (iWUE, $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) were calculated as $WUE = A_N/E$ and $iWUE = A_N/g_t$, respectively.

2.4. Canopy infrared thermometry

Infrared (IR) thermometry was used to monitor three holm oak trees during 49 consecutive summer days, from the 20th of June 2019 (with well-watered soil conditions) to the 8th of August 2019 (with soil water deficit conditions). The canopy temperature of each individual was measured with infrared thermometers (IRT 757-500, TC Ltd, Uxbridge, U.K.), custom-calibrated against a 4-wire platinum resistance thermometer (PT100) over the range 5–50°C in a high-precision water bath (Julabo FP50, Julabo GmbH, Seelbach, Germany). IR thermometer sensors were located ca. 3.5 m height from the ground, pointing down to the south-side of the upper canopy, at an angle of 45° and at a distance of 2 m from the target to cover 1 m² of the canopy surface. Air temperature, horizontal wind speed and photosynthetic active radiation (PAR) were recorded, with a 4-wire PT100 probe, a cup anemometer (Oche Control y Equipamientos S.L., Cadrete, Spain) and a quantum sensor QSO (Apogee Instruments, Logan, USA), respectively. Data from the aforementioned sensors were recorded every 30 seconds with a CR1000 datalogger (Campbell Scientifics, Logan, USA). Additionally, relative humidity was registered every 10 minutes with three Hobo Pro RH/Temp data loggers (U23-001; Onset Computer Corp., Pocasset, MA, USA). Soil water potential (SWP) was recorded every 2 minutes using 3 soil water potential sensors connected to a data logger (Teros 21/Em50, METER Group, Inc., Pullman, WA, USA) and installed below each tree canopy at a distance of 50 cm from each trunk and at 30 cm below ground, representative of the root system. Atmospheric pressure was retrieved from a meteorological station located 17 km SW from the site (Zaragoza Airport, 41° 39' 38" N; 1° 0' 15" W, 249 m.a.s.l.).

For calculations, all data were integrated at 30-minute intervals. We calculated VPD by combining temperature records from PT100, which was found to be the most reliable, and atmospheric vapor pressure, calculated from the relative humidity records. Canopy temperature

depression (CTD) was calculated as the difference between air temperature and canopy temperature. CTD is positive when the canopy is cooler than the air and negative when the canopy temperature is higher than the air temperature (i.e., canopy heating), which might occur when trees reduce or stop transpiration. Leaf transpiration (E , mol H₂O m⁻² s⁻¹) was estimated from the difference between measured canopy temperature (T_c) and modeled leaf temperature for a dry surface (T_{dry} , modeled as in Barbour et al. 2000), following the next energy balance equation (Jones, 1992):

$$E = C_p(g_{bh} + g_r)(T_{dry} - T_c)/L \quad (4)$$

where C_p is the molar specific heat constant of air at constant pressure (29.2 J mol⁻¹ K⁻¹), g_{bh} and g_r are the boundary layer (sensible) heat conductance and radiative heat conductance, respectively (in m² s⁻¹ mol⁻¹), and L is the molar heat of vaporization (44012 J mol⁻¹). For a more detailed explanation of the calculation of E using infrared thermometry, see Section 6 (Appendices A and B). The total leaf conductance (g_t , mol H₂O m⁻² s⁻¹) was then calculated according to von Caemmerer and Farquhar (1981) using Eq. (2).

2.5. Statistical analysis

To compare conductance measurements obtained with the three different methods, each single value of conductance (g^i) was standardized as $(g^i - g_{min})100/(g_{max} - g_{min})$, where g_{min} and g_{max} are the minimum and maximum conductance values, respectively, measured with well-watered soil conditions and PAR > 500 μmol m⁻² s⁻¹. Then, eventual differences across methods and water conditions in the relationship between VPD and standardized conductance were first explored with an analysis of variance (ANOVA) based on a linear model including 'method' (single leaf, plant chamber, IR thermometry), 'water' (wet, dry), log-transformed values of VPD ('logVPD'), and their interactions (built-in R functions 'lm' and 'anova'). We used log-transformed values and linear regression models as the simplest approach for testing differences in the observed (non-linear) responses. Alternative models, e.g. using untransformed variables or alternative distributions did not improve the normality of residuals, and lead to similar results (data not shown).

Nonlinear regressions between VPD and g (both measured and standardized values) were fitted using the function 'drm' from the package drc 3.0-1 (Ritz et al., 2015). After testing alternative dose-response models (e.g. exponential decay, logistic, log-logistic), we identified the log-logistic function with four parameters (self-starter function 'LL.4' in 'drm') as the function best describing the expected response across all data combinations. The advantage of using this function is that we obtained estimates of biologically meaningful parameters, which could be directly compared. In particular, for LL.4, these parameters were the slope (VPD vs. g), the upper and lower limits of g , and the effective dose 50 (ED50, namely the VPD causing a 50% reduction in g).

To characterize connections among environmental and plant variables and determine their relative importance in controlling leaf conductance, we used the IR canopy dataset to conduct a path analysis (Li, 1975). This analysis uses a path structure that consists of variables of interest with potential connectivity among the variables where the connections are based on previously well-established knowledge. Based on the variables and the connections, a set of multiple linear regression models is constructed, and the partial regression coefficients are defined as path values that indicate the causative power of each connection (Kimm et al., 2020). Structural equation models for the path analysis were fitted using the function 'sem' from package Lavaan 0.6-10 (Rosseel, 2012) and represented with the function 'semPath' (package semPlot 1.1.2; Epskamp, 2015). The model included atmospheric water vapor pressure (V_p), photosynthetic active radiation (PAR) and soil water potential (SWP) as exogenous variables, and air temperature

(T_{air} , as a function of PAR), atmospheric vapor pressure deficit (VPD, as a function of T_{air} and V_p), total conductance (g_t , as a function of VPD, PAR and SWP), and transpiration (E , as a function of g_t and VPD) as endogenous variables. To account for temporal variations in environmental drivers, path analyses were performed considering data during the entire daytime (from 6:00 to 18:00 h solar time), data from only the morning (from 6:00 to 10:00 h), data from only the midday (from 10:00 to 14:00 h), and data from only the afternoon (from 14:00 to 18:00 h).

3. Results

3.1. Time course of transpiration and stomatal conductance

The monitoring of gas exchange at the leaf level showed that during well-watered conditions (predawn water potential, $\Psi_{pd} > -0.5$ MPa), an increase in VPD from 2 to 4 kPa between the morning and midday entailed a reduction in stomatal conductance (g_s) from 0.35 to 0.15 mol H₂O m⁻² s⁻¹ with hardly any variation in leaf transpiration (E , Fig. 1). Under water deficit conditions ($-0.5 > \Psi_{pd} > -2.0$ MPa), the measured values of g_s and E decreased (Fig. 1). Moreover, increases in VPD smaller than 1 kPa between the morning and midday entailed reductions in g_s from ca. 0.15 to close to zero mol H₂O m⁻² s⁻¹ and reductions in E from ca. 3 to 1 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ (Fig. 1).

The monitoring of *Q. ilex* with the whole-plant chamber was carried out on days with a VPD and air temperature inside the chamber that exceeded 4 kPa (Fig. 2a) and 35°C, respectively, during some point of the day. It should be noted that when comparing the conditions inside

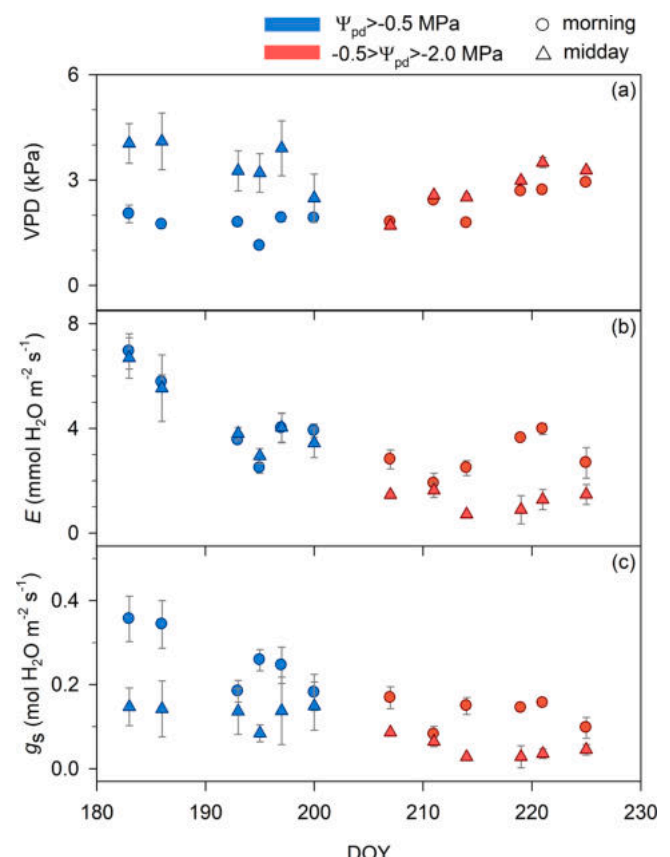


Fig. 1. Example of gas exchange monitoring at leaf level of one specimen of *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. (a) Vapor pressure deficit (VPD), (b) transpiration (E), (c) stomatal conductance (g_s). Data are mean $\pm$ se ($n = 3$ to 5 leaves). Blue shapes correspond to well-watered conditions (predawn water potential, $\Psi_{pd} > -0.5$ MPa), while red shapes correspond to water deficit conditions ($-0.5 > \Psi_{pd} > -2.0$ MPa). Circles and triangles are measurements made in the morning (8:00 to 10:00 solar time) and midday (11:00 to 14:00), respectively.

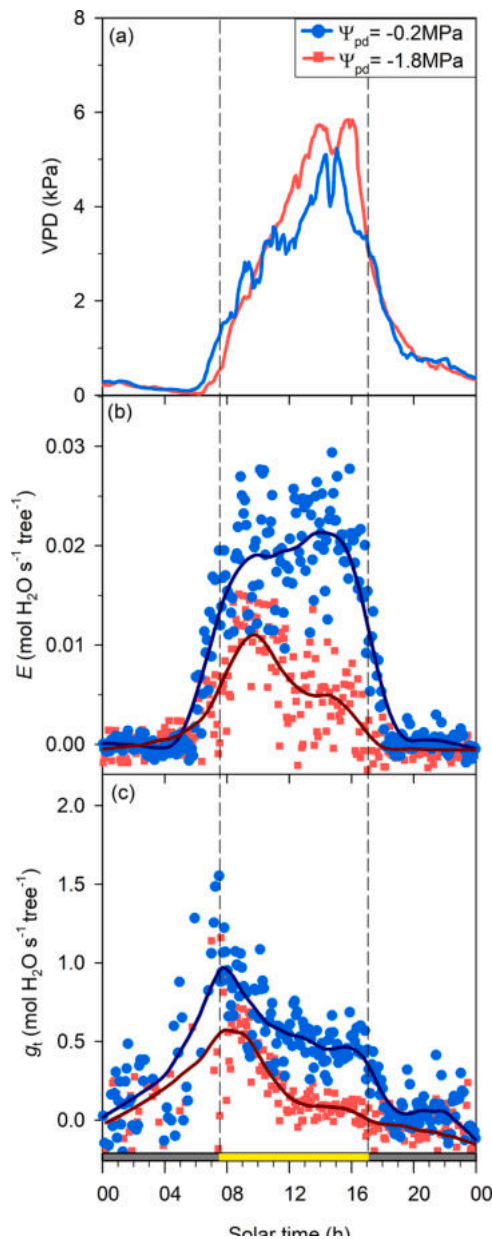


Fig. 2. Examples of one day monitoring of two different trees of *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* using a whole-plant chamber. (a) Vapor pressure deficit (VPD), (b) plant transpiration (E), (c) total conductance (g_t). Lines are a smoothing of the data points. Blue lines and circles correspond to one well-watered tree (predawn water potential, $\Psi_{pd} = -0.2$ MPa) measured at mid-June, while red lines and squares correspond to one water stressed tree ($\Psi_{pd} = -1.8$ MPa) measured at the end of July. Yellow and grey bars on the x-axis correspond to periods with a photosynthetic active radiation higher and lower than $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Dashed lines define this radiation interval period through the graphs.

the chamber against the external conditions, we noticed a significant warming effect of the air inside the chamber, especially important during the afternoon (from 13:00 to 18:00 h solar time), but without reaching extreme temperatures (Table S1). Considering the experimental conditions inside the chamber, well-watered trees (with a $\Psi_{pd} > -0.5$ MPa) showed transpiration rates (E) of approximately $0.02 \text{ mol H}_2\text{O s}^{-1} \text{ tree}^{-1}$, which remained nearly constant between 7:30 and 16:00 h solar time, concurring with a photosynthetically active radiation (PAR) higher than $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Out of this frame of time, PAR seemed to be the limiting factor, as E decreased sharply to zero with the reduction

in PAR (Figs. 2b, S3). Notably, despite the sharp increase in VPD (from ca. 3 to 5 kPa), we found only a slight increase in E during the afternoon. In contrast, the total conductance (g_t) for well-watered trees decreased during the day from maximum values recorded in the early morning (ca. 7:30 h solar time; Fig. 2c). Concerning the water-stressed trees (with a Ψ_{pd} between -0.5 and -2 MPa), we clearly recorded lower values of E and g_t than for well-watered trees (Fig. 2). Moreover, E in drought stressed trees did not remain constant, showing a maximum value of ca. $0.010 \text{ mol H}_2\text{O s}^{-1} \text{ tree}^{-1}$ at 10:00 h with a VPD = 2 kPa, which decreased to $0.005 \text{ mol H}_2\text{O s}^{-1} \text{ tree}^{-1}$ for an increase in VPD toward 5 kPa (Figs. 2a, b). In addition, g_t in water-stressed trees also decreased as in well-watered trees, experiencing a strong reduction from early morning to midday and remaining nearly constant during the afternoon until $\text{PAR} = 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 2c).

The use of infrared thermometry to monitor holm oak canopies during the summer showed that canopy temperature depression (CTD) varied throughout the day and with drought progression. During the day, the lowest values of CTD were usually recorded at midday (12 h solar time; Fig. S4), whereas the highest values were generally recorded during the afternoon (15–18 h solar time; Fig. S4), coinciding with the maximum values of VPD (Fig. 3a). However, it should be noted that on some days, especially those under soil water deficit conditions, the CTD values during the afternoon were lower than those during the early morning (6–9 h solar time); therefore, the maximum CTD values on those days were found during the early morning (Figs. 3b, S4). Over the

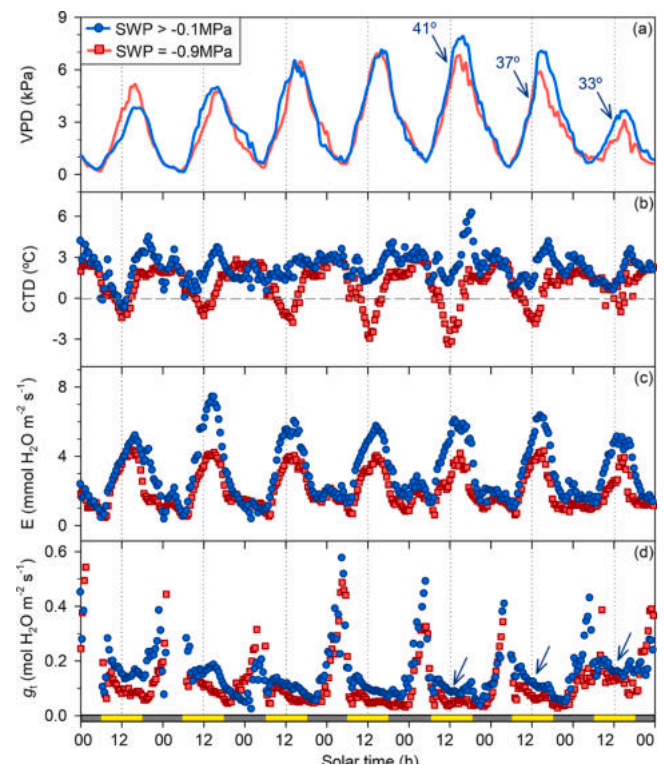


Fig. 3. Monitoring of *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* using the canopy infrared thermometry method during two heatwaves differing in soil water conditions. (a) Vapor pressure deficit (VPD), (b) canopy temperature depression (CTD), (c) plant transpiration (E), (d) total conductance (g_t). Blue lines and circles correspond to a 7-day period (day of the year 176 to 182) of one well-watered tree (soil water potential, $\text{SWP} > -0.1$ MPa, Fig. S4), while red lines and squares correspond to another 7-day period (day of the year 201 to 207) of the same tree under soil water deficit conditions ($\text{SWP} = -0.9$ MPa, Fig. S4). Yellow and grey bars on the x-axis correspond to periods with a photosynthetic active radiation higher and lower than $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Blue arrows indicate three consecutive days differing in VPD and g_t recorded at noon for well-watered conditions; air temperatures associated to each moment are indicated above arrows in (a).

season, CTD varied in accordance with changes in SWP (Fig. S4). At the beginning of the monitored period (DOY 170–190, ‘well-watered’ phase), SWP remained close to zero, and CTD remained positive most of the time (i.e., air temperature was consistently higher than the canopy temperature, Fig. S5). This was followed by a sharp decline in SWP from DOY 190 to 210 (‘soil drying’ phase), remaining under steadily low SWP from DOY 210 to 220 (‘drought’ phase). As the soil dried and the SWP became more negative, the negative values of CTD (occurring when the air temperature was lower than the canopy temperature, Fig. S5) became more frequent (Fig. S4). For example, when the SWP was -0.9 MPa, CTD remained negative at midday, reaching values up to -3 °C (Fig. 3b).

Maximum values of E estimated with the IR method were recorded every day after midday, concurring with the maximum values of VPD (Fig. 3c). At the beginning of the experiment, under well-watered soil conditions, trees showed maximum values of E between 5 and 8 mmol $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As the SWP became more negative, the maximum values of E progressively decreased to a range between 3 and 5 mmol $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3c). Concerning total conductance (g_t), we surprisingly observed maximum values of g_t around dawn (ca. 4:30 to 5:30 h, with $\text{PAR} < 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), probably due to the low values of VPD measured at that time of the day (between 0.5 and 1.0 kPa; Fig. 3) which increases the estimation error of the method. Apart from that, g_t estimated with IR when PAR was higher than $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ followed a similar pattern to g_t monitored with the whole-plant chamber, with high values generally recorded in the early morning (7:30 h solar time) that decreased as the day went by (Fig. 2d). As long as the soil became drier, the values of g_t reached lower values throughout the entire day (Fig. 3d).

It should be noted that Fig. 3 also highlights three consecutive days (indicated with arrows) with different values of g_t obtained at midday (84, 123, and 160 mmol $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), associated with three different levels of VPD (6.5, 4.4, and 3.2 kPa, respectively) and air temperature (41, 37 and 33 °C, respectively) recorded at the same time, showing an increase in g_t in accordance with a decrease in VPD.

3.2. Response of stomatal conductance to VPD and soil water deficit

The exploratory ANOVA that assessed the general response of stomatal conductance (standardized g) to log-transformed VPD showed significant differences between monitoring methods and water conditions and complex interactions (Table S2). In particular, the intercept term using the leaf chamber was significantly lower than that using the other two methods ($P=0.036$), whereas the (negative) slope in response to VPD was significantly steeper using the IR method ($P=0.040$). As expected, the intercept term was higher in well-watered plants ($P<0.001$), but the slope in response to VPD was more negative ($P<0.001$). In addition to these general patterns, the highly significant interaction terms (‘method:water’, $P=0.002$; ‘method:water:logVPD’, $P<0.001$) indicated that both the intercept and the slope differed for each ‘method x water’ combination.

When VPD was related to plant conductance (considering only those values with $\text{VPD} > 0.5$ kPa and $\text{PAR} > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), we found consistent relationships for the three methods used (Fig. 4). For well-watered trees, an increase in VPD from 1 to 5 kPa induced a reduction in stomatal conductance (g_s) measured with the leaf cuvette method from ca. 0.35 to 0.05 mol $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 4a). The same increase in

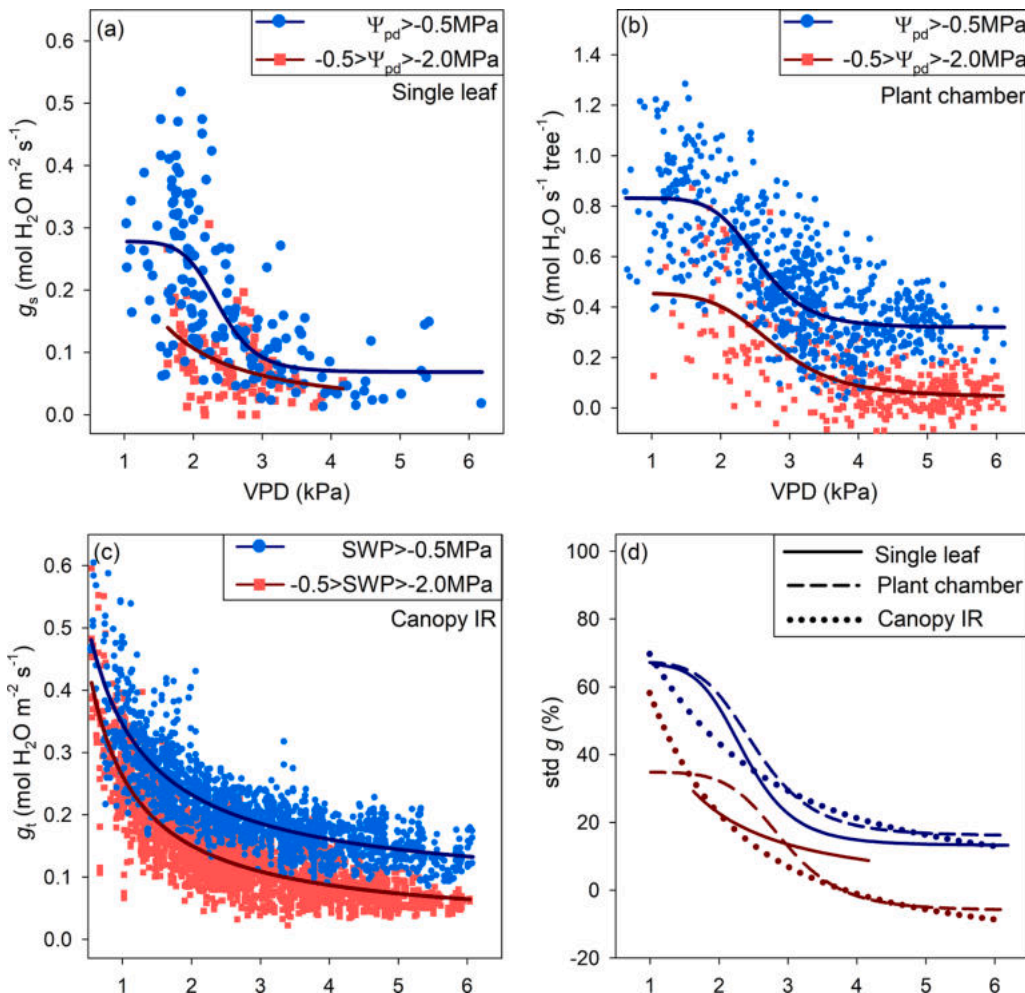


Fig. 4. Relationship between vapor pressure deficit (VPD) and stomatal conductance (g_s) or total conductance (g_t) for *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* using: (a) a single leaf cuvette ($n=3$ trees, 12 measurement days), (b) a whole-plant chamber (for well-watered conditions, $n=4$ trees, 1 measurement day each tree; for water deficit conditions, $n=2$ trees, 1 day each tree), and (c) the canopy infrared (IR) thermometry ($n=3$ trees, 49 days). The relationship between VPD and standardized leaf conductance (std g) for the three methods is shown in (d). Blue lines and circles correspond to well-watered conditions (predawn water potential, Ψ_{pd} or soil water potential SWP > -0.5 MPa), while red lines and squares correspond to soil water deficit conditions (-0.5 > Ψ_{pd} or SWP > -2.0 MPa).

VPD also resulted in a decrease in g_t measured with the other two methods: from ca. 0.95 to 0.28 mol H₂O s⁻¹ tree⁻¹ measured with the whole-plant chamber and from 0.38 to 0.15 mol H₂O m⁻² s⁻¹ for the IR thermometry (Figs. 4a,b). For soil water deficit conditions, the values of conductance obtained with the three methods were lower than those under well-watered conditions for every single value of VPD (Fig. 4). When conductance was standardized by means of the maximum and minimum values recorded for well-watered conditions, the adjusted equations of the three different methods shared similar values, although with slightly different patterns (Fig. 4d, Table 1). The IR thermometry method and the single leaf method under drought showed a quasi-exponential shape, with a progressive decline in conductance, starting from relatively low VPD values (Fig. 4d, see also Fig. 4a,c). Conversely, a plateau in conductance until VPD ≈ 2 kPa, followed by a steeper decline, was evident for the plant chamber method, as well as for the single leaf method under well-watered conditions (Fig. 4d, see also Fig. 4a,b). The parameters estimated for the log-logistic curves (Table 1) confirmed that ED50 (i.e., the value of VPD at which conductance dropped by half) was in the range of 1–3 kPa, regardless of the method and water conditions. Considering the parameter uncertainty, the highest estimates for ED50 (2.5–3.0 kPa) and slope (6.1–6.2% kPa⁻¹) were found for the plant chamber method, being significantly higher than for the IR thermometry (ED50 = 1.4–1.7 kPa; slope = 1.8–3.0% kPa⁻¹). Conversely, we did not find significant differences in ED50 and slope between well-watered and drought conditions. Only for the plant chamber method were the estimated upper and lower limits (indicative of maximum and minimum conductance) significantly higher in well-watered than in drought conditions. For the single leaf method, the uncertainties were generally large, particularly under drought conditions, thus preventing a proper statistical comparison, but still the most significant estimates were in range with the other methods.

A closer look at the response over time during three heatwaves (associated with high VPD) showed that the response to VPD was transient and very dynamic, regardless of prevailing soil water conditions (Fig. 5). The first event (DOY from 176 to 183), under well-watered conditions (circles/solid lines; Fig. 5), showed a nearly linear decline and recovery in g_t . However, this decline in the mean daytime g_t was not enough to compensate for the increase in VPD, and the mean daytime E increased from ca. 3.5 to 4.5 mmol m⁻² s⁻¹. In the second event (DOY = 199–207), during the soil drying phase (diamonds/dashed lines; Fig. 5), the increase in VPD coincided with a progressive decline in SWP, resulting in a sharper decrease in g_t and a slight decrease in E . Nevertheless, after the high-VPD event, the values of g_t recovered to values similar to the pre-event values. Finally, during the steady drought phase (DOY = 219–224; squares/dotted lines), we found a weaker decline in g_t , which resulted in nearly constant E . Notably, post-event g_t values (white square; Fig. 5) were even larger than pre-event g_t (black square),

although this could be attributed to the rather cloudy conditions before the event (only 6.4 hours with PAR > 500 μmol m⁻² s⁻¹, against 9–10 hours in the following days), which may have caused a slight light limitation.

3.3. Response of photosynthesis and water use efficiency to VPD and soil water deficit

A reduction in net photosynthesis (A_N) throughout the day associated with increases in VPD was recorded with the whole-plant method in both well-watered and water-stressed trees (Figs. 6a,b). This reduction in A_N for well-watered trees started at a VPD value of ca. 2.5 kPa, the value from which we started to record values of A_N close to zero for water-stressed trees (Fig. 6b). Concerning the water use efficiency, Fig. 6c shows a decrease in this parameter with increasing VPD. Similarly, the intrinsic water use efficiency in drought-stressed trees slightly decreased with increases in VPD (Fig. 6d). However, the intrinsic water use efficiency in well-watered trees remained constant for most of the VPD values, even though an increase from 1 to 2 kPa was detected.

3.4. Factors regulating the response to VPD and soil water deficit

The path analysis showed that both SWP and VPD had a similar effect on g_t when considering the daytime (Fig. 7). However, the effect of VPD on g_t was slightly higher than the effect of SWP during the morning and afternoon, while it was slightly lower during midday (Fig. 7). We only found a weak effect of PAR on g_t during the morning and afternoon, coinciding with the periods with partially light-limited conditions. As expected, both VPD and g_t contributed to E , but with variable proportions during the day, increasing the relative weight of g_t from morning to afternoon (Fig. 7). With regard to the link between the different environmental drivers, variations in VPD were largely driven by T_{air} , with a minor contribution of variations in V_p , particularly during the morning. In turn, variations in T_{air} during the morning were strongly coupled to the rise in PAR, but this association was weak during midday, when PAR was nearly constant, and in the afternoon, when T_{air} declined much more slowly than PAR. The three exogenous variables in the model (V_p , PAR and SWP) were independent, showing no clear associations among them.

4. Discussion

4.1. Evaluating methods to monitor plant response to VPD

In general, total leaf conductance was negatively related to rising VPD, but the variability at the local level of VPD was different across the three methods used (single leaf cuvette, whole-plant chamber and

Table 1

Parameter estimates of the log-logistic curves describing the relationship between vapor pressure deficit (VPD) and standardized conductance (as shown in Fig. 4d) for the different methods and water conditions. Ψ refers to either predawn water potential (single leaf and plant chamber) or soil water potential (IR thermometry). In bold P -values < 0.05. Parameters differing significantly (i.e. with non-overlapping confidence intervals) are indicated with asterisks (between soil water conditions) and letters (across methods).

		Watered conditions ($\Psi > -0.5$ MPa)		Drought conditions ($-0.5 > \Psi > -2.0$ MPa)	
		Estimate (95% confidence interval)	P-value	Estimate (95% confidence interval)	P-value
Single leaf	Slope	6.7 (2.3, 11.1) ^{ab}	0.003	7.3 (-1.2, 15.7) ^a	0.090
	Lower Limit	13.8 (4.1, 23.4) ^a	0.005	14.6 (11.1, 18.1) ^a	<0.001
	Upper Limit	66.8 (56.7, 76.9) ^a	<0.001	481 (-6202, 7165) ^{ab}	0.886
	ED50	2.4 (2.1, 2.6) ^{ab}	<0.001	1.1 (-1.5, 3.7) ^{ab}	0.412
Plant chamber	Slope	6.1 (4.5, 7.6) ^a	<0.001	6.2 (2.4, 10) ^a	0.001
	Lower Limit*	16.2 (13.4, 19) ^a	<0.001	1.8 (-4.1, 7.7) ^b	0.542
	Upper Limit*	67.4 (63.7, 71.1) ^a	<0.001	35.4 (30.4, 40.5) ^a	<0.001
	ED50	2.5 (2.4, 2.6) ^a	<0.001	3 (2.7, 3.4) ^b	<0.001
IR thermometry	Slope	1.8 (0.9, 2.6) ^b	<0.001	3 (1.9, 4) ^a	<0.001
	Lower Limit	4.9 (-5.1, 14.7) ^a	0.341	5 (1, 9) ^b	0.015
	Upper Limit	92.9 (62, 123.8) ^a	<0.001	74.3 (52.5, 96.6) ^b	<0.001
	ED50	1.7 (1.2, 2.3) ^b	<0.001	1.4 (1.1, 1.7) ^a	<0.001

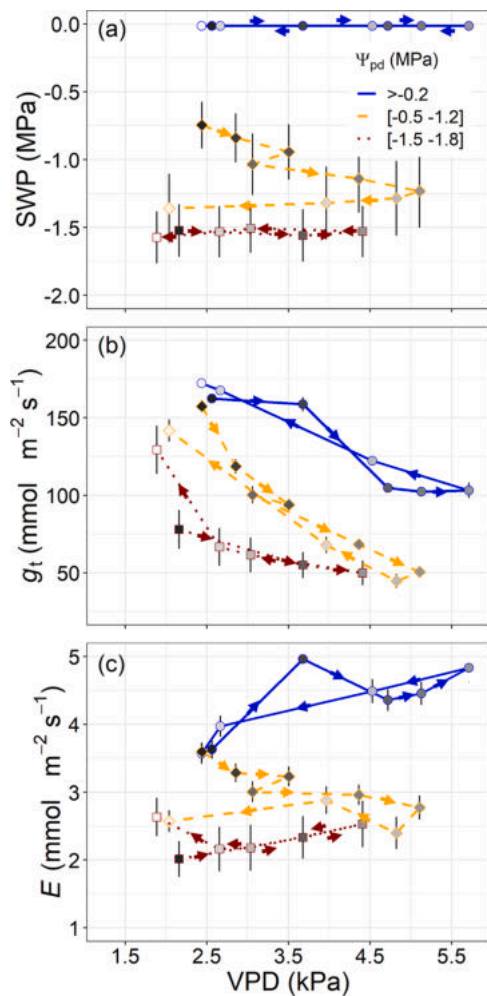


Fig. 5. Evolution of daytime average ($\text{PAR} > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of soil water potential (SWP), IR thermometry-derived total conductance (g_t) and transpiration (E) during three heatwaves (associated to $\text{VPD} > 4 \text{ kPa}$). Arrows and gray intensity indicate the timing within each high-VPD event, with black and white values corresponding to pre-event and post-event conditions, respectively ($\text{VPD} \leq 2.5 \text{ kPa}$). Error bars indicate the standard error of the mean, integrating daily and inter-tree variability through error propagation. Circles / solid lines, diamonds / dashed lines, and squares / dotted lines, denote the three events, occurring during the well-watered (days of the year, DOY: 176–183), soil drying (DOY: 199–207) and drought (DOY: 219–224) phases shown in Fig. S4. As a reference we include in the legend the predawn water potential (Ψ_{pd}) values during each event.

canopy IR thermometry), mainly due to the different measurement scale. The total leaf conductance obtained with IR thermometry decreased exponentially for the whole range of VPD evaluated, while the total leaf conductance obtained with the whole-plant chamber remained constant for VPD values lower than 2 kPa and higher than 4 kPa, mainly decreasing from 2 to 4 kPa (Fig. 3). This discrepancy could be explained by the different portions of the canopy measured by each method (Jones, 1992; Rey-Sánchez et al., 2016). On the one hand, the IR method monitored the southern exposure of the upper canopy, i.e., the area with the highest evaporative demand during the day and, therefore, the area potentially most sensitive to changes in VPD. On the other hand, the response given by the whole-plant chamber resulted from the sum of the different parts of the tree, where the response of the southern exposure parts might be smoothed with the response of the northern and lower-canopy areas (Tenhunen et al., 1990; Bonan et al., 2021). Concerning the single leaf cuvette, the variation in stomatal conductance to changes in VPD resulted in an intermediate response between the two

other methods. This might also be due to the location of the leaves measured with this technique, which was the southern exposure of the lower canopy, which might have a lower evaporative demand than the southern upper canopy, but still higher than the northern exposure.

Regarding a procedural comparison between methods, each of them has some advantages and some other disadvantages, taking into account their complexity, invasiveness and degree of assumption. First, the leaf cuvette easily allows the measurement of any single leaf due to its portability but hardly allows continuous monitoring due to its highest invasiveness. In fact, setting VPD values lower than 1.5 and higher than 3.5 kPa, required several minutes and not always were reached. This resulted in few measured values at high VPD, notably during soil water deficit conditions where we were not able to obtain measurements at VPD values higher than 4.5 kPa. In any case, the trend of the regression shown in Fig. 4a for soil water deficit conditions indicates that values of $\text{VPD} > 4.5 \text{ kPa}$ might yield values of g_s close to the minimum conductance.

Second, the whole-plant chamber can monitor the response of the entire tree with a minimum assumption but with the highest methodological complexity. In this study, we gave conductance units for this method by tree instead of by m^2 , taking into account that absolute values were not comparable with values obtained from the other methods. Alternatively, the total leaf area of the tree could be estimated by using different models and assumptions, such as the estimation from the transmittance of the sun beam (Lang and Murtrie, 1992) or using a terrestrial laser scanner (Hu et al., 2018). Another issue to highlight when using the whole-plant chamber is the significant warming effect found during the afternoon, which increased VPD in comparison to the external conditions. This limits the duration of the monitoring campaigns and should be taken into account when upscaling the results at the plantation level.

Finally, the IR technique registers the response of a certain area of the canopy, allowing noninvasive measurements without modifying the microclimatic conditions surrounding the tree. However, using the IR method requires a higher degree of assumption, for example, the estimation of the incident radiation reaching the leaf surface (Appendix B), the wind speed input, or the calculation of the boundary layer conductance (see Appendix A for details). In addition, to obtain conductance values from the estimated transpiration by IR, the uncertainty of the method increases with lower values of VPD, which implies values close to zero in the denominator of Eq. A6. In fact, at VPD values lower than 1 kPa (found around dawn), the estimated stomatal conductance may result in excessively large and erratic values.

In summary, all three methods have advantages and disadvantages, providing similar relationships between leaf conductance and drought stress but with peculiarities that complement each other (Fig. 8).

4.2. Effect of VPD and soil water deficit on *Q. ilex*

In well-watered trees of *Q. ilex* subsp. *rotundifolia*, an increase in VPD was compensated by a reduction in stomatal conductance, as previously reported in the same species (Mediavilla and Escudero, 2004; Aguadé et al., 2015). In our study, an increase from 2 to 4 kPa resulted in a reduction of ca. 25% in conductance, independent of soil conditions (Fig. 3d). When an increase in VPD to 4 kPa was combined with soil water deficit, the response of *Q. ilex* to both stresses resulted in a further ca. 20% decrease in stomatal conductance. Thus, soil and atmospheric water stress have an additive effect, with soil drying causing a general decline in g but not affecting the critical threshold in response to VPD (ca. 2 kPa; see ED50 in Table 1). Consequently, an analogous response of g to VPD is maintained regardless of soil water conditions, rejecting our first hypothesis.

Overall, our results confirm that VPD is a substantial regulator of the stomatal response and, hence, transpiration (Novick et al., 2016, 2019; Grossiord et al., 2020). However, under well-watered conditions, the reduction in g only partially compensated for the increase in

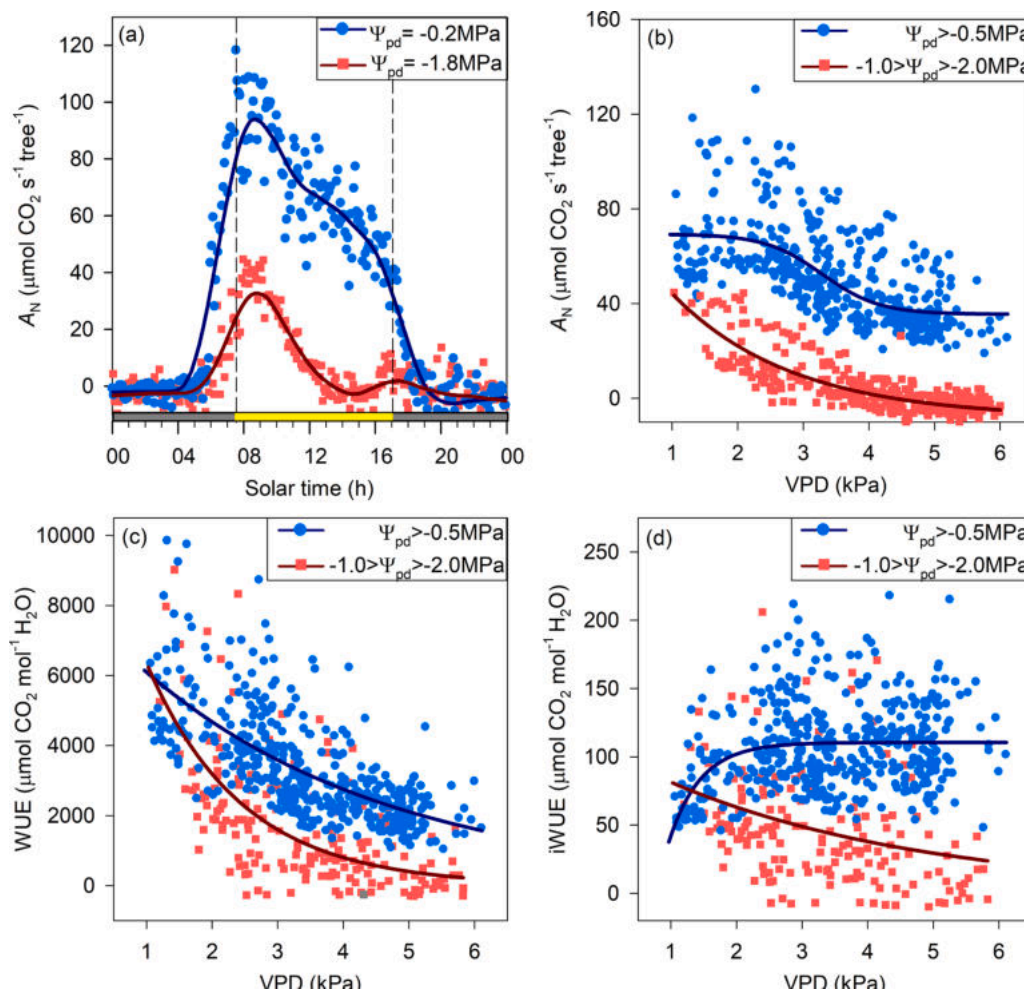


Fig. 6. Evolution of net photosynthesis (A_N) throughout the day, monitored with a whole-plant chamber on one holm oak under well-watered conditions ($\Psi_{pd} = -0.2$ MPa) and on other specimen under drought conditions (red; $\Psi_{pd} = -1.8$ MPa) (a). Relationship between vapor pressure deficit (VPD) and: A_N (b), water use efficiency (WUE) (c) and intrinsic water use efficiency (iWUE) (d). Blue lines and circles in (b), (c) and (d) correspond to two holm oaks under well-watered conditions ($\Psi_{pd} > -0.5$ MPa), while red lines and squares correspond to two other holm oaks under water stressed conditions ($-0.5 > \Psi_{pd} > -2.0$ MPa). Yellow and grey bars in (a) correspond to periods with a photosynthetic active radiation higher and lower than $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively.

transpiration with VPD at both the hourly and daily scales. In this regard, the water-saving response of *Q. ilex* in front of VPD was less effective than in more isohydric Mediterranean species (Tatarinov et al., 2015). Conversely, under soil water deficit conditions, the combined effect of atmospheric and soil water stress entailed in *Q. ilex* a decrease in water loss by the further reduction in stomatal conductance. This could be an effective strategy to reduce transpiration-driven xylem tension and prevent drought-induced embolism (Martin-St Paul et al., 2017; Peguero-Pina et al., 2018; Taylor et al., 2020). Moreover, this water-saving strategy together with the high xylem resistance to drought-induced cavitation shown by *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* both, in stems (water potential at which 50% of hydraulic conductivity is lost, P50, ca. -6.0 MPa) and shoots (P50 ca. -6.5 MPa; Alonso-Forn et al., 2021), entails a wide safety margin for avoiding runaway embolism (Vilagrosa et al., 2003). Additionally, it is worth considering the different performance that *Q. ilex* might have in populations from France or Italy, where the other subspecies, *Q. ilex* subsp. *ilex* showed a similar sensitivity to VPD and soil water deficit but with a lower tolerance to xylem tension (Tognetti et al., 1998) and therefore a lower safety margin. The existence of different ecotypes within this paradigm of Mediterranean trees (Peguero-Pina et al., 2014) must be taken into account in terms of their ecological interpretation.

The path analysis showed that, overall, soil dryness and evaporative demand are both important to explain stomatal closure, but their relative weight varies over the day. During the morning, SWP had the lowest effect on g_s , partly due to the more favorable environmental conditions (lower VPD) and the role of light limitations during this period. At midday, when light is not limiting and VPD still does not reach its daily

maximum, SWP shows the largest effect on g_s . Finally, during the afternoon, coinciding with the largest evaporative demand, VPD shows the strongest effect on g_s . This implies that the afternoon decline in stomatal conductance due to elevated VPD still plays a major role under well-watered conditions and, as discussed below, becomes critical for photosynthesis, even under moderate drought stress, as in our study. In terms of water balance, however, the water-saving strategy is successful, allowing nearly constant transpiration rates to be maintained during the day under well-watered conditions and even declining under drought (Alonso-Forn et al., 2021).

4.3. Consequences of higher VPD on carbon gain

Holm oak is highly sensitive to drought, as demonstrated in this study and in previous ones (Mediavilla and Escudero, 2003, 2004; Aguadé et al., 2015; Sancho-Knapik et al., 2018; Alonso-Forn et al., 2021). This fact restricts the maximum productivity of holm oak (measured as carbon gain) to a narrow window of environmental conditions, i.e., $\text{VPD} < 2 \text{ kPa}$ and $\text{SWP} > -0.5 \text{ MPa}$, in our experiment usually registered for well-watered trees during only two hours per day on average, from ca. 7:30 to 9:30 h solar time (Fig. 5). Additionally, regardless of VPD, values of leaf temperature above 30°C might also induce a reduction in the maximum photosynthetic rates (Gratani et al., 2000) due to limitations in the metabolism (Haldimann et al., 2008), which might contribute to a reduction in WUE. Therefore, the real carbon gain of holm oak can be much lower than its potential, becoming less efficient using water resources, which may threaten the long-term productivity, growth, and survival of this species, in accordance with

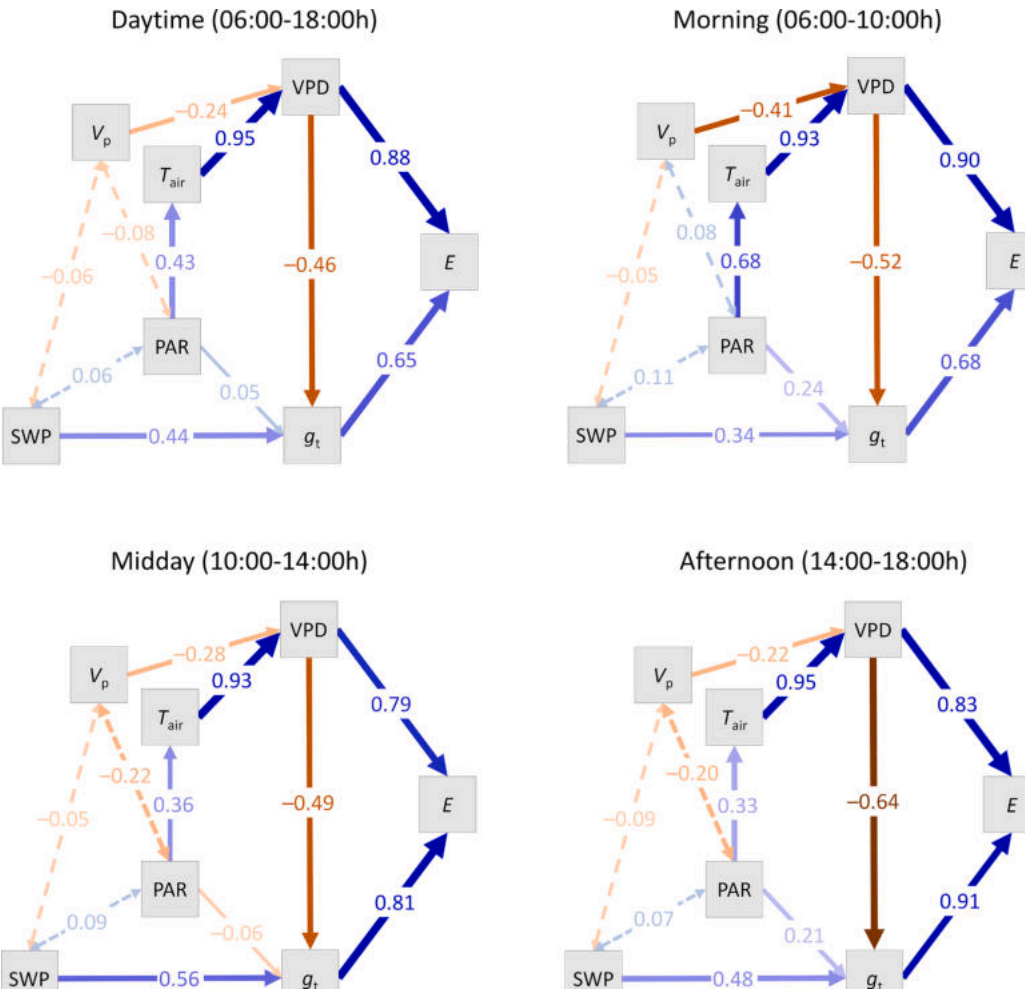


Fig. 7. Path analysis considering infrared data from the daytime and from each period of the daytime (morning, midday and afternoon). VPD, atmospheric vapor pressure deficit; SWP, soil water potential; gt, total conductance; E transpiration; Tair, air temperature; Vp, atmospheric water vapor pressure; PAR, photosynthetic active radiation. Blue are positive correlations and red are negative ones. Line thickness is proportional to the standardized parameter estimation (also shown in numerical labels). Bi-directional dashed lines indicate associations between exogenous variables (Vp, PAR and SWP). Uni-directional solid lines indicate the 'causal' associations included in the structural model.

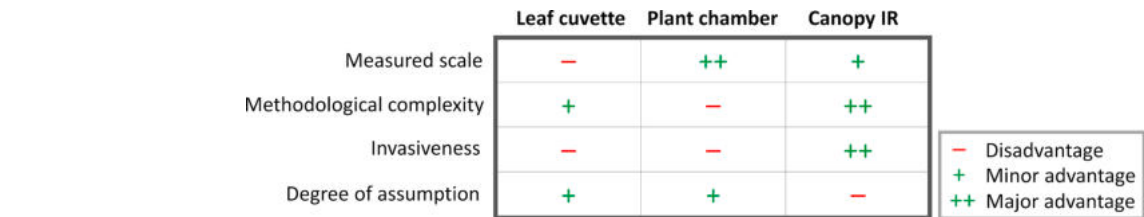


Fig. 8. Summary of the main advantages and disadvantages of the three methods tested in this study. -: disadvantage; +: minor advantage; ++: major advantage.

our second hypothesis.

In practice, when evaluating the summer environmental conditions recorded during IR monitoring (i.e., from the 20th of June to the 8th of August 2019), we found that only the 14.7% of daylight hours with $PAR > 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ are prone to achieve the maximum carbon gain rates. However, as an evergreen tree, *Q. ilex* could also gain carbon during the rest of the vegetative period (from March to November; Corcuera et al., 2005; Alonso-Forn et al., 2022) where the window for optimal conditions might be larger (Fig. S1) and thus compensate for the summer Mediterranean season. This has implications not only for ecosystem productivity but also for the management of tree orchards. Holm oak is used in plantations for truffle production, where the soil water deficit is eliminated with well-designed irrigation schedules (Águeda et al., 2010). If this had been our case and the irrigation had not been stopped, maintaining well-watered conditions during all the experiment, the percentage of hours holm oak would have achieved maximum photosynthesis rates would have only increased to 29.6% of

the total daylight hours. Therefore, atmospheric water stress may still prevent full optimal conditions despite eliminating the soil water deficit. This suggest that irrigation schedules that keep soils at field capacity could be unnecessary and a waste of water if VPD already limits the maximum photosynthesis rates.

Given the importance of VPD in determining the carbon gains of holm oak, one would expect that the natural distribution of this species would also be dependent on the range of VPD values throughout the vegetative period. Effectively, when analyzing the natural distribution of holm oak in a northeast region of Spain (Fig. S6), we noticed that the natural distribution of holm oak practically coincides with the areas with lower VPD during the vegetative period (from March to November), suggesting a relevant role of VPD in shaping vegetation similar to other factors such as soil properties or rainfall geographic patterns.

5. Conclusion

The methods used in this study to monitor VPD complement each other, with the whole-plant chamber providing an overall view of the response of the entire tree and the IR thermometry providing monitoring throughout the complete summer drought period in a noninvasive way. When compared to the single leaf measurements, the three methods provided similar relationships between VPD and conductance with discrepancies associated with the measurement scale. The results showed that atmospheric and soil water stress had an additive effect. Under well-watered conditions, an increase in VPD was partially compensated by a reduction in stomatal conductance, resulting in a slight increase in the transpiration rates. With soil water deficit, the response to VPD resulted in a further decrease in stomatal conductance, reducing transpiration as a water saving strategy. Finally, this high sensitivity to drought restricts the maximum carbon gain rates of holm oak to particular environmental conditions that might modulate its physiological performance and natural distribution.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Funding

This work was supported by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 [grant number PID2019-106701RR-I00]; Gobierno de Aragón-Fondo de Inversiones de Teruel (FITE) and Gobierno de España [grant project FITE-2017-PETRA]; and by Gobierno de Aragón [research group H09_20R]. Work of D.A-F. was supported by FPI-INIA [grant number BES-2017-081208]; work of J.V.S.S. was supported by MCIN/AEI [grant number PRE2020-094944]; and work of R.M-S. was supported by Gobierno de Aragón.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.agrformet.2022.109218](https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.109218).

Appendices

Appendix A. Calculation of leaf conductance using the infrared thermometry method

Leaf transpiration (E , in $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was estimated from the difference between measured canopy temperature (T_c), and modelled leaf temperature for a dry surface (T_{dry}), according to energy balance equations (Jones, 1992):

$$E = C_p(g_{bH} + g_r)(T_{dry} - T_c)/L \quad (\text{A.1})$$

where C_p is the molar specific heat constant of air at constant pressure ($29.2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), g_{bH} and g_r are boundary layer (sensible) heat conductance and radiative heat conductance, respectively (in $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), and L is the molar heat of vaporization (44012 J mol^{-1}). g_{bH} and g_r were calculated following Ball et al. (1988) and Jones (1992), respectively:

$$g_{bH} = 1/(3.8LA^{1/4}u^{-1/2}) \quad (\text{A.2})$$

$$g_r = (4\sigma\epsilon_l T_{air}^2)/C_p \quad (\text{A.3})$$

where LA is the average individual leaf area (in m^2), u is wind speed (in m s^{-1}), σ is the Stefan-Boltzmann constant ($5.67 \times 10^{-8} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$), and ϵ_l is long-wave emissivity of the leaf (0.98). T_{dry} was estimated using the leaf temperature model described in Barbour et al. (2000), after removing the evaporative term (L^*D , where D is the water vapor concentration deficit (mol mol^{-1})):

$$T_{dry} = \frac{(g_{bH} + g_r)(Q_0 * r_t)}{C_p(r_t + (sL/C_pP)(g_{bH} + g_r))} + T_{air} \quad (\text{A.4})$$

where Q_0 is the isothermal net radiation (in W m^{-2} , for calculations see Appendix B), r_t is total leaf resistance to water vapor (stomatal + boundary layer, in $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), s is the slope of the curve relating temperature to saturated vapor pressure (in kPa K^{-1}), and P is the pressure in kPa. The slope s was calculated following (Postl and Bolh ar-Nordenkamp, 1983; Barbour et al., 2000):

$$s = a \left\{ \frac{[(T_{air} + b)(c - 2\frac{T_{air}}{d}) - T_{air}(c - \frac{T_{air}}{d})]}{(T_{air} + b)^2} \right\} * \exp \left\{ T_{air} \left[\frac{(c - \frac{T_{air}}{d})}{(T_{air} + b)} \right] \right\} \quad (\text{A.5})$$

where $a=6.13753$, $b=255.57$, $c=18.564$ and $d=254.4$.

Total leaf conductance (g_b , in $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was calculated according to von Caemmerer and Farquhar (1981):

$$g_t = E \frac{[1 - (wi + wa)/2]}{(wi - wa)} \quad (\text{A.6})$$

where w_i and w_a stand for the mol fractions of water vapor inside the leaf and in the surrounding air, respectively. Total leaf resistance ($r_l=1/g_l$) was used as an input variable in Eq. A4, hence calculations were made iteratively, setting an initial value for $g_l=0.2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and recalculating with equations A.1-A.6 until the input and output values converged to a mean absolute difference $<0.0001 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Appendix B. Calculation of isothermal net radiation

Horizontal radiation (Q_{sensor}) was determined from local measurements of photosynthetically active radiation (PAR) (quantum sensor QSO, Apogee Instruments, Logan, USA), assuming a typical ratio of shortwave radiation to PAR of 0.5 MJ mol^{-1} (Jones, 1992). We estimated the fraction of diffuse radiation (K_{diff}) from the transmitted fraction (K_t), according to Boland et al. (2008):

$$K_{\text{diff}} = 1/[1 + \exp(8.6K_t - 5)] \quad (\text{B.1})$$

where K_t is calculated as the ratio between measured horizontal radiation and theoretical maximum horizontal solar radiation, as determined from the solar constant (1370 W m^{-2}) and solar elevation (for details see Appendix 7 in Jones, 1992). From K_{diff} , we calculated diffuse (Q_{diff}) and direct (Q_{dir}) radiation reaching the sensor. Following Lambert's cosine law, we determined incident direct radiation in the canopy surface ($Q_{\text{dir-canopy}}$) multiplying Q_{dir} by the ratio between the cosine of the angle between the surface and the sun ($\cos \xi$), for the canopy and the sensor, respectively (Jones, 1992):

$$\cos \xi = [(\sin \lambda \cosh)(-\cos \alpha \sin \chi) - \sinh(\sin \alpha \sin \chi) + (\cos \lambda \cosh) \cos \chi] \cos \delta + [\cos \lambda (\cos \alpha \sin \chi) + \sin \lambda \cos \chi] \sin \delta \quad (\text{B.2})$$

where λ is the latitude, h is the hour angle of the sun, α and χ are the zenith angle and azimuth of the surface, respectively, and δ is declination. Δ and h were determined using the functions *declination* and *hourangle*, available in the R package *insol* 1.2. For the sensor, $\chi=0$ (horizontal surface) and α becomes irrelevant. For the canopy, $\chi=45^\circ$ and $\alpha=189.2^\circ$. Finally, total isothermal net radiation (Q_0) reaching the canopy was calculated as the sum of Q_{diff} and $Q_{\text{dir-canopy}}$, multiplied by an average leaf absorption coefficient of 0.5 (Jones, 1992), and a light harvesting efficiency, which accounts for self-shading within the canopy, of 0.62 in *Q. ilex* (Esteso-Martínez et al. 2006).

References

- Acherar, M., Rambal, S., 1992. Comparative water relations of four Mediterranean oak species. *Vegetatio* 99–100, 177–184. <https://doi.org/10.1007/BF00118224>.
- Aguadé, D., Poyatos, R., Rosas, T., Martínez-Vilalta, J., 2015. Comparative drought responses of *Quercus ilex* L. and *Pinus sylvestris* L. in a montane forest undergoing a vegetation shift. *Forests* 6, 2505–2529. <https://doi.org/10.3390/f608250510.3390/f6082505>.
- Águeda, B., Fernández-Toirán, L.M., de Miguel, A.M., Martínez-Peña, F., 2010. Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation. *For. Syst.* 19 (1), 89–97. <https://doi.org/10.5424/fs/2010191-01170>.
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., Mencuccini, M., Mendoza-Herrer, Ó., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2021. Contrasting functional strategies following severe drought in two Mediterranean oaks with different leaf habit: *Quercus faginea* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* 41, 371–387. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa135>.
- Alonso-Forn, D., Peguero-Pina, J.J., Ferrio, J.P., García-Plazaola, J.I., Martín-Sánchez, R., Niinemets, U., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2022. Cell-level anatomy explains leaf age-dependent declines in mesophyll conductance and photosynthetic capacity in the evergreen Mediterranean oak *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* Tpac049. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpac049>.
- Andrews, P.K., Chalmers, D.J., Moremang, M., 1992. Canopy-air temperature differences and soil water as predictors of water stress of apple trees grown in a humid, temperate climate. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117 (3), 453–458. <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.3.453>.
- Ball, M.C., Cowan, I.R., Farquhar, G.D., 1988. Maintenance of leaf temperature and the optimization of carbon gain in relation to water loss in a tropical mangrove forest. *Aust. J. Plant Physiol.* 15, 263–276. <https://doi.org/10.1071/PP988026310.1071/pp9880263>.
- Barbour, M.M., Fischer, R.A., Sayre, K.D., Farquhar, G.D., 2000. Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 625–637. <https://doi.org/10.1071/PP99041>.
- Barkhordarian, A., Saatchi, S.S., Behrangi, A., Loikith, P.C., Mechoso, C.R., 2019. A recent systematic increase in vapor pressure deficit over tropical South America. *Sci. Rep.* 9, 15331. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51857-8>.
- Barradas, V.L., Ramos-Vázquez, A., Orozco-Segovia, A., 2004. Stomatal conductance in a tropical xerophilous shrubland at a lava substratum. *Int. J. Biometeorol.* 48 (3), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s00484-003-0195-x>.
- Bellot, J., Urbina, A.O., Bonet, A., Sanchez-Montañán, J.R., 2002. The effects of treeshellter on the growth of *Quercus coccifera* L. seedlings in semiarid environment. *Forestry* 75 (1), 89. <https://doi.org/10.1093/forestry/75.1.89>.
- Bonan, G.B., Patton, E.G., Finnigan, J.J., Baldocchi, D.D., Harman, I.N., 2021. Moving beyond the incorrect but useful paradigm: reevaluating big-leaf and multilayer plant canopies to model biosphere-atmosphere fluxes – a review. *Agric. For. Meteorol.* 306, 108435. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108435>.
- Boland, J., Ridley, B., Brown, B., 2008. Models of diffuse solar radiation. *Renew. Energy* 33, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2007.04.012>.
- Burba, G., 2013. Eddy covariance method for scientific, industrial, agricultural, and regulatory applications: a field book on measuring ecosystem gas exchange and areal emission rates. LI-COR Biosciences, p. 331. Lincoln, NE, USA.
- Carnicer, J., Barbeta, A., Sperlich, D., Coll, M., Peñuelas, J., 2013. Contrasting trait syndromes in angiosperms and conifers are associated with different responses of tree growth to temperature on a large scale. *Front. Plant Sci.* 4, 409. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00409>.
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A., Gil-Pelegrín, E., 2005. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* subsp. *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian peninsula. *Tree Physiol.* 25, 599–608. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.5.599>.
- Dai, A., Zhao, T., Chen, J., 2018. Climate change and drought: a precipitation and evaporation perspective. *Curr. Clim. Change Rep.* 4 (3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s40641-018-0101-6>.
- Ding, J., Yang, T., Zhao, Y., Liu, D., Wang, X., Yao, Y., Peng, S., Wang, T., Piao, S., 2018. Increasingly important role of atmospheric aridity on Tibetan alpine grasslands. *Geophys. Res. Lett.* 45, 2852–2859. <https://doi.org/10.1002/2017GL076803>.
- Epskamp, S., 2015. semPlot: Unified visualizations of structural equation models. *Struct. Equ. Model.* 22 (3), 474–483. <https://doi.org/10.1080/10705511.2014.937847>.
- Esteso-Martínez, J., Valladares, F., Camarero, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2006. Crown architecture and leaf habit are associated with intrinsically different light-harvesting efficiencies in *Quercus* seedlings from contrasting environments. *Ann. For. Sci.* 63, 511–518. <https://doi.org/10.1051/forest:200603310.1051/forest:2006033>.
- Ficklin, D.L., Novick, K.A., 2017. Historic and projected changes in vapor pressure deficit suggest a continental-scale drying of the United States atmosphere. *J. Geophys. Res. Atmos.* 122 (4), 2061–2079. <https://doi.org/10.1002/2016jd025855>.
- Gil-Pelegrín, E., Saz, M.A., Cuadrat, J.M., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., 2017. Oaks under editerranean-type climates: functional response to summer aridity. In: Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D. (Eds.), *Oaks physiological ecology. Exploring the functional diversity of genus Quercus L.* Springer International, Cham, Switzerland, pp. 137–193.
- Gratani, L., Pesoli, P., Crescente, M.F., Aichner, K., Larcher, W., 2000. Photosynthesis as a temperature indicator in *Quercus ilex* L. *Global Planet. Change* 24, 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0921-8181\(99\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0921-8181(99)00061-2).
- Grossiord, C., Buckley, T.N., Cernusak, L.A., Novick, K.A., Poulter, B., Siegwolf, R.T.W., Sperry, J.S., McDowell, N.G., 2020. Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New Phytol.* 226 (6), 1550–1566. <https://doi.org/10.1111/nph.16485>.
- Haldimann, P., Gallé, A., Feller, U., 2008. Impact of an exceptionally hot dry summer on photosynthetic traits in oak (*Quercus pubescens*) leaves. *Tree Physiol.* 28, 785–795. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.5.785>.
- Hipps, L.E., Ashrar, G., Kanemasu, E.T., 1985. A theoretically based normalization of environmental effects on foliage temperature. *Agric. Forest Meteorol.* 35, 113–122. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(85\)90078-4](https://doi.org/10.1016/0168-1923(85)90078-4).
- Hu, R., Bournez, E., Cheng, S., Jiang, H., Nerry, F., Landes, T., Saudreau, M., Kastendeuch, P., Najjar, G., Colin, J., Yan, G., 2018. Estimating the leaf area of an individual tree in urban areas using terrestrial laser scanner and path length distribution model. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* 144, 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2018.07.015>.
- Iglesias, A., Garrote, L., Flores, F., Moneo, M., 2007. Challenges to manage the risk of water scarcity and climate change in the Mediterranean. *Water Resour. Manag.* 21, 775–788. <https://doi.org/10.1007/s11269-006-9111-6>.
- Jones, H.G., 1992. *Plants and Microclimate*. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. Vol. 2nd. Ed. ISBN 9780511845727.

- Jones, H.G., 1999. Use of infrared thermometry for estimation of stomatal conductance as a possible aid to irrigation scheduling. *Agric. Forest Meteorol.* 95, 139–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(99)00030-1).
- Jung, M., Reichstein, M., Ciais, P., Seneviratne, S.I., Sheffield, J., Goulden, M.L., Bonan, G., Cescatti, A., Chen, J., de Jeu, R., Dolman, A.J., Eugster, W., Gerten, D., Gianelle, D., Gobron, N., Heinke, J., Kimball, J., Law, B.E., Montagnani, L., Zhang, K. E., 2010. Recent decline in the global land evapotranspiration trend due to limited moisture supply. *Nature* 467 (7318), 951–954. <https://doi.org/10.1038/nature09396>.
- Kimm, H., Guan, K., Gentile, P., Wu, J., Bernacchi, C.J., Sulman, B.N., Griffis, T.J., Link, C., 2020. Redefining droughts for the U.S. Corn Belt: The dominant role of atmospheric vapor pressure deficit over soil moisture in regulating stomatal behavior of Maize and Soybean. *Agric. Forest Meteorol.* 287, 107930 <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.107930>.
- Lang, A.R.G., McMurtriebm, R.E., 1992. Total leaf areas of single trees of Eucalyptus distans estimated from transmittances of the sun's beam. *Agric. Forest Meteorol.* 58, 79–92. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(92\)90112-H](https://doi.org/10.1016/0168-1923(92)90112-H).
- Li, C.C., 1975. *Path Analysis – a primer*. Pacific Grove. The Boxwood Press, California.
- Li, M., Yao, J., Guana, J., Zheng, J., 2021. Observed changes in vapor pressure deficit suggest a systematic drying of the atmosphere in Xinjiang of China. *Atmos. Res.* 248, 105199 <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2020.105199>.
- Liu, L., Hoogenboom, G., Ingram, K.T., 2000. Controlled-environment sunlit plant growth chambers. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 19, 347–375. <https://doi.org/10.1080/07352680091139268>.
- Lobell, D.B., Roberts, M.J., Schlenker, W., Braun, N., Little, B.B., Rejesus, R.M., Hammer, G.L., 2014. Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the U.S. Midwest. *Science* 344, 516–519. <https://doi.org/10.1126/science.1251423>.
- López, J., Way, D.A., Sadok, W., 2021. Systemic effects of rising atmospheric vapor pressure deficit on plant physiology and productivity. *Glob. Change Biol.* 27, 1704–1720. <https://doi.org/10.1111/gcb.15548>.
- Martin-StPaul, N., Delzon, S., Cochard, H., 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol. Lett.* 20, 1437–1447. <https://doi.org/10.1111/ele.12851>.
- McAdam, S.A., Brodribb, T.J., 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiol* 167, 833–843. <https://doi.org/10.1104/pp.114.252940>.
- McAdam, S.A., Brodribb, T.J., 2016. Linking Turgor with ABA biosynthesis: implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. *Plant Physiol* 171, 2008–2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00380>.
- McDowell, N.G., Allen, C.D., 2015. Darcy's law predicts widespread forest mortality under climate warming. *Nat. Clim. Chang.* 5 (7), 669–672. <https://doi.org/10.1038/nclimate2641>.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2003. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiol* 23, 987–996. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.14.987>.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2004. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *For. Ecol. Manag.* 187, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2003.07.006>.
- Miller, D.P., Howell, G.S., Flore, J.A., 1996. A whole-plant, open, gas-exchange system for measuring net photosynthesis of potted woody plants. *Hortoscience* 31, 944–946. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.6.944>.
- Novick, K.A., Miniat, C.F., Vose, J.M., 2016. Drought limitations to leaf-level gas exchange: results from a model linking stomatal optimization and cohesion-tension theory. *Plant Cell Environ* 39, 583–596. <https://doi.org/10.1111/pce.12657>.
- Novick, K.A., Konings, A.G., Gentile, P., 2019. Beyond soil water potential: An expanded view on isohydricity including land-atmosphere interactions and phenology. *Plant Cell Environ* 42, 1802–1815. <https://doi.org/10.1111/pce.13517>.
- Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Barrón, E., Camarero, J.J., Vilagrosa, A., Gil-Pelegrín, E., 2014. Morphological and physiological divergences within *Quercus ilex* support the existence of different ecotypes depending on climatic dryness. *Ann. Bot.* 114 (2), 301–313. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu108>.
- Peguero-Pina, J.J., Vilagrosa, A., Alonso-Forn, D., Ferrio, J.P., Sancho-Knapik, D., Gil-Pelegrín, E., 2020. Living in drylands: functional adaptations of trees and shrubs to cope with high temperatures and water scarcity. *Forests* 11, 1028. <https://doi.org/10.3390/f11101028>.
- Postl, W.F., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., 1983. 'GASEX': a program to study the influence of data variations on calculated rates of photosynthesis and transpiration. In: Hall, D. O., Scurlock, J.M.D., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.), *Photosynthesis and production in a changing environment*. Chapman and Hall, London, pp. 448–455, 1983.
- Restaino, C.M., Peterson, D.L., Littell, J., 2016. Increased water deficit decreases Douglas fir growth throughout western US forests. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9557–9562. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602384113>.
- Rey-Sánchez, A.C., Slot, M., Posada, J.M., Kitajima, K., 2016. Spatial and seasonal variation in leaf temperature within the canopy of a tropical forest. *Clim. Res.* 71, 75–89. <https://doi.org/10.3354/cr01427>, 2016.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. *Plos One* 10 (12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>.
- Rosseel, Y., 2012. Lavaan: an R package for structural equation modeling. *J. Statistic. Software* 48 (2), 1–36. URL: <http://www.jstatsoft.org/v48/i02/>.
- Sancho-Knapik, D., Álvarez-Arenas, T.G., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2010. Air-coupled broadband ultrasonic spectroscopy as a new non-invasive and non-contact method for the determination of leaf water status. *J. Exp. Bot.* 61 (5), 1385–1391. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq001>.
- Sancho-Knapik, D., Medrano, H., Peguero-Pina, J.J., Mencuccini, M., Fariñas, M.D., Álvarez-Arenas, T.G., Gil-Pelegrín, E., 2016. The application of leaf ultrasonic resonance to *Vitis vinifera* L. suggests the existence of a diurnal osmotic adjustment subjected to photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 7, 1601. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01601>.
- Sancho-Knapik, D., Mendoza-Herrer, Ó., Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., 2018. Chl fluorescence parameters and leaf reflectance indices allow monitoring changes in the physiological status of *Quercus ilex* L. under progressive water deficit. *Forests* 9, 400. <https://doi.org/10.3390/f9070400>.
- Seager, R., Hooks, A., Williams, A.P., Cook, B., Nakamura, J., Henderson, N., 2015. Climatology, variability, and trends in the U.S. vapor pressure deficit, an important fire-related meteorological quantity. *J. Appl. Meteorol. Climatol.* 54 (6), 1121–1141. <https://doi.org/10.1175/JAMC-D-14-0321.1>.
- Sepulcre-Canto, G., Zarco-Tejada, P.J., Jimenez-Munoz, J.C., Sobrino, J.A., Soriano, M. A., Fereres, E., Vega, V., Pastor, M., 2007. Monitoring yield and fruit quality parameters in open-canopy tree crops under water stress. Implications for ASTER. *Remote Sens. Environ.* 107, 455–470. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2006.09.014>.
- Tatarinov, F., Rotenberg, E., Maseyk, K., Oge, J., Klein, T., Dan Yakir, D., 2016. Resilience to seasonal heat wave episodes in a Mediterranean pine forest. *New Phytol* 210, 485–496. <https://doi.org/10.1111/nph.13791>.
- Taylor, N.J., Smit, T.G., Midgley, S.J.E., Annandale, J.G., 2020. Stomatal regulation of transpiration and photosynthesis in macadamias. *Acta Hort* 1281, 463–469. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1281.61>.
- Tenhunen, A.J.D., Lange, O.L., Braun, M., 1981. Midday stomatal closure in Mediterranean type sclerophylls under simulated habitat conditions in an environmental chamber: II. Effect of the complex of leaf temperature and air humidity on gas exchange of *Arbutus unedo* and *Quercus ilex*. *Oecologia* 50, 5–11. <https://doi.org/10.1007/BF00378788>.
- Tenhunen, A.J.D., Serra, A.S., Harley, P.C., Dougherty, R.L., Tenhunen, J.D., Serra, A.S., Harley, P.C., Dougherty, R.L., Reynolds, J.F., 1990. Factors influencing carbon fixation and water use by Mediterranean sclerophyll shrubs during summer drought. *Oecologia* 82, 381–393. <https://doi.org/10.1007/BF00317487>.
- Tognetti, R., Longobucco, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1998. Transpiration and stomatal behavior of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. *Plant Cell Environ* 21, 613–622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00301.x>.
- Turner, N.C., 1988. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.* 9, 289–308. <https://doi.org/10.1007/BF00296704>, 1988.
- Vilagrosa, A., Bellot, J., Vallejo, V.R., Gil-Pelegrín, E., 2003. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *J. Exp. Bot.* 54 (390), 2015–2024. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg221>.
- von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376–387. <https://doi.org/10.1007/BF00384257>, 1981.
- Williams, A.P., Allen, C.D., Macalady, A.K., Griffin, D., Woodhouse, C.A., Meko, D.M., Swetnam, T.W., Rauscher, S.A., Seager, R., Grissino-Mayer, H.D., Dean, J.S., Cook, E. R., Gangadagamage, C., Cai, M., McDowell, N.G., 2013. Temperature as a potent driver of regional forest drought stress and tree mortality. *Nat. Clim. Chang.* 3, 292–297. <https://doi.org/10.1038/nclimate1693>.
- Williams, A.P., Seager, R., Berkelhammer, M., Macalady, A.K., Crimmins, M.A., Swetnam, T.W., Trugman, A.T., Bunnning, N., Hryniw, N., McDowell, N.G., Noone, D., Mora, C.I., Rahn, T., 2014. Causes and implications of extreme atmospheric moisture demand during the record-breaking 2011 wild fire season in the southwestern United States. *J. Appl. Meteorol. Climatol.* 53 (12), 2671–2684. <https://doi.org/10.1175/JAMC-D-14-0053.1>.
- Yuan, W., Zheng, Y.L., Piao, S., Ciais, P., Lombardozzi, D., Wang, Y., Ryu, Y., Chen, G., Dong, W., Hu, Z., Jain, A.K., Jiang, C., Kato, E., Li, S., Lienert, S., Liu, S., Nabel, J.E. M.S., Qin, Z., Quine, T., Yang, S., 2019. Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Sci. Adv.* 5 (8), eaax1396. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1396>.
- Peguero-Pina, J.J., Mendoza-Herrer, O., Gil-Pelegrín, E., Sancho-Knapik, D., 2018. Cavitation limits the recovery of gas exchange after severe drought stress in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Forests* 9, 443. <https://doi.org/10.3390/f9070443>.

ANEXO 4

**A low precipitation event drives a recovery
of *Quercus ilex* L. during summer drought stress
(Artículo en preparación)**

1 Communication

2 A low precipitation event drives a recovery of *Quercus ilex* L. 3 during summer drought stress

4 Domingo Sancho-Knapik^{1,2,*}, Óscar Mendoza-Herrer¹, Rubén Martín Sánchez¹, David Alonso-Forn¹, Juan Pedro
5 Ferrio^{1,3}, Eustaquio Gil-Pelegrín¹ and José Javier Peguero-Pina^{1,2}

¹ Unidad de Recursos Forestales, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain; oscar.mendoza.herrer@gmail.com (O.M.-H.); rmartin@cita-aragon.es (R.M.S.); dalonso@cita-aragon.es (D.A.-F.); jpferrio@cita-aragon.es (J.P.F.); egilp@cita-aragon.es (E.G.-P.); jpeguero@aragon.es (J.J.P.-P.)

² Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), E-50018 Zaragoza, Spain

³ Aragón Agency for Research and Development (ARAID), E-50018 Zaragoza, Spain

* Correspondence: dsancho@cita-aragon.es

Abstract: The summer drought that characterizes the Mediterranean climate includes low precipitation storms (below 1 mm) as one of the most common precipitation forms. These low precipitation events are considered negligible in terms of soil water balance, however, they could play an important tree ecophysiological role as might reduce plant stress through canopy wetting and further foliar water uptake. In this study, we monitored the short-term response of *Quercus ilex*, a key oak species of the Mediterranean Basin landscape, to a low-precipitation event occurred during summer, by measuring vapor pressure deficit (VPD), soil and plant water potential, total leaf conductance (g_t), the maximum potential photosystem II efficiency (F_v/F_m), and the physiological reflectance index (PRI). We found that for a rain event of 0.6 mm, soil water potential decreased 0.34 MPa while predawn plant water potential remained constant; daily maximum VPD decreased ca. 3 kPa during the rain event inducing an increase in g_t of about 100 mmol H₂O m⁻² s⁻¹; we also found a recovery of the mean values of F_v/F_m and PRI of ca. 0.1 and 0.01, respectively. Thus, low precipitation storms might be of significant importance when considering the water balance of a particular tree species like other natural phenomena, such as fog or dew, already considered especially important in environments subjected to temporary drought.

Keywords: holm oak; leaf water uptake; small rainfall; summer drought

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Forests* **2021**, *12*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Forests inhabiting Mediterranean-type climates have to cope with a summer drought period, imposed by a combination of low precipitation, high temperatures, and high vapor pressure deficit (VPD), that has been accepted as a severe ecological constrain for plant life [1–7]. Despite the lower precipitation, total summer rainfall constitutes 24% of the whole-year precipitation (referring to the Iberian Peninsula; <http://www.aemet.es>), where short-term storms are the most common precipitation form, being up to 100% of the fallen rain during July and August [8]. While most of the water falling after high precipitation summer storms might not be available for plant roots due to storm water runoff, the low precipitation storms (below 1 mm), that account for 54% of the total summer rainfall (<http://www.aemet.es>), are considered negligible in terms of soil water balance [9]. However, water from summer storms deposited onto the leaf surface of a particular species could play an important ecophysiological role for plant performance similar to other natural phenomena, such as fog or dew, already considered especially important in environments subjected to temporary drought [10–14]. For example, there are evidences for the uptake of water via foliage in deserts [15], tropical montane cloud

forests [12,13,16], cloud-immersed mountain habitats [17,18], or coastal mountain regions where fog is a significant climatic contributor [11,19].

Although the mechanisms involving foliar water uptake are still not fully understood [20,21], water deposited onto a leaf surface may penetrate through stomata [22], the cuticle [23], specialized epidermal structures such as trichomes [24,25] and scales [26], or the stem base [27]. In this sense, Fernández *et al.* [28] analyzed in the laboratory the process of foliar water uptake in *Quercus ilex* L., a key evergreen oak species of the Mediterranean Basin landscape, recording a significant water potential recovery in response to leaf hydration. Authors stated that the increased wettability of the adaxial side of the oak leaves facilitated leaf rehydration, possibly through the trichomes and the remaining scars after trichome shedding. Thus, direct water uptake by the foliage from summer storms may positively contribute to water economy of holm oak during the Mediterranean dry summers.

Additionally, when a summer storm occurs, maximum values of VPD sharply decrease from the beginning of the storm [28]. This implies a decrease in atmospheric dryness, providing not only optimal conditions for foliar water absorption due to a lower evaporation rate of water drops, but also better atmospheric conditions for plant growth [29,30]. A lower VPD has been associated to lower photosynthetic limitations resulted from increases in stomatal conductance [31,32]. By contrast, higher values of VPD may induce stomatal closure to prevent excessive water loss through transpiration, but at the expense of reducing carbon gain [7]. As the Mediterranean *Q. ilex* had shown a high stomatal sensitivity to VPD [4], even a storm with very low precipitation might be positive for its carbon balance.

Taking into account the aforementioned framework, a low precipitation storm might reduce holm oak stress imposed by the Mediterranean summer conditions through canopy wetting and further foliar water uptake, and by lowering the atmospheric dryness. If this is the case, low precipitation storms that are negligible in terms of soil water balance [9], might be of significant importance when considering the water balance of the plant, for example, in *Q. ilex* forests for black truffle production or in cultivated truffle orchards [33]. Thus, the aim of this study was to monitor the short-term physiological response of *Q. ilex* to a low-precipitation event occurred during summer. To address this objective, we monitored a plantation of *Q. ilex* trees for truffle production before and after a low precipitation event, measuring several parameters related to the physiological performance of this species in response to water stress (i.e. the maximum quantum efficiency of photosystem II, the physiological reflectance index and the total leaf conductance) [34–36], as well as weather and soil conditions. We hypothesized that a low precipitation event during summer drought would not necessary increase soil water availability, but would partially recover trees of *Q. ilex* subjected to a certain water stress.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental conditions

The monitoring of the low precipitation summer event took place in an experimental field plot located at CITA de Aragón (41.39° N, 0.52° W, Zaragoza, Spain) during the summer of 2019. This site features a Mediterranean climate regime with a mean annual temperature of 15.4 °C and a total annual precipitation of 298 mm [35]. The experimental plot is a holm oak plantation firstly destined to truffle production where total soil depth is ca. 60 cm. Trees of *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* from this plot were 25-years-old, planted in 1998 using a pattern of 6x6 m. Trees are maintained in good health conditions, being watered with sprinklers when necessary, and pruned every two years during winter to obtain trees with homogeneous rounded-shape canopies. Tree height was ca. 3 m, diameter of the orthogonal projection of the tree canopy ranged between 2.0 and 2.5 m, and the percentage of canopy cover on the soil surface was ca. 14 %. Twice a year (during early winter and early summer), the experimental plot is cleaned mechanically,

eliminating the presence of the herbaceous and shrubby stratum. Plant irrigation was stopped the 20th of June 2019. From this date, trees only received water from summer precipitation events. Measurements and plant monitoring were performed on 3 specimens of *Q. ilex* subsp. *rotundifolia*.

A low precipitation summer storm was registered during the 26th and 27th of July 2019. Total precipitation, measured with a pluviometer (Rain Collector II, Davis Instruments, Hayward, Ca, USA), was 0.6 mm. From this amount of water, a fraction of 0.4 mm was registered between 17:00 and 19:30 h solar time on the 26th of July, whereas the other 0.2 mm was registered the next day between 14:00 and 15:00 h solar time (Figure 1). During the precipitation event, we obtained VPD by measuring every 30 minutes air temperature with a 4-wire PT100 probe, and air relative humidity, registered with a Hobo Pro RH/Temp data logger (U23-001; Onset Computer Corp., Pocasset, MA, USA). Horizontal wind speed was recorded with a cup anemometer (Oche Control y Equipamientos S.L., Cadrete, Spain). Soil water potential was also measured every 30 minutes during the experiment (Figure 1) using 3 soil water potential sensors (Teros 21, Meter Group Inc., Pullman, WA, USA). Each water potential sensor was installed below each tree canopy at a distance of 50 cm from each trunk and at 30 cm below ground, representative of the root system.

All devices started recording the 20th of June 2019, coinciding with the stop in irrigation. Measurements recorded the 5th of July (three weeks before the precipitation event) were selected as control, as trees were still well watered (soil water potential close to 0 MPa; Figure 1), and coincided with the first plant monitoring (see below).

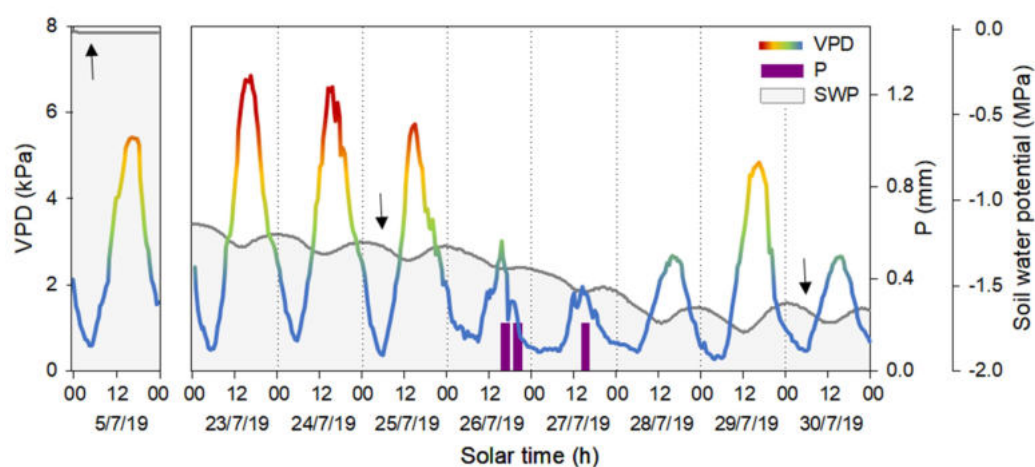


Figure 1. Evolution of vapor pressure deficit (VPD), precipitation (P) and soil water potential (SWP) during control under well-watered conditions (5/7/19), and during the summer rain event under soil water deficit (from 23/7/19 to 30/7/19). Colors in the curve correspond to different influence levels of VPD on stomatal conductance of *Q. ilex* according to [4]: blue, no influence; green, 25% of reduction; yellow, 50% of reduction; and red, more than 75% of reduction. SWP curve is the average of the three measured curves. Arrows indicate the time where plant water potential was measured.

2.2. Plant monitoring

Plant water potential was measured at predawn (between 4:30 and 5:00 h solar time) the 5th of July (well-watered conditions), and the 25th and the 30th of July, before and after the storm event, respectively (Figure 1). Measurements were performed in one shoot per tree with a Scholander pressure chamber following the methodological procedure described by Turner [37].

Chlorophyll (Chl) fluorescence measurements were carried out with a FMS II modulated fluorometer (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) at predawn on 3 fully developed current-year attached leaves of each one of the 3 studied specimens of *Q. ilex* subsp.

rotundifolia (i.e. three leaves per tree). Initial Chl fluorescence in the dark-adapted state (F_0) was measured only with the modulated light (0.6 kHz, PPFD <0.4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which avoids electron transport through photosystem II (PSII). Maximal Chl fluorescence in the dark-adapted state (F_M) was measured by closing reaction centres with a 0.8-s pulse of 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light (20 kHz). F_0 was measured in presence of far-red light that fully oxidizes the PSII acceptor side [38]. The dark-adapted, maximum quantum efficiency of PSII was calculated as F_v/F_M , being $F_v = F_M - F_0$ [39]. F_v/F_M was measured the 5th of July (well-watered conditions), and the 25th and the 30th of July, before and after the storm event, respectively.

We also monitored the physiological reflectance index (PRI) at canopy scale on the 3 studied specimens of *Q. ilex* subsp. *rotundifolia*. To do this, we used three SRS-PRI sensors (Field Stop Version, METER Group, Inc., WA, USA) that are designed for pointing downward to measure canopy reflected radiation in PRI wavelengths with a field of view restricted to 20°. Moreover, we placed one SRS-PRI sensor (Hemispherical Version, METER Group, Inc., WA, USA) with teflon difusers for making cosine-corrected measurements, which are primarily designed for up looking measurements of incident radiation that are used as reference. All sensors were connected to a data logger (Em50, METER Group, Inc., WA, USA) and measurements were stored at 2-min intervals. PRI was calculated as $(R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$, where R_{531} and R_{570} represent, respectively, the reflectance at 531 and 570 nm [40–42]. We considered the average PRI values between 11 and 12 hours (solar time) as a tool for monitoring the changes in the physiological performance of this species in response to water stress, as showed by Sancho-Knapik *et al.* [35].

Canopy temperature of each individual tree was also recorded every 30 seconds with infrared thermometers (IRT 757-500, precision 0.5%, TC Ltd, Uxbridge, U.K.), custom-calibrated against a 4-wire PT100 over the range 5–50°C in a high-precision water-bath (Julabo FP50, Julabo GmbH, Seelbach, Germany). This method has the advantage of being non-invasive, maintaining the air conditions surrounding the leaves, and integrating information at canopy level. Moreover, since each experimental tree had a dense, homogeneous canopy, measurements using IRT are expected to perform as well as more complex approaches such as thermography [43]. Both PRI and IRT sensors were located pointing to the south-side of the upper canopy, at an angle of 45°, at a distance aimed to cover 1 m² of the canopy surface. It should be noted that the southern exposure of the upper canopy may be the area with the highest evaporative demand during the day and measurements of temperature and reflectance obtained on this area may differ from other areas of the tree canopy [44,45].

Then, canopy temperature values associated to daily maximum VPD (reached between 14:30 and 15:30 h solar time) were selected for further analysis. Leaf transpiration (E) and total leaf conductance to water vapor (g_t) were calculated on half-hour basis from canopy temperature and micrometeorological data using an energy-balance model, following [46,47] (see Appendices A and B for details).

2.3. Statistical analysis

One-way analyses of variance (ANOVA) were performed to compare traits among days. Multiple comparisons were carried out to compare g_t and E among days using the post-hoc Tukey's honestly significant difference test. Paired sample comparisons using Student's t-tests were carried out to compare water potential, F_v/F_M and PRI before and after the rainfall event. For water potential comparisons, we selected those soil water potential values that matched in time the measurements of plant water potential (i.e. between 4:30 and 5:00 h solar time). Values were considered statistically different when P-values were lower than 0.05. All data are expressed as means $\pm$ standard error. Statistical analyses were carried out using the R software environment (version 4.0.0, R Development Core Team, 2018).

3. Results

For well-watered conditions (soil and plant water potential close to 0 kPa), mean values ($\pm$ se) of leaf transpiration and total conductance recorded for a maximum vapor pressure deficit (VPD_{max}) of 5.32 ± 0.01 kPa, were 5.93 ± 0.20 and 172 ± 8 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, respectively.

During the low precipitation event, we registered a reduction in VPD_{max} from ca. 6 kPa to values below 3 kPa (Figure 2) and a significant increase in total leaf conductance from ca. 50 to 150 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ ($P < 0.05$, Figure 2). However, leaf transpiration associated to the VPD_{max} remained constant with values between 3 and 4 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ ($P > 0.05$, Figure 2).

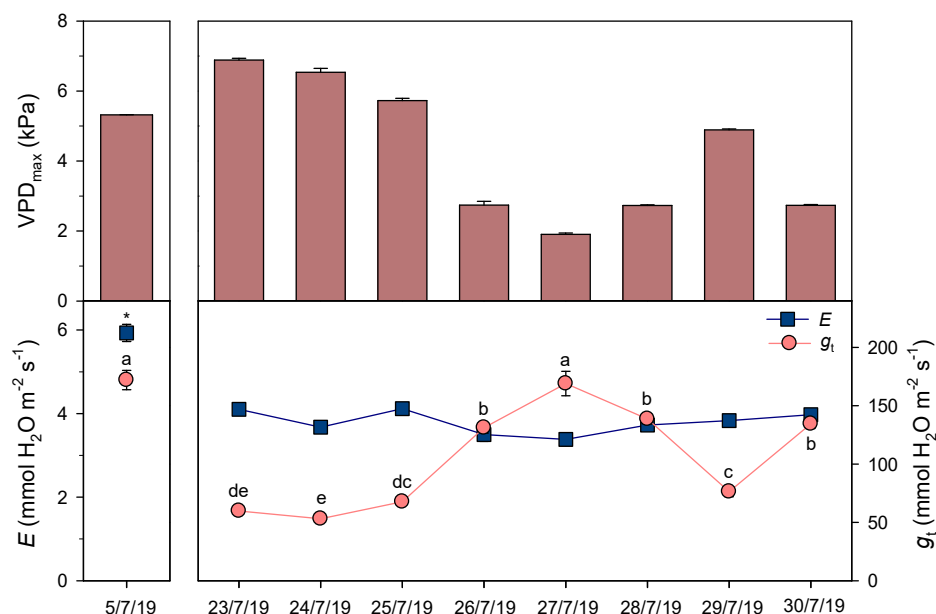


Figure 2. Evolution of the maximum vapor pressure deficit (VPD_{max}) for a particular day and the associated canopy transpiration (E) and total leaf conductance (g_t) to that VPD_{max} . Different letters above g_t values indicate significant differences among days. Asterisk above E indicates a significant difference between the 5/7/19 and the rest of the days (Tukey's test, $P < 0.05$).

The mean value of soil water potential measured the 30th of July after the precipitation event (-1.63 ± 0.27 MPa) was significantly lower ($P < 0.05$) than the mean value obtained the 25th of July measured before the event (-1.29 ± 0.23 MPa). In contrast, the mean values of plant water potential at predawn measured before (-1.25 ± 0.04 MPa) and after (-1.36 ± 0.17 MPa) the precipitation event were not different ($P > 0.05$; Figure 3).

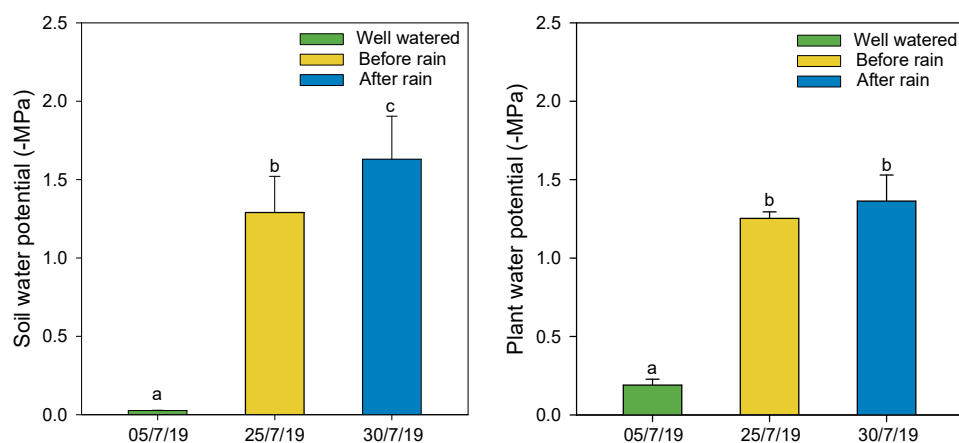


Figure 3. Soil and plant water potential obtained at predawn for well-watered holm oak trees (green), and on water stressed trees before (yellow) and after (blue) a low precipitation event. Different letters indicate significant differences among days (Student's t-test, $P < 0.05$).

The maximum potential photosystem II efficiency (F_v/F_m) increased significantly ($P < 0.05$) from 0.62 ± 0.03 (obtained before the rain event) to 0.73 ± 0.02 (measured after the event), reaching a similar value to that found when trees were well-watered (Figure 4). The same trend was found for the physiological reflectance index (PRI), where the mean value after the low precipitation event (0.0189 ± 0.0101) was significantly higher than the mean value before the event (0.0075 ± 0.0098 , $P < 0.05$). However, the PRI did not reach a similar value to the one measured when trees were well-watered (Figure 4).

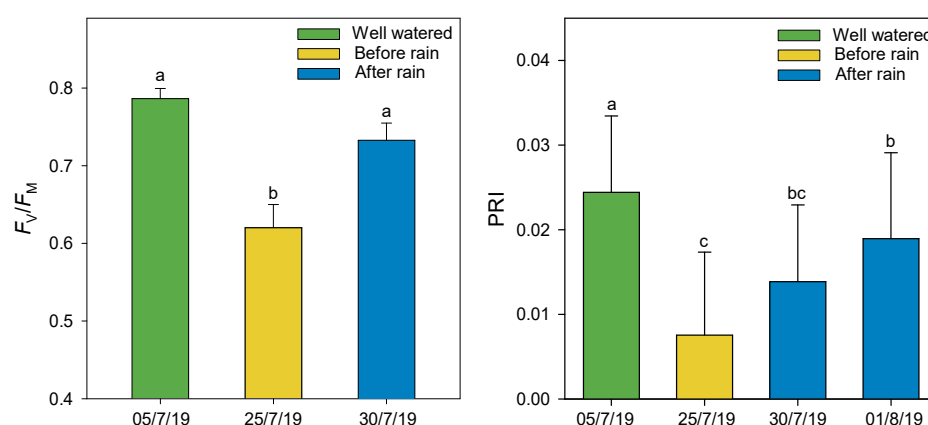


Figure 4. The maximum potential photosystem II efficiency (F_v/F_m) at predawn, and the physiological reflectance index (PRI) at midday, measured on well-watered (i.e. water potential close to 0 MPa) holm oak trees (green), and on water stressed trees before (yellow) and after (blue) a low precipitation event. Different letters indicate significant differences among days (Student's t-test, $P < 0.05$).

4. Discussion

The low precipitation event of 0.6 mm occurred during summer drought on an experimental field of *Q. ilex*, temporarily changed the atmospheric conditions by decreasing the atmospheric dryness or the so-called VPD (Figures 1 and 2). Regarding previous studies (e.g. [4]), a decrease in VPD could increase stomatal conductance of *Q. ilex*, which was in accordance with the increase in total leaf conductance found in this study, even before the beginning of the rain itself. That is, the increase in leaf conductance measured prior the rainfall itself could be attributable exclusively to the decrease in VPD. In addition, the tradeoff between VPD and total leaf conductance found for *Q. ilex*, resulted in a maintenance of the transpiration rates during the rain event. For the decrease in VPD_{max} of ca. 3 kPa (Figure 2) transpiration should have considerably decreased, but, as *Q. ilex* responded opening stomata, transpiration levels were maintained between 3 and 4 mmol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$. In the same way, at the end of the rain event, an increase in VPD should have increased transpiration, but as *Q. ilex* reduced leaf conductance by closing stomata, transpiration levels were again maintained. However, when comparing the values obtained during the rain event (with a certain level of soil water deficit) against the values measured three weeks before when trees were well-watered, we observed that for the higher VPD in well-watered conditions, total conductance was similar, but leaf transpiration was higher. That is, holm oak increases transpiration with increases in VPD with a higher soil water availability.

The increase in leaf conductance could lead to an increase in net photosynthesis as long as other factors such a soil humidity and solar radiation did not limit it [36,48]. First, according to Alonso-Forn *et al.* [36], *Q. ilex* subsp. *rotundifolia* reaches negligible (i.e. close to zero) photosynthesis rates and stomatal conductance values at -4 MPa of predawn

water potential. Thus, in our study trees were only subjected to a moderate water stress able to maintain a positive carbon balance. Second, data of radiation revealed that plants could take advantage of photosynthetically active radiation values higher than $1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the low precipitation event (Figure S1), which did not limited the possibility of increasing net photosynthesis during this time. If this was the case and net photosynthesis was not limited by other factors, water use efficiency, calculated as the ratio between net photosynthesis and transpiration, could have also increased during the small rain event as transpiration remained constant due to stomatal regulation (Figure 2). Additionally, previous studies assumed that water intercepted by the canopy could temporarily depress photosynthesis due to occlusion of stomata and scattering and reflection of radiation by surface water [49,50]. As *Q. ilex* have an unwettable abaxial surface [28], occlusion of stomata by water might not happened. Concerning the effect of reflection by surface water, further research would be needed to study the consequences on *Q. ilex*.

Together with the reduction in VPD, trees could have also increased their total leaf conductance with a rehydration of their tissues [4,48] once the rain itself started. In this case, it would be interesting to measure in further investigations the relative importance of each factor on the increase in leaf conductance. However, our results showed that soil water potential became more negative after the low rain event (Figure 3), so that the small amount of water registered during the rain was apparently not enough to reach the soil root layers where the soil water potential sensors were installed (30 cm in depth). Instead, water intercepted by foliage and further leaf water uptake must be the mechanism used by *Q. ilex* to maintain leaf water status [28] as no differences in predawn plant water potential before and after the rain were found. Indeed, one of the monitored trees showed a slight recovery in predawn plant water potential from -1.24 to -1.10 MPa. The discrepancy between soil and predawn plant water potential due to foliar water uptake was recently evidenced in several Amazonian tree species, where authors demonstrated that foliar uptake elevated leaf water status above the highest value that could be achieved from the uptake of soil water alone [51].

As a consequence of the supposed leaf water uptake detected in this study, *Q. ilex* showed a recovery of the maximum potential photosystem II efficiency (F_v/F_m) and a partial recovery of the physiological reflectance index (PRI, Figure 4), which partially agreed our hypothesis. The rapid recovery of F_v/F_m after the low precipitation event up to the normal physiological values could be due to the ability of this species for maintaining intact the photosynthetic pigment machinery, as was reported by Peguero-Pina *et al.* [52]. Therefore, as stated by these authors, F_v/F_m decreases would not be interpreted as permanent damage to the photosynthetic apparatus, but rather as a photoprotective mechanism that allows this species to acclimate to more stressful conditions. The performance of PRI would be also considered in these terms, as changes in PRI are associated to variations in de-epoxidized forms of the xanthophyll cycle molecules (antheraxanthin and zeaxanthin) [41,42], which constitutes an efficient mechanism for dissipating the excess of light energy in many plant species [53], such as *Q. ilex* [52]. Consequently, the partial recovery of PRI observed in this study could be the consequence of the partial retention of antheraxanthin and zeaxanthin, as plant water potential did not completely recover after the rain. Anyway, the observed increase of PRI after the low precipitation event would indicate an increase of plant photosynthetic activity after the low precipitation event. It should also be noted that for the water potential values registered in this study, values of F_v/F_m and PRI did not match previous studies [35,36,52]. This discrepancy might be due to the differences in the experimental design. In this study, measurements were carried out in adult trees under field conditions, which implied a slower decrease in predawn water potential when compared with the previous studies in potted plants.

Taking into account this leaf recovery found during the dry season, low precipitation events should be considered in the classical view of plant–atmosphere interactions. Furthermore, other types of water phenomena, such as dew due to condensation, should

also be considered as this occult precipitation may also supply small but essential quantities of water throughout the dry season [51]. In fact, dew occurs on approximately the 20% of summer days in the holm oak growing areas of the Iberian Peninsula (<http://www.aemet.es>). During these days, dew-derived water may be used for some morning transpiration, which could be crucial on forest drought tolerance. This subject might deserve further investigations.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1,

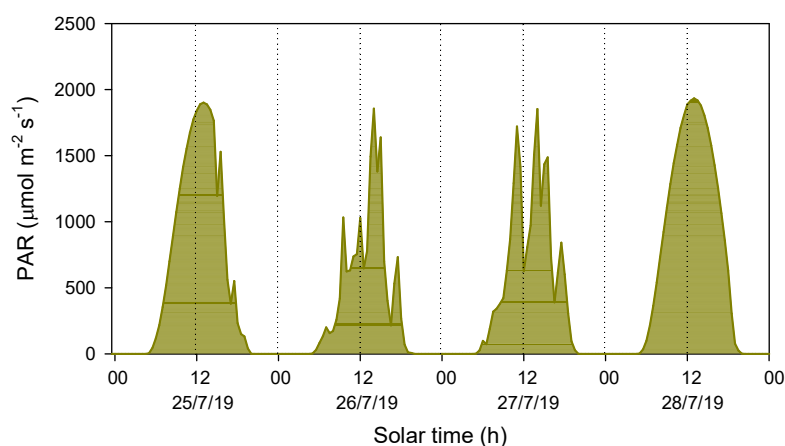


Figure S1. The photosynthetic active radiation (PAR) registered during the low precipitation event with a quantum sensor QSO (Apogee Instruments, Logan, USA).

Author Contributions: Conceptualization, D.S.-K., E.G.-P. and J.J.P.-P.; methodology, Ó.M.-H., D.A.-F., R.M.S., J.P.F. and J.J.P.-P.; software, J.P.F. and J.J.P.-P.; validation, D.S.-K., Ó.M.-H., and E.G.-P.; formal analysis, D.S.-K., Ó.M.-H., J.P.F., E.G.-P. and J.J.P.-P.; investigation, D.S.-K., Ó.M.-H., E.G.-P. and J.J.P.-P.; resources, J.P.F. and J.J.P.-P.; data curation, D.S.-K., Ó.M.-H., J.P.F. and J.J.P.-P.; writing—original draft preparation, D.S.-K.; writing—review and editing, Ó.M.-H., D.A.-F., R.M.S., J.P.F., E.G.-P. and J.J.P.-P.; project administration, J.P.F. and J.J.P.-P.; funding acquisition, all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación grant number PID2019-106701RR-I00/AEI/10.13039/501100011033 and by Gobierno de Aragón H09_20R research group. Work of D.A.-F. is supported by an FPI-INIA contract BES-2017-081208 and work of R.M.S. is supported by a pre-doctoral Gobierno de Aragón scholarship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Calculation of leaf conductance

Leaf transpiration (E , in $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was estimated from the difference between measured canopy temperature (T_c), and modelled leaf temperature for a dry surface (T_{dry}), according to energy balance equations [46]:

$$E = C_p(g_{bH} + g_r)(T_{\text{dry}} - T_c)/L \quad (\text{A1})$$

where C_p is the molar specific heat constant of air at constant pressure ($29.2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), g_{bH} and g_r are boundary layer (sensible) heat conductance and radiative heat conductance, respectively (in $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$), and L is the molar heat of vaporisation (44012 J mol^{-1}). g_{bH} and g_r were calculated following [54] and [46], respectively:

$$g_{bH} = 1/(3.8LA^{1/4}u^{-1/2}) \quad (\text{A2})$$

$$g_r = (4\sigma\epsilon_l T_{air}^2)/C_p \quad (A3)$$

where LA is leaf area (in m^2), u is wind speed (in $m\ s^{-1}$), σ is the Stefan-Boltzmann constant ($5.67 \times 10^{-8}\ W\ m^{-2}\ K^{-4}$), and ϵ_l is long-wave emissivity of the leaf (0.98). T_{dry} was estimated using the leaf temperature model described in [47], after removing the evaporative term (L^*D , where D is the water vapour concentration deficit ($mol\ mol^{-1}$)):

$$T_{dry} = \frac{(g_{bh} + g_r)(Q_0 * r_t)}{C_p(r_t + (sL/C_pP)(g_{bh} + g_r))} + T_{air} \quad (A4)$$

where Q_0 is the isothermal net radiation (in $W\ m^{-2}$, for calculations see Appendix B), r_t is total leaf resistance to water vapour (stomatal + boundary layer, in $m^2\ s^{-1}\ mol^{-1}$), s is the slope of the curve relating temperature to saturated vapour pressure (in $kPa\ K^{-1}$), and P is the pressure in kPa . The slope s was calculated following [47,55]:

$$s = a \left\{ \frac{[(T_{air} + b)(c - 2\frac{T_{air}}{d}) - T_{air}(c - \frac{T_{air}}{d})]}{(T_{air} + b)^2} \right\} * \exp\left\{T_{air} \left[\frac{(c - \frac{T_{air}}{d})}{(T_{air} + b)} \right] \right\} \quad (A5)$$

where $a=6.13753$, $b=255.57$, $c=18.564$ and $d=254.4$.

Total leaf conductance (g_t , in $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) was calculated according to [56]:

$$g_t = E \frac{[1 - (w_i + w_a)/2]}{(w_i - w_a)} \quad (A6)$$

where w_i and w_a stand for the mol fractions of water vapour inside the leaf and in the surrounding air, respectively. Total leaf resistance ($r_t=1/g_t$) was used as an input variable in Eq. A4, hence calculations were made iteratively, setting an initial value for $g_t=0.2\ mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, and recalculating with equations A1-A6 until the input and output values converged to a mean absolute difference $<0.0001\ mol\ m^{-2}\ s^{-1}$.

Appendix B. Calculation of isothermal net radiation

Horizontal radiation (Q_{sensor}) was determined from local measurements of photosynthetically active radiation (PAR) (quantum sensor QSO, Apogee Instruments, Logan, USA), assuming a typical ratio of short wave radiation to PAR of $0.5\ MJ\ mol^{-1}$ [46]. We estimated the fraction of diffuse radiation (K_{diff}) from the transmitted fraction (K_t), according to [57]:

$$K_{diff} = 1/[1 + \exp(8.6K_t - 5)] \quad (A7)$$

where K_t is calculated as the ratio between measured horizontal radiation and theoretical maximum horizontal solar radiation, as determined from the solar constant ($1370\ W\ m^{-2}$) and solar elevation (for details see Appendix 7 in [46]). From K_{diff} , we calculated diffuse (Q_{diff}) and direct (Q_{dir}) radiation reaching the sensor. Following Lambert's cosine law, we determined incident direct radiation in the canopy surface ($Q_{dir-canopy}$) multiplying Q_{dir} by the ratio between the cosine of the angle between the surface and the sun ($\cos \xi$), for the canopy and the sensor, respectively [46]:

$$\cos \xi = \frac{[(\sin \lambda \cos h)(-\cos \alpha \sin \chi) - \sin h (\sin \alpha \sin \chi) + (\cos \lambda \cos h) \cos \chi] \cos \delta + [\cos \lambda (\cos \alpha \sin \chi) + \sin \lambda \cos \chi] \sin \delta}{\cos \lambda (\cos \alpha \sin \chi) + \sin \lambda \cos \chi} \quad (A8)$$

where λ is the latitude, h is the hour angle of the sun, α and χ are the zenith angle and azimuth of the surface, respectively, and δ is declination. δ and h were determined using the functions *declination* and *hourangle*, available in the R package *insol* 1.2. For the sensor, $\chi=0$ (horizontal surface) and α becomes irrelevant. For the canopy, $\chi=45^\circ$ and $\alpha=189.2^\circ$. Finally, total isothermal net radiation (Q_0) reaching the canopy was calculated as the sum of Q_{diff} and $Q_{dir-canopy}$, multiplied by an average leaf absorption coefficient of 0.5 [46], and a light harvesting efficiency, which accounts for self-shading within the canopy, of 0.62 in *Q. ilex* [58].

References

- Walter, H. *Vegetation of the earth and ecological systems of the geo-biosphere*, 3rd ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1985.
- Lionello, P.; Malanotte-Rizzoli, P.; Boscolo, R.; Alpert, P.; Artale, V.; Li, L.; Luterbacher, J.; May, W.; Trigo, R.; Tsimplis, M.; et al. The mediterranean climate: an overview of the main characteristics and issues. In *Mediterranean Climate Variability*; Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; pp. 1–26.
- Gil-Pelegrín, E.; Saz, M.A.; Cuadrat, J.M.; Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D. Oaks under Mediterranean-type climates: Functional response to summer aridity. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.*; Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J.J., Sancho-Knapik, D., Eds.; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 137–193. DOI: 10.1007/978-3-319-69099-5_5
- Mediavilla, S.; Escudero, A. Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: A comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree Physiol.* **2003**, *23*, 987–996. DOI: 10.1093/treephys/23.14.987
- Nardini, A.; Lo Gullo, M.A.; Trifilò, P.; Salleo, S. The challenge of the Mediterranean climate to plant hydraulics: Responses and adaptations. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 68–79. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.09.018
- Niinemets, Ü.; Keenan, T. Photosynthetic responses to stress in Mediterranean evergreens: Mechanisms and models. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 24–41. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.008
- Peguero-Pina, J.J.; Vilagrosa, A.; Alonso-Forn, D.; Ferrio, J.P.; Sancho-Knapik, D.; Gil-Pelegrín, E. Living in Drylands: Functional adaptations of trees and shrubs to cope with high temperatures and water scarcity. *Forests* **2020**, *11*, 1028. DOI: 10.3390/f11101028
- Mosmann, V.; Castro, A.; Fraile, R.; Dessens, J.; Sanchez, J.L. Detection of statistically significant trends in the summer precipitation of mainland Spain. *Atmos. Res.* **2004**, *70*, 43–53. DOI: 10.1016/j.atmosres.2003.11.002
- Allen, R.G.; Walter, I.A.; Elliott, B.; Mechan, B.; Jensen, M.E.; Itentisu, D.; Howell, T.A.; Snyder, R.; Brown, P.; Eching S.; et al. Issues, requirements and challenges in selecting and specifying and standardized ET equation. Proceedings of the 4th Decennial Symposium, Phoenix, Arizona, USA, November 14–16, 2000; Evans, R.G.; Benham, B.L.; Trooien, T.P., Eds. American Society of Agricultural Engineers, Saint Joseph, pp 201–204.
- Breshears, D.D.; McDowell, N.G.; Goddard, K.L.; Dayem, K.E.; Martens, S.N.; Meyer, C.W.; Brown, K.M. Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. *Ecology* **2008**, *89*, 41–47. DOI: 10.1890/07-0437.1
- Simonin, K.A.; Santiago, L.S.; Dawson, T.E. Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D. Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 882–892. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01967.x
- Eller, C.B.; Lima, A.L.; Oliveira, R.S. Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). *New Phytol.* **2013**, *199*, 151–162. DOI: 10.1111/nph.12248
- Eller, C.B.; Lima, A.L.; Oliveira, R.S. Cloud forest trees with higher foliar water uptake capacity and anisohydric behavior are more vulnerable to drought and climate change. *New Phytol.* **2016**, *211*, 489–501. DOI: 10.1111/nph.13952
- Dawson, T.E.; Goldsmith, G.R. The value of wet leaves. *New Phytol.* **2018**, *219*, 1156–1169. DOI: 10.1111/nph.15307
- Martin, C.E.; von Willert, D.J. Leaf epidermal hydathodes and the ecophysiological consequences of foliar water uptake in species of *Crassula* from the Namib desert in Southern Africa. *Plant Biol.* **2000**, *2*, 229–242. DOI: 10.1055/s-2000-9163
- Gotsch, S.G.; Asbjornsen, H.; Holwerda, F.; Goldsmith, G.R.; Weintraub A.E.; Dawson, T.E. Foggy days and dry nights determine crown-level water balance in a seasonal tropical Montane cloud forest. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 261–272. DOI: 10.1111/pce.12151
- Berry, Z.C.; Smith, W.K. Cloud pattern and water relations in *Picea rubens* and *Abies fraseri*, southern Appalachian Mountains, USA. *Agric. For. Meteorol.* **2012**, *162*, 27–34. DOI: 10.1016/j.agrformet.2012.04.005
- Berry, Z.C.; Hughes, N.M.; Smith, W.K. Cloud immersion: an important water source for spruce and fir saplings in the southern Appalachian Mountains. *Oecologia*, **2014**, *174*, 319–326. DOI: 10.1007/s00442-013-2770-0
- Burgess, S.S.O.; Dawson, T.E. The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant Cell Environ.* **2004**, *27*, 1023–1034. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01207.x
- Eichert, T.; Fernández, V. Uptake and release of mineral elements by leaves and other aerial plant parts. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3rd ed.; Marschner, P., Ed.; Academic Press, 2012, pp. 71–84. DOI: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00004-2

21. Fernández, V.; Bahamonde, H.A.; Peguero-Pina, J.J.; Gil-Pelegrín, E.; Sancho-Knapik, D.; Gil, L.; Goldbach, H.E.; Eichert, T. Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 5293–5306. DOI: 10.1093/jxb/erx302
22. Burkhardt, J.; Basi, S.; Pariyar, S.; Hunsche, M. Stomatal penetration by aqueous solutions—an update involving leaf surface particles. *New Phytol.* **2012**, *196*, 774–787. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04307.x
23. Kerstiens, G. Water transport in plant cuticles: an update. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2493–2499. DOI: 10.1093/jxb/erl017
24. Pina, A.L.; Zandavalli, R.B.; Oliveira, R.S.; Martins, F.R.; Soares, A.A. Dew absorption by the leaf trichomes of *Combretum leprosum* in the Brazilian semiarid region. *Funct. Plant Biol.* **2016**, *43*, 851–861. DOI: 10.1071/FP15337
25. Schreel, J.D.M.; Leroux, O.; Goossens, W.; Brodersen, C.; Rubinstein, A.; Steppe, K. Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. *Plant J.* **2020**, *103*, 769–780. DOI: 10.1111/tpj.14770
26. Wang, X.; Xiao, H.; Cheng, Y.; Ren, J. Leaf epidermal water absorbing scales and their absorption of unsaturated atmospheric water in *Reaumuria soongorica*, a desert plant from the northwest arid region of China. *J. Arid Environ.* **2016**, *128*, 17–29. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2016.01.005
27. Uematsu, S.; Vandenhoove, H.; Sweeck, L.; Hees, M.V.; Wannijn, J.; Smolders, E. Foliar uptake of radiocaesium from irrigation water by paddy rice (*Oryza sativa*): an overlooked pathway in contaminated environments. *New Phytol.* **2017**, *214*, 820–829. DOI: 10.1111/nph.14416
28. Fernández, V.; Sancho-Knapik, D.; Guzmán, P.; Peguero-Pina, J.J.; Gil, L.; Karabourniotis, G.; Khayet, M.; Fasseas, C.; Heredia-Guerrero, J.A.; Heredia, A.; Gil-Pelegrín, E. Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: effect of leaf side and age. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 168–180. DOI: 10.1104/pp.114.242040
29. Ding, J.; Yang, T.; Zhao, Y.; Liu, D.; Wang, X.; Yao, Y.; Peng, S.; Wang, T.; Piao, S. Increasingly important role of atmospheric aridity on Tibetan alpine grasslands. *Geophys. Res. Lett.* **2018**, *45*, 2852–2859. DOI: 10.1002/2017GL076803
30. Yuan, W.; Zheng, Y. I.; Piao, S.; Ciais, P.; Lombardozzi, D.; Wang, Y.; Ryu, Y.; Chen, G.; Dong, W.; Hu, Z.; et al. Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaax1396. DOI: 10.1126/sciadv.aax1396
31. McDowell, N.G.; Allen, C.D. Darcy's law predicts widespread forest mortality under climate warming. *Nat. Clim. Chang.* **2015**, *5*, 669–672. DOI: 10.1038/nclimate2641
32. Grossiord, C.; Buckley, T.N.; Cernusak, L.A.; Novick, K.A.; Poulter, B.; Siegwolf, R.T.W.; Sperry, J.S.; McDowell, N.G. Plant responses to rising vapor pressure deficit. *New Phytol.* **2020**, *226*, 1550–1566. DOI: 10.1111/nph.16485
33. Garcia-Barreda, S.; Camarero, J.J. Tree ring and water deficit indices as indicators of drought impact on black truffle production in Spain. *For. Ecol. Manag.* **2020**, *475*, 118438. DOI: 10.1016/j.foreco.2020.118438
34. Sepulcre-Canto, G.; Zarco-Tejada, P.J.; Jimenez-Munoz, J.C.; Sobrino, J.A.; Soriano, M.A.; Fereres, E.; Vega, V.; Pastor, M. Monitoring yield and fruit quality parameters in open-canopy tree crops under water stress. Implications for ASTER. *Remote Sens. Environ.* **2007**, *107*, 455–470. DOI: 10.1016/j.rse.2006.09.014
35. Sancho-Knapik, D.; Mendoza-Herrer, Ó.; Gil-Pelegrín, E.; Peguero-Pina, J.J. Chl Fluorescence parameters and leaf reflectance indices allow monitoring changes in the physiological status of *Quercus ilex* L. under progressive water deficit. *Forests* **2018**, *9*, 400; DOI: 10.3390/f9070400
36. Alonso-Forn, D.; Peguero-Pina, J.J.; Ferrio, J.P.; Mencuccini, M.; Mendoza-Herrer, Ó.; Sancho-Knapik, D.; Gil-Pelegrín, E. Contrasting functional strategies following severe drought in two Mediterranean oaks with different leaf habit: *Quercus faginea* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia*. *Tree Physiol.* **2020**, *41*, 371–387 DOI: 10.1093/treephys/tpaa135
37. Turner, N.C. Measurement of plant water status by pressure chamber technique. *Irrigation Sci.* **1988**, *9*, 289–308. DOI: 10.1007/BF00296704
38. Belkhdja, R.; Morales, F.; Quílez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res.* **1998**, *56*, 265–276. DOI: 10.1023/A:1006039917599
39. Abadía, J.; Morales, F.; Abadía, A. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil* **1999**, *215*, 183–192.
40. Gamon, J.A.; Serrano, L.; Surfus, J.S. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* **1997**, *112*, 492–501. DOI: 10.1007/s004420050337
41. Peguero-Pina, J.J.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrín, E.; Moya, I. Photochemistry, re-motely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* **2008**, *156*, 1–11. DOI: 10.1007/s00442-007-0957-y
42. Peguero-Pina, J.J.; Gil-Pelegrín, E.; Morales, F. Three pools of zeaxanthin in *Quercus coccifera* leaves during light transitions with different roles in rapidly reversible photoprotective energy dissipation and photoprotection. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 1649–1661. DOI: 10.1093/jxb/ert024
43. Hackl, H.; Baresel, J.P.; Mistele, B.; Hu, Y.; Schmidhalter, U. A comparison of plant temperatures as measured by thermal imaging and infrared thermometry. *J. Agron. Crop Sci.* **2007**, *198*, 415–429. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01771.x
44. Niinemets, Ü.; Keenan, T.F.; Hallik, L. A worldwide analysis of within-canopy variations in leaf structural, chemical and physiological traits across plant functional types. *New Phytol.* **2014**, *205*, 973–993. DOI: 10.1111/nph.13096
45. Rey-Sánchez, A.C.; Slot, M.; Posada, J.M.; Kitajima, K. Spatial and seasonal variation in leaf temperature within the canopy of a tropical forest. *Climate Research* **2016**, *71*, 75–89. DOI: 10.3354/cr01427
46. Jones, H. G. Plants and Microclimate; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1992; Vol. 2nd. Ed.; ISBN 9780511845727.

47. Barbour, M. M.; Fischer, R. A.; Sayre, K. D.; Farquhar, G. D. Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* **2000**, *27*, 625–637, doi:10.1071/pp99041.
48. Peguero-Pina, J.J.; Mendoza-Herrer, Ó.; Gil-Pelegrín, E.; Sancho-Knapik, D. Cavitation limits the recovery of gas exchange after severe drought stress in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Forests* **2018**, *9*, 443. DOI: 10.3390/f9070443
49. Gerlein-Safdi, C.; Koohafkan, M.C.; Chung, M.; Rockwell, F.E.; Thompson, S.; Caylor, K.K. Dew deposition suppresses transpiration and carbon uptake in leaves. *Agric. For. Meteorol.* **2018**, *259*, 305–316. DOI: 10.1016/j.agrfo rmet.2018.05.015
50. Pariyar, S.; Chang, S.C.; Zinsmeister, D.; Zhou, H.; Grantz, D.A.; Hunsche, M.; Burkhardt, J. Xeromorphic traits help to maintain photosynthesis in the perhumid climate of a Taiwanese cloud forest. *Oecologia* **2017**, *184*, 609–621. DOI: 10.1007/s00442-017-3894-4
51. Binks, O.; Mencuccini, M.; Rowland, L.; da Costa A.C.L.; Reis de Carvalho, C.J.; Bittencourt, P.; Eller, C.; Sales Teodoro, G.; Maklouf Carvalho, E.J.; Azul Soza, A.; et al. Foliar water uptake in Amazonian trees: Evidence and consequences. *Glob. Change Biol.* **2019**, *25*, 2678–2690. DOI: 10.1111/gcb.14666
52. Peguero-Pina, J.J.; Sancho-Knapik, D.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrín, E. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 453–462. DOI: 10.1071/FP08297
53. Demmig-Adams, B.; Adams, W.W. Photoprotection in an ecological context: the re-markable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* **2006**, *172*, 11–21. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x
54. Ball, M.C.; Cowan, I.R.; Farquhar, G.D. Maintenance of leaf temperature and the optimisation of carbon gain in relation to water loss in a tropical mangrove forest. *Aust. J. Plant Physiol.* **1988**, *15*, 263–276. DOI: 10.1071/pp9880263.
55. Postl, W. F.; Bolhàr-Nordenkamp, H.R. 'GASEX': a program to study the influence of data variations on calculated rates of photosynthesis and transpiration. In *Photosynthesis and production in a changing environment*; Hall, D.O., Scurlock, J.M.D., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R. C., Long, S. P., Eds.; Chapman and Hall: London, 1983; pp. 448–455
56. von Caemmerer, S.; Farquhar, G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **1981**, *153*, 376–387. DOI: 10.1007/BF00384257.
57. Boland, J.; Ridley, B.; Brown, B. Models of diffuse solar radiation. *Renew. Energy* **2008**, *33*, 575–584. DOI: 10.1016/j.renene.2007.04.012.
58. Estes-Martínez, J.; Valladares, F.; Camarero, J.J.; Gil-Pelegrín, E. Crown architecture and leaf habit are associated with intrinsically different light-harvesting efficiencies in *Quercus* seedlings from contrasting environments. *Ann. For. Sci.* **2006**, *63*, 511–518. DOI: 10.1051/forest:2006033.